

50376
1987
159

50376
1987
159

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Thèse de Troisième Cycle

Biologie et Physiologie Animales

(Mention Physiologie Nerveuse et Musculaire)

présentée par

AHMED AHIDOUCHE



DYNAMIQUE DES JONCTIONS NEUROMUSCULAIRES ET DE LA COMPOSITION DU MUSCLE
STERNOCEPHALIQUE APRES DENERVATION ET SUTURE CROISEE HETEROGENE,
NERF VAGUE SENSITIF-NERF SPINAL ACCESSOIRE, CHEZ LE LAPIN.

Soutenue le 29 juin 1987 devant la Commission d'Examen.

Exemplaire corrigé après avis du jury

Jury : Président, R. COUTEAUX, Professeur Honoraire, Université Paris VI
Rapporteur, P. DELORME, Professeur, Université de Lille I
Examineurs, P. GUILBAULT, Professeur, Université de Lille I
J.P. ROUSSEAU, Professeur, Université Paris VI

Travail réalisé au Laboratoire de Neurobiologie Fonctionnelle de l'Université
des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, Unité Associée au CNRS n° 308.

A mes parents

AVANT-PROPOS

Ce mémoire est le résultat de trois années de travail dans le Laboratoire de Neurobiologie Fonctionnelle de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, sous la direction du Professeur P. DELORME que je tiens à remercier de m'avoir accueilli dans son Laboratoire. Il m'a initié aux techniques de microscopie électronique et a su veiller sur l'évolution de ce travail tout en me laissant la liberté de prendre des initiatives. Qu'il soit remercié aussi pour toute l'aide qu'il m'a apportée pendant toutes les phases de réalisation de ce travail.

Je voudrais exprimer mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur J.P. ROUSSEAU pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail. Il m'a ouvert les portes de son Laboratoire où j'ai pu opérer et discuter efficacement dans une ambiance très sympathique. Ces critiques et conseils m'ont été d'un grand intérêt.

Je voudrais remercier particulièrement Monsieur le Professeur COUTEAUX de s'intéresser à ce travail. Ses critiques et ses conseils me sont d'une très grande importance. C'est un honneur qu'il me fait en acceptant de siéger et de présider mon jury de thèse. J'en suis très touché.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur P. GUILBAULT qui a bien voulu m'accorder son aide efficace et faire partie de mon jury. C'est dans son Laboratoire et avec deux de ses Chercheurs, G. BRÛLÉ et G. HAUDECOEUR, que j'ai pu assurer le contrôle électrophysiologique de mes animaux suturés. Qu'ils soient tous remerciés.

Mes remerciements vont à Monsieur M. FALEMPIN de m'avoir initié à la technique de suture croisée hétérogène et de m'avoir fait profiter, avec sympathie, de ses connaissances bibliographiques sur le sujet.

Je voudrais remercier Monsieur P. TANCOSIC de la Faculté de Médecine de Nancy qui, avec beaucoup d'efficacité, a assuré l'analyse d'images de nos préparations musculaires.

Mes remerciements vont à Madame ROUSSEAU pour son aide précieuse et sa généreuse sympathie. C'est elle qui m'a initié aux techniques histo-chimiques utilisées dans ce travail. Je lui en suis très reconnaissant.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Y. DODEY qui a assuré la dactylographie de ce mémoire. Qu'elle trouve ici l'expression de mes amitiés profondes.

Je remercie également Monsieur J. HONORE pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail. C'est avec efficacité et grande générosité qu'il m'a accordé son aide au cours de ce travail et déjà au D.E.A.

Enfin, je dis un grand merci pour tous les membres du Bâtiment SN4 qui, pendant toute ma présence au Laboratoire, m'ont été d'une sympathie et d'un soutien, moral et effectif, parfait.

SOMMAIRE

| | |
|--|-------|
| INTRODUCTION | p. 1 |
| MATERIEL ET METHODES | p. 6 |
| I - DESCRIPTION DE LA PREPARATION UTILISEE | p. 6 |
| A) LE MUSCLE STERNOCEPHALIQUE ET SON INNERVATION | p. 6 |
| B) LE NERF VAGUE | p. 9 |
| 1) <i>Trajet du vague dans le cou et le thorax</i> | p. 9 |
| 2) <i>Composition du vague</i> | p. 11 |
| II - METHODES | p. 12 |
| A) TECHNIQUE OPERATOIRE | p. 12 |
| 1) <i>Préparation des animaux</i> | p. 12 |
| 2) <i>Suture nerveuse croisée hétérogène</i> | p. 12 |
| B) TECHNIQUE ELECTROPHYSIOLOGIQUE | p. 12 |
| 1) <i>Mise en place des électrodes</i> | p. 14 |
| a - <i>Les électrodes de stimulation</i> | p. 14 |
| b - <i>Les électrodes de réception</i> | p. 14 |
| C) TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE | p. 16 |
| 1) <i>Généralités</i> | p. 16 |
| 2) <i>Fixation</i> | p. 16 |
| a - <i>Les fixateurs</i> | p. 16 |
| a) <i>Le glutaraldéhyde</i> | p. 16 |
| b) <i>Le tétroxyde d'osmium</i> | p. 17 |
| b - <i>Facteurs importants</i> | p. 18 |
| a) <i>pH</i> | p. 18 |
| b) <i>Osmolarité</i> | p. 18 |
| c - <i>Technique de fixation de la préparation</i> | p. 19 |
| a) <i>Fixation aldéhydique</i> | p. 19 |
| b) <i>Révélation des acétylcholinestérases</i> | p. 19 |
| c) <i>Postfixation</i> | p. 21 |
| 3) <i>Déshydratation</i> | p. 21 |
| 4) <i>Inclusion</i> | p. 22 |
| 5) <i>Microtomie</i> | p. 22 |
| 6) <i>Contraste</i> | p. 23 |
| a - <i>Acétate d'uranyl</i> | p. 23 |
| b - <i>Citrate de plomb</i> | p. 24 |
| 7) <i>Observation au microscope électronique</i> | p. 24 |

| | |
|--|-------|
| D) TECHNIQUE HISTOCHIMIQUE DES ATPases | p. 25 |
| 1) Généralités | p. 25 |
| 2) Protocole expérimental | p. 26 |
| a - Préincubations | p. 26 |
| b - Incubation | p. 26 |
| c - Coloration | p. 26 |
| d - Déshydratation | p. 27 |
| E) TECHNIQUE DE L'ANALYSE D'IMAGES | p. 27 |
| 1) Organisation générale de l'analyse d'images | p. 27 |
| 2) Paramètres mesurés | p. 31 |
| a - Paramètres de taille | p. 32 |
| b - Paramètres de distribution spatiale | p. 32 |

CHAPITRE I : ULTRASTRUCTURE DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE NORMALE

p. 38

I - RESULTATS

p. 38

| | |
|--|-------|
| A) COMPOSANTE NERVEUSE | p. 38 |
| 1) Les vésicules | p. 38 |
| 2) Les mitochondries | p. 41 |
| 3) L'axolemme | p. 41 |
| B) COMPOSANTE MUSCULAIRE | p. 44 |
| 1) Le sarcoplasme jonctionnel | p. 44 |
| 2) Le sarcoplasme jonctionnel ou membrane post-jonctionnelle | 44 |

II - DISCUSSION

p. 45

| | |
|----------------------------------|-------|
| A) COMPOSANTE NERVEUSE | p. 46 |
| 1) Les cellules télogliales | p. 46 |
| 2) La terminaison axonique | p. 46 |
| a - Les vésicules synaptiques | p. 46 |
| b - Les mitochondries | p. 48 |
| c - La membrane préjonctionnelle | p. 49 |
| B) FENTE JONCTIONNELLE | p. 50 |
| C) COMPOSANTE MUSCULAIRE | p. 50 |
| 1) Membrane postsynaptique | p. 50 |
| 2) Le sarcoplasme jonctionnel | p. 52 |
| a - Les mitochondries | p. 52 |
| b - Le glycogène | p. 53 |
| c - Les vésicules | p. 53 |

| | |
|--|-------|
| CHAPITRE II : ULTRASTRUCTURE DES PLAQUES MOTRICES EN COURS DE DEGENERESCENCE | p. 54 |
| I - RESULTATS | p. 54 |
| A) STADE I : 24 HEURES APRES DENERVATION | p. 54 |
| B) STADE II : 48 HEURES APRES DENERVATION | p. 57 |
| C) STADE III : 72 HEURES APRES DENERVATION | p. 57 |
| D) DEGENERESCENCE A LONG TERME : DEUX MOIS APRES DENERVATION | p. 62 |
| II - DISCUSSION | p. 63 |
| CHAPITRE III : ULTRASTRUCTURE DES JONCTIONS NEUROMUSCULAIRES ISSUES DE LA REINNERVATION | p. 65 |
| I - RESULTATS | p. 65 |
| A) CONTROLES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DE LA REINNERVATION | p. 65 |
| B) OBSERVATIONS ULTRASTRUCTURALES DES JONCTIONS NEUROMUSCULAIRES | p. 70 |
| 1) <i>Composante nerveuse</i> | p. 73 |
| 2) <i>Composante musculaire</i> | p. 73 |
| II - DISCUSSION | p. 78 |
| CHAPITRE IV : ETUDE MORPHOMETRIQUE DES FIBRES MUSCULAIRES DU MUSCLE STERNO-CEPHALIQUE | p. 83 |
| I - RESULTATS | p. 83 |
| A) ANALYSE QUANTITATIVE DES FIBRES | p. 83 |
| B) REPARTITION SPATIALE DES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES | p. 87 |
| II - DISCUSSION | p. 92 |
| CONCLUSION GENERALE | p. 95 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | p. 98 |

INTRODUCTION

Dans une espèce donnée, la relation entre le système nerveux et les différents muscles s'établit au cours du développement ontogénique et se poursuit après la naissance. Cette relation fonctionnelle est assurée par des fibres nerveuses sensitives et motrices qui, non seulement apportent les commandes incitant les muscles à se contracter, mais aussi participent au maintien de leur tonus. La mise en place de cette relation assure l'adaptation du système nerveux à l'évolution du muscle grâce aux afférences et lui permet, par l'intermédiaire des efférences, d'influencer l'évolution du muscle.

Les fibres musculaires striées squelettiques ne sont pas homogènes : il est possible de distinguer des muscles rouges et des muscles blancs. Cette hétérogénéité, qui n'est pas seulement due au taux de vascularisation des muscles, peut être observée au niveau d'un seul muscle. Cette composition différente des muscles est à mettre en relation avec le rôle qu'ils jouent dans l'organisme. La distinction entre muscles rouges ou blancs est à mettre en parallèle avec une spécialisation fonctionnelle des fibres nerveuses (fréquences de décharges des fibres nerveuses en rapport avec la nature des muscles sollicités ; organisation différente des jonctions neuromusculaires). L'interaction système nerveux-muscle, dans sa complexité, peut être altérée par des causes pathologiques ou accidentelles. Dans tous les cas, cela se traduit par des troubles structuraux (désorganisation des plaques motrices, modification de la composition musculaire souvent accompagnée d'une résorption tissulaire à l'origine d'une atrophie musculaire) et des troubles fonctionnels qui se traduisent notamment par une perte de la motricité. Pour essayer de remédier à ces altérations, l'Homme a cherché à restaurer l'activité des muscles ainsi lésés en étudiant leurs possibilités de réinnervation.

C'est FLOURENS qui réalisa les premiers travaux scientifiques dans ce domaine. Dès 1828, il démontre, chez les Oiseaux, la possibilité de réinnervation d'un muscle strié squelettique par un nerf différent de celui qui l'innerve normalement. En 1904, LANGLEY et ANDERSON réalisent le même type d'expériences chez le Chat et le Lapin et, s'ils réussissent à réinnover un muscle strié squelettique tant par des fibres somatiques motrices que par des fibres végétatives pré-ganglionnaires, ils n'y

parviennent pas avec des fibres sensibles.

Deux grands axes de recherche marquent l'évolution de nos connaissances en matière de réinnervation des muscles striés squelettiques selon que les fibres réinnervantes sont motrices ou sensibles. Cependant, ce sont les études portant sur la réinnervation par les éléments moteurs qui ont été les plus nombreuses.

GWYN et AITKEN (1966), BENNETT et al (1973a) et Mc ARDLE et ALBUQUERQUE (1973) obtiennent la réinnervation d'un muscle strié squelettique par les fibres motrices qui l'innervent normalement. HARRIS (1974) réussit la réinnervation par des fibres somatiques motrices. DUSSARDIER (1960 a, b) réalise la réinnervation de l'hémi-diaphragme par des fibres végétatives préganglionnaires vagues innervant à l'origine l'estomac. ROMAN (1967), en suturant le bout central du nerf vague au bout périphérique du nerf spinal accessoire, parvient à réinnover le muscle mastoïdien huméral.

La capacité d'un nerf à réinnover un muscle ayant été démontrée, d'autres questions sont soulevées comme celles concernant les modalités selon lesquelles les axones réinnervants rétablissent les contacts fonctionnels avec le muscle dénervé ou encore la prépondérance d'un nerf par rapport à un autre dans ces processus de réinnervation.

En ce qui concerne les contacts fonctionnels, GUTMANN et YOUNG (1944), MILEDI (1960), GUTH (1968), LANDMESSER (1971, 1972), BENNETT et al (1973 a et b), Mc ARDLE et ALBUQUERQUE (1973), HARRIS (1974) et GRUBER (1978) estiment que, lors de la réinnervation, il y a recolonisation préférentielle des sites des anciennes jonctions neuro-musculaires. DELBARRE et al (1974) et KORNELIUSSEN et SOMMERSCHILD (1976) montrent que la réinnervation peut faire intervenir la formation de nouvelles plaques motrices. Selon GUTMANN et HANZLIKOVÁ (1967), IP et VRBOVÁ (1973) et FRANK et al (1975), cette néoformation de plaques motrices est induite par l'implantation du nerf moteur, en un point éloigné de son arrivée initiale. GWYN et AITKEN (1966) et HARRIS (1974)

montrent que pour que les fibres nerveuses puissent proliférer dans un muscle et établir des contacts fonctionnels, il est nécessaire que ce dernier ait été, préalablement, totalement dénervé. La désolidarisation fonctionnelle transitoire de l'ensemble nerf-muscle, obtenue par inhibition de la transmission synaptique à l'aide de toxine botulinique, permet la formation de nouvelles plaques motrices par des fibres étrangères au niveau d'un muscle normalement innervé (FEX et al, 1966). Quant à la prépondérance d'un nerf par rapport à un autre, lors de la réinnervation d'un muscle, GRINNELL et al (1979) ont démontré que, si celle-ci est tentée à l'aide de deux nerfs moteurs étrangers, l'un rachidien, l'autre végétatif ganglionnaire, c'est le nerf somatique qui réinnerve préférentiellement. Par ailleurs, GORDON et al (1980) montrent, chez le Lapin et le Rat, que la réinnervation du muscle sterno-cléido-mastoïdien par le nerf spinal accessoire (nerf propre de ce muscle) est plus importante que celle obtenue à l'aide du nerf vague moteur.

La réinnervation préférentielle des muscles lents ou des muscles rapides par leurs anciens nerfs moteurs, décrite par FENG et al (1965), HOH (1971) et SCHMIDT et STEFANI (1976), chez les Vertébrés inférieurs et les Oiseaux, ne semble pas être aussi marquée chez les Mammifères (MILEDI et STEFANI, 1969). Cependant, HOH (1975) rapporte que, chez le Rat, les muscles rapides sont préférentiellement réinnervés par leurs nerfs propres plutôt que par des nerfs qui, normalement, sont destinés à des muscles lents. L'explication de ces diverses assertions tient peut-être au fait que chez les Vertébrés inférieurs et les Oiseaux, les différences entre les axones innervant les muscles lents et ceux innervant les muscles rapides sont plus importantes que chez les Mammifères (GORDON et al, 1980).

La réinnervation d'un muscle strié par des éléments sensitifs varie selon que les fibres réinnervantes appartiennent ou non au système nerveux végétatif. WEISS (1934, 1935) travaillant sur le Crapaud, montre que les extrémités centrale (antidromique) ou périphérique (orthodromique) des fibres sensibles rachidiennes, sectionnées respectivement au niveau du nerf rachidien ou à leur entrée dans la moëlle, sont capables de

réinnervent des muscles striés squelettiques transplantés. En 1945, WEISS et EDDS réalisent la réinnervation du muscle quadriceps, chez le Rat et le Chat, après suture croisée hétérogène entre le bout périphérique du nerf saphène (sensitif) et le bout périphérique du nerf fémoral (moteur de ce muscle). Par contre, à la même époque, GUTMANN (1945), à la suite de travaux réalisés chez le Lapin, conclut à l'impossibilité de réinnervent un muscle strié squelettique par des dendrites sensibles utilisées dans leur sens antidromique. Plus récemment, GRINNELL et RHEUBEN (1979) notent, chez la Grenouille, l'incapacité d'un nerf sensible cutané à réinnervent un muscle transplanté au niveau du tronc.

A la suite d'expériences effectuées chez le Chien, ANOKHINE et al (1934) déduisent que la réinnervation est possible par des dendrites végétatives sensibles. Ces études sur la réinnervation par des dendrites sont relativement moins fréquentes que celles qui font intervenir des axones. A partir de deux types d'expériences chez le Chat, VERA et LUCO (1967) ont réinnervé, d'une part, la membrane nictitante et, d'autre part, le muscle long du cou par des axones vagues sensibles. La réinnervation ainsi obtenue est à médiation cholinergique, puisque le curare et l'atropine peuvent inhiber les contractions des muscles réinnervés.

Afin d'étudier l'activité d'intérocepteurs vagues chez les Ruminants, ROUSSEAU (1970) réalise des sutures croisées hétérogènes entre le nerf vague sensible, coupé au-dessus du ganglion plexiforme, et le bout périphérique du nerf spinal accessoire. Des expériences de stimulations vagues et de distension de l'oesophage, par exemple, entraînent l'activation des fibres musculaires réinnervées. Ces expériences lui ont permis de recueillir les activités d'unités motrices concomitantes d'évènements respiratoires et digestifs chez l'animal éveillé. FALEMPIN et al (1977) ont réalisé le même type de travail chez le Lapin. Les réponses qu'ils ont obtenues sont inhibées par injection intraveineuse d'un agent curarisant. Ces résultats démontrent, tout comme ceux décrits par VERA et LUCO (1967) que la réinnervation obtenue est à médiation cholinergique.

Afin de préciser la nature de cette réinnervation, des études histologiques et électrophysiologiques ont été réalisées sur différentes espèces animales (COGET, 1977 et 1980 ; FALEMPIN, 1981 ; COGET et ROUSSEAU, 1983 ; FALEMPIN et ROUSSEAU, 1983). Par contre, chez le Rat, ZALEWSKI (1970) n'a pas pu obtenir de réinnervation musculaire après suture croisée hétérogène. lui, seules les fibres motrices sont capables de réinnervation.

De tous ces résultats, il ressort que :

- si la réinnervation par des fibres motrices est toujours possible, elle doit être précédée d'une dénervation du muscle. Les plaques motrices de réinnervation qui, le plus souvent, se réimplantent au niveau des anciens sites peuvent s'installer dans des anciennes zones extrajonctionnelles ;

- la réinnervation d'un muscle par ses anciennes fibres nerveuses motrices étant privilégiée, il est prudent, lorsqu'on souhaite le réinnover par des fibres nerveuses étrangères, de faire en sorte que ces anciennes fibres ne puissent plus entrer en contact avec lui ;

- la réinnervation par des éléments sensitifs se fait suivant le même principe que celui décrit par les fibres motrices mais elle est relativement plus lente et moins importante.

L'état actuel de nos connaissances en matière de réinnervation et les résultats obtenus par la technique de suture croisée hétérogène décrite par ROUSSEAU (1970) rendaient indispensable la connaissance des caractéristiques ultrastructurales des plaques motrices dans ces différentes conditions ainsi que les incidences de ces conditions expérimentales sur le muscle sternocéphalique. C'est la raison pour laquelle nous avons :

- . réalisé l'étude ultrastructurale de la jonction neuromusculaire normale, précisé son devenir lors de la dégénérescence liée à la section du nerf spinal accessoire et recherché l'aspect des contacts neuromusculaires néoformés après suture croisée hétérogène ;

- . analysé, par le biais de la technique histochimique des ATPases, les variations survenant dans les populations de fibres musculaires du muscle sternocéphalique dans ces mêmes situations.

MATERIEL ET METHODES

Le travail a été effectué sur des lapins de race, d'âge, de sexe et de poids variables. Ces animaux provenaient du Centre Régional de Transfusion Sanguine. Le choix de ce matériel était dicté par le sujet lui-même puisque ce travail s'appuie sur le modèle utilisé par COGET, FALEMPIN et ROUSSEAU (1977 - 1984) dans leurs études sur l'ensemble nerf spinal accessoire-muscle sternocéphalique, d'une part et le nerf vague sensitif, d'autre part.

I - DESCRIPTION DE LA PREPARATION UTILISEE

A) LE MUSCLE STERNOCEPHALIQUE ET SON INNERVATION

Chez le Lapin, le muscle sternocéphalique est un muscle long, fusiforme. Un peu aplati, il s'insère, d'une part, à l'extrémité crâniale du manubrium sternal et d'autre part, au processus mastoïde et à la base du processus jugulaire (Fig. 1). Il ne présente aucune composante claviculaire. Contrairement à ce qui est observé chez l'Homme, il est nettement séparé du muscle cléido-mastoïdien et sa désignation, par certains auteurs, sous le terme de muscle sterno-cléido-mastoïdien est impropre. Situé ventralement à la trachée, qu'il croise obliquement, au niveau de son tiers sternal, le muscle sternocéphalique n'est séparé de la peau que par la mince musculature cutanée du cou, toutefois, son extrémité crâniale est couverte par la glande parotide (Fig. 2). Il est fléchisseur de la tête, et intervient également, au cours d'inspirations forcées en tant que muscle respiratoire accessoire. Son irrigation est assurée par des branches de l'artère carotide commune, alors que son drainage l'est par des veines qui se jettent principalement dans la veine jugulaire externe. L'innervation motrice est principalement assurée par le nerf spinal accessoire (XIème paire de nerfs crâniens), tandis que l'information sensitive transite par un rameau de la branche ventrale de la deuxième paire nerveuse cervicale (BARONE, 1980). D'origine à la fois bulbaire et spinale (Fig. 3), le nerf XI quitte la boîte crânienne par le trou déchiré postérieur, après quoi, il se divise en deux rameaux dont un est ventral par rapport à l'autre. C'est ce dernier qui innerve le muscle sterno-céphalique qu'il rencontre au niveau de la face interne de son extrémité crâniale. Une

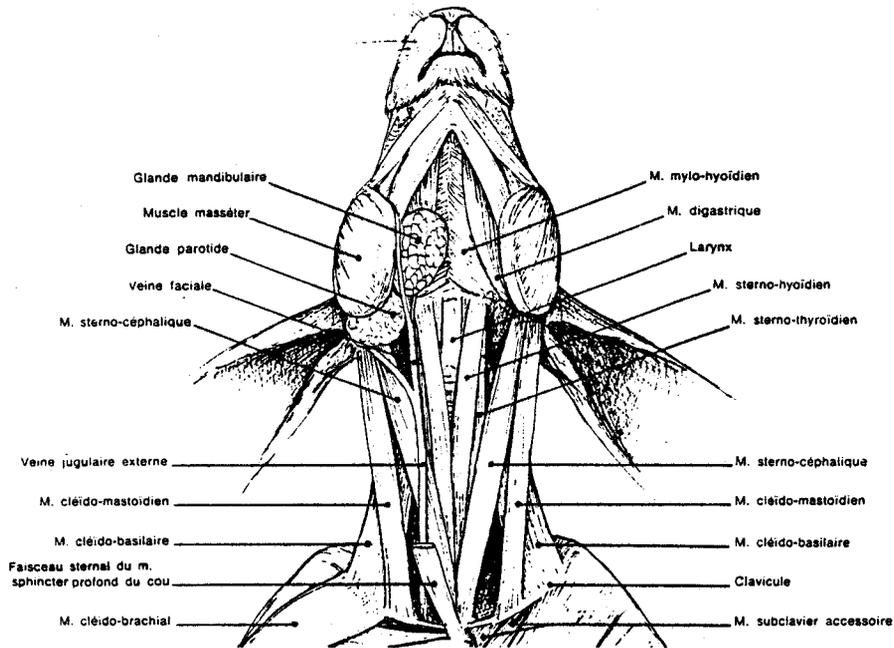


Figure 1 - Muscles ventraux du cou du Lapin.

(d'après BARONE, 1980)

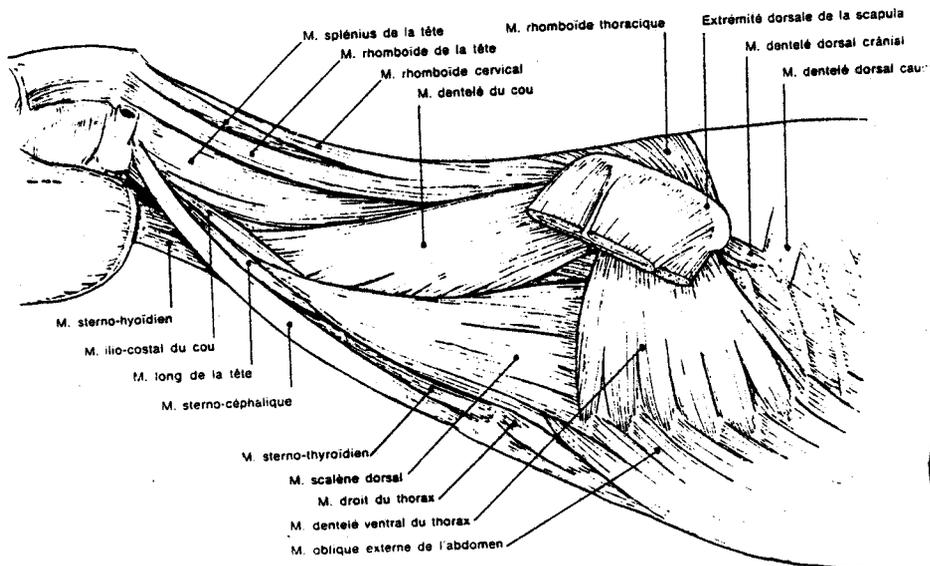


Figure 2 - Vue latérale gauche des muscles du deuxième plan du cou du Lapin.

(d'après BARONE, 1980)

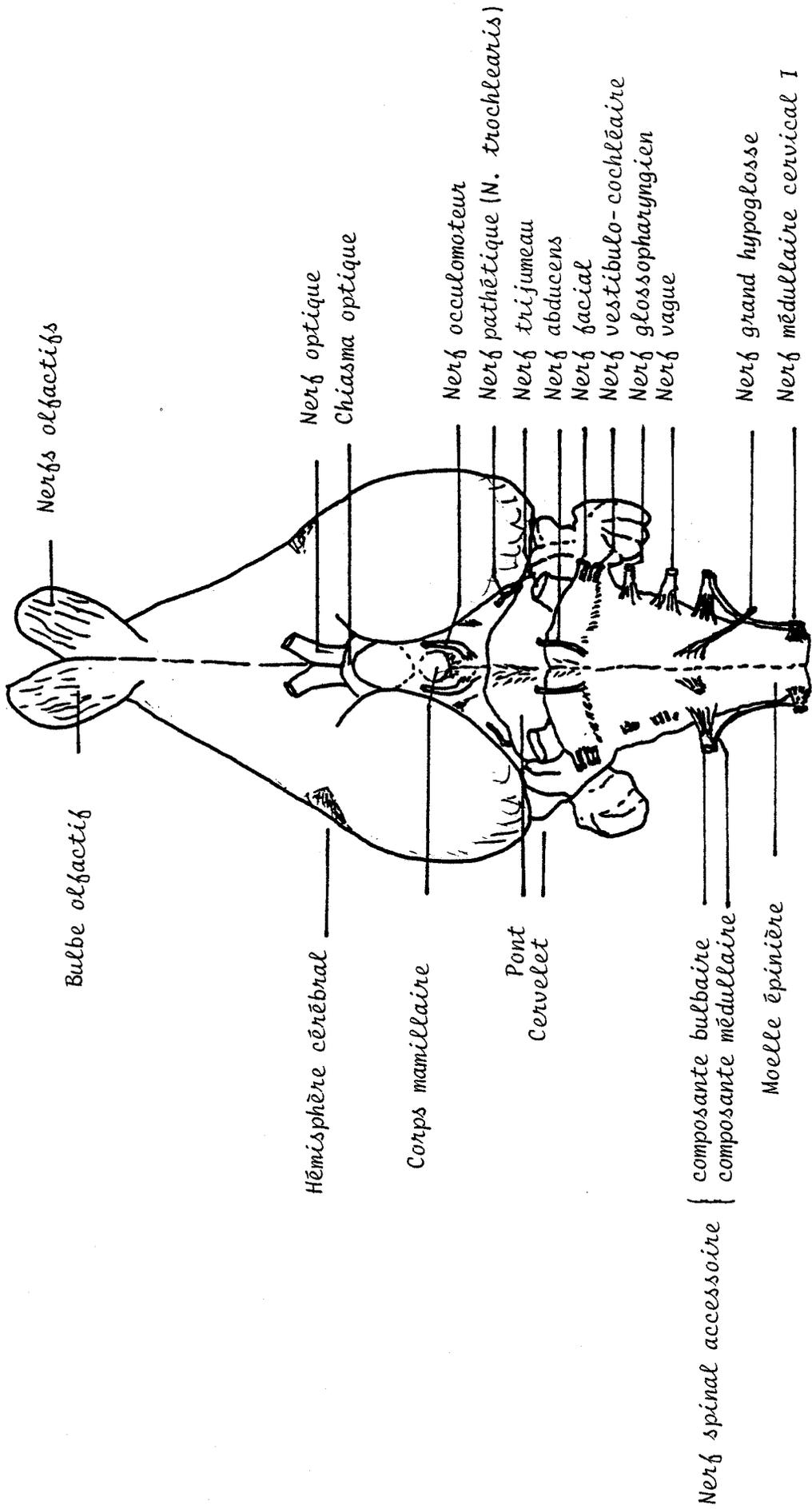


Figure 3 - Vue ventrale de l'encéphale de Lapin
 (d'après BARONE et al, 1973)



innervation secondaire, par les rameaux ventraux des racines médullaires cervicales C₁, C₂, C₃ et C₄ a été décrite, mais il semble que le nombre et l'origine de ces racines varient considérablement d'un animal à l'autre. Ces données anatomiques sont confirmées par des expériences de stimulations électriques du XI et des rameaux ventraux des racines médullaires cervicales.

Les jonctions neuromusculaires établies entre le nerf spinal accessoire et le muscle sternocéphalique à sa surface, ont fait l'objet d'une étude morphométrique (AHIDOUCH, 1985). Les bandes plus ou moins transversales qu'elles forment sont distribuées de façon très aléatoire. Seule, une bande située à proximité du point de pénétration du nerf spinal dans le muscle semble avoir une localisation constante.

B) LE NERF VAGUE

Le nerf vague du Lapin a été peu étudié. C'est à MOHLANT (1913) qu'on doit les premières études anatomiques et histologiques de ce nerf. Appelé aussi nerf pneumogastrique, le nerf vague correspond à la dixième paire de nerfs crâniens. Sa composition, chez le Lapin, est connue par les seuls travaux d'EVANS et MURRAY (1954). L'analyse bibliographique et les dissections successives nous ont permis de dresser le portrait anatomique de ce nerf. Issu du bulbe rachidien par plusieurs racines qui fusionnent dans la boîte crânienne, le nerf vague présente un premier ganglion sensitif, le ganglion jugulaire, d'où part le rameau auriculaire à destination du conduit auditif. Il quitte, ensuite, le crâne par le trou déchiré postérieur.

1) Trajet du vague dans le cou et le thorax (Fig. 4)

Dans son trajet cervical haut, il forme un deuxième ganglion sensitif, le ganglion plexiforme ou ganglion noueux. A ce niveau, le vague émet deux branches, le nerf pharyngo-oesophagien au pôle céphalique du ganglion et le nerf laryngé supérieur au pôle caudal. Etroitement accolé au tronc sympathique, il chemine ensuite le long de la carotide jusqu'à

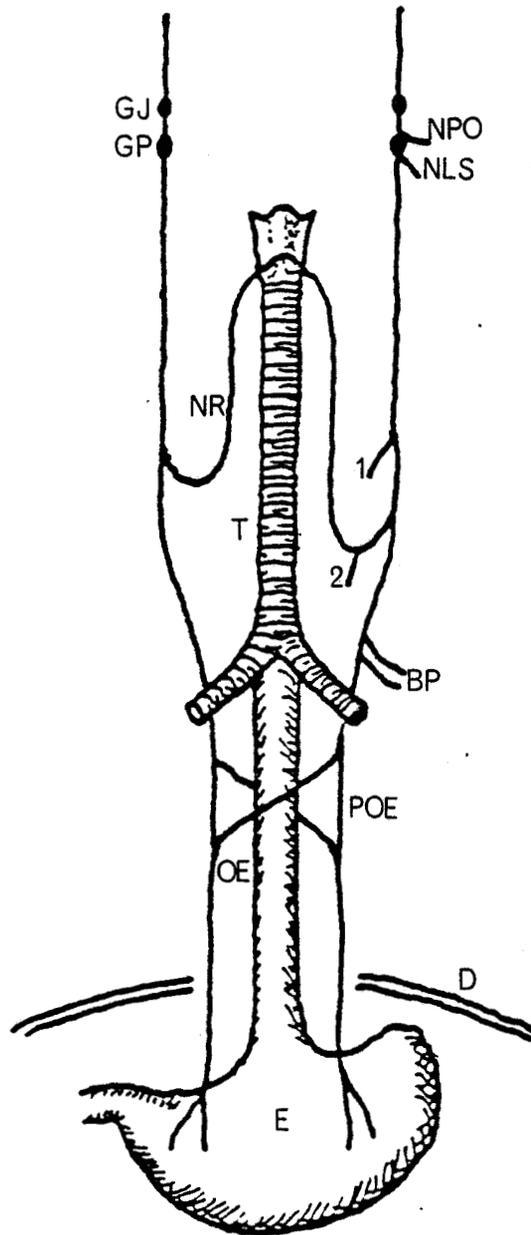


Figure 4 - Trajet du nerf vague chez le Lapin aux niveaux cranial, cervical et thoracique.

BP : branches pulmonaires ; D : diaphragme ; E : estomac ; GJ : ganglion jugulaire ; GP : ganglion plexiforme ; NLS : nerf laryngé supérieur ; NPO : nerf pharyngo-oesophagien ; NR : nerf récurrent ; OE : oesophage ; POE : plexus oesophagien ; T : trachée-artère ; 1 et 2 : branches cardiaques.

(d'après EVANS et MURRAY, 1954)

l'entrée du thorax au niveau duquel il donne naissance au nerf récurrent qui remonte le long de la trachée jusqu'au larynx ainsi qu'à plusieurs rameaux bronchiques et cardiaques. Dans le thorax, les vagues droit et gauche se rejoignent puis très rapidement donnent naissance à deux troncs nerveux qui, par rapport à l'oesophage, se situent l'un dorsalement, l'autre ventralement. Ces troncs franchissent le diaphragme dans cette position et innervent une grande partie des viscères de la cavité abdominale (estomac, intestin grêle etc...).

2) Composition du vague

Le nerf vague est mixte avec une prédominance de fibres amyéliniques et afférentes. En effet, EVANS et MURRAY (1954) rapportent que les fibres afférentes représentent 75 à 80 % des 23 000 fibres d'un nerf vague cervical de Lapin. 88 % de ces fibres afférentes sont amyéliniques. Ces auteurs signalent aussi qu'à leur entrée dans l'abdomen, les troncs vagues contiennent 26 000 fibres dont plus de 90 % sont sensibles. De même, le nerf vague abdominal est constitué essentiellement de fibres amyéliniques puisqu'il ne renferme, au maximum, que 75 fibres myélinisées. CAJAL (1909) localise les corps cellulaires des fibres motrices dans le bulbe rachidien où ils constituent les noyaux dorsal et ambigu et ceux des neurones sensitifs, dans les deux ganglions jugulaire et plexiforme. Ces derniers neurones sont de forme unipolaire et ressemblent à ceux des ganglions rachidiens. Une grande partie des dendrites de ces cellules proviennent de l'oreille externe et gagnent le ganglion jugulaire en cheminant dans le nerf auriculaire. L'essentiel des autres fibres correspond au contingent sensitif des nerfs laryngé et pharyngo-oesophagien (MOHLANT, 1913). Le ganglion comprend environ 35 000 cellules (FOLEY et DUBOIS, 1937) qui innervent principalement le larynx, le coeur, les poumons, l'oesophage et l'estomac. La somatotopie de ce ganglion, chez le Lapin, a été précisée par MOHLANT (1913), grâce à l'emploi de techniques histologiques couplées à des expériences de dégénérescence rétrograde.

Enfin, GRZYBOWSKI (1936) rappelle l'existence, chez le Lapin, de connectifs vago-sympathiques sur le trajet cervical de ces nerfs. COGET (1980) en signale également la présence, bien qu'irrégulière

selon les animaux, entre le ganglion stellaire et le nerf vague.

II - METHODES

A) TECHNIQUE OPERATOIRE

1) Préparation des animaux

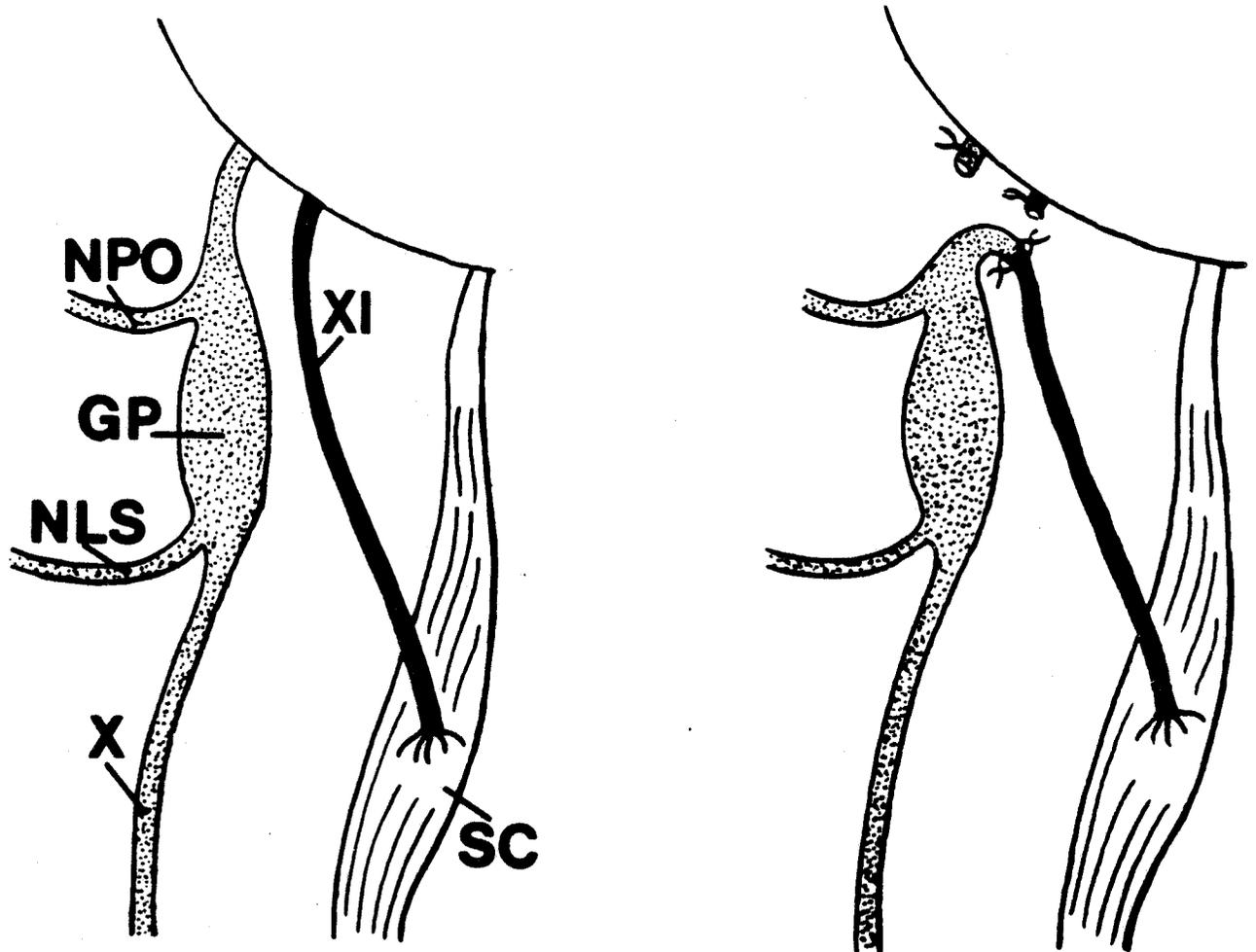
Les animaux sont anesthésiés par injection intraveineuse, dans la veine marginale de l'oreille, d'une solution de pentobarbital sodique (CLIN-MIDY) à raison de 20 mg/kg. Le soluté injectable à 6 % était préalablement dilué de moitié dans du liquide physiologique. Un cathéter, maintenu dans la veine, permet l'administration complémentaire d'anesthésique lorsque cela est nécessaire. Les animaux sont ensuite maintenus en décubitus dorsal sur une table à contention. Après rasage et aseptie par de l'alcool iodé de la face ventrale du cou, la peau est incisée le long de la gouttière jugulaire. Les nerfs vague et spinal sont finement disséqués jusqu'à leur émergence de la boîte crânienne, au niveau du trou déchiré postérieur.

2) Suture nerveuse croisée hétérogène (Fig. 5)

Avant section des deux nerfs, une ligature et un clip d'argent sont posés sur chacun d'eux à son point d'émergence de la boîte crânienne. Après quoi, les nerfs sont sectionnés juste en aval de ces clips. Les extrémités périphériques des nerfs vague et spinal sont rapprochées, puis les deux épînèvres sont suturées sous loupe binoculaire par points séparés à l'aide de cardiocrin. La plaie est ensuite refermée, le champ opératoire est saupoudré d'exoseptoplix, et le cou de l'animal est enveloppé par un bandage stérile protecteur.

B) TECHNIQUE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

Lors du contrôle de la réinnervation, les animaux sont une nouvelle fois anesthésiés et maintenus en décubitus dorsal sur une table.



BU
LILLE

Figure 5 - Suture croisée hétérogène nerf vague sensitif-nerf spinal accessoire chez le Lapin.

A gauche : situation avant suture
A droite : situation après suture

GP : ganglion plexiforme ; NLS : nerf laryngé supérieur ; NPO : nerf pharyngo-oesophagien ; SC : muscle sternocéphalique ; X : nerf vague ; XI : nerf spinal accessoire.

Le muscle sternocéphalique est mis à nu et le nerf vague périphérique est ensuite finement disséqué jusqu'à son entrée dans le thorax.

1) Mise en place des électrodes (Fig. 6)

a - Les électrodes de stimulation

La stimulation du nerf est assurée par une électrode bipolaire constituée de deux fines barres d'argent en forme de crochets permettant la suspension du nerf. La distance entre les deux pôles est de 2 à 3 mm. Ces électrodes sont reliées à un générateur de courant constant muni d'un système qui lui assure une sortie isolée de la masse. Les éventuelles diffusions de courant sont évitées par :

- le choix d'une électrode bipolaire aux pôles séparés par une faible distance ;
- la suspension du nerf vague lors des stimulations ;
- l'utilisation d'un stimulateur dont la sortie est isolée de la masse ;
- l'isolement de la préparation des régions avoisinantes par de l'huile de paraffine.

b - Les électrodes de réception

Notre système de réception est formé de deux électrodes montées en différentiel l'une par rapport à l'autre. La première en argent, de forme courbe, est placée sous le nerf vague. La seconde microélectrode remplie de solution conductrice gélosée, est destinée à l'exploration du muscle.

Ce système présente beaucoup d'avantages. L'utilisation de la microélectrode permet de recueillir l'activité d'un très petit nombre d'unités motrices. Le montage des électrodes de réception en différentiel nous permet d'enregistrer préférentiellement l'activité des fibres nerveuses en relation avec les fibres musculaires qu'elles réinnervent.

Enfin, l'utilisation d'une microélectrode est intéressante par le fait qu'elle ne lèse pas la préparation qui, après avoir été contrôlée, est destinée à l'histochimie et à la microscopie électronique.

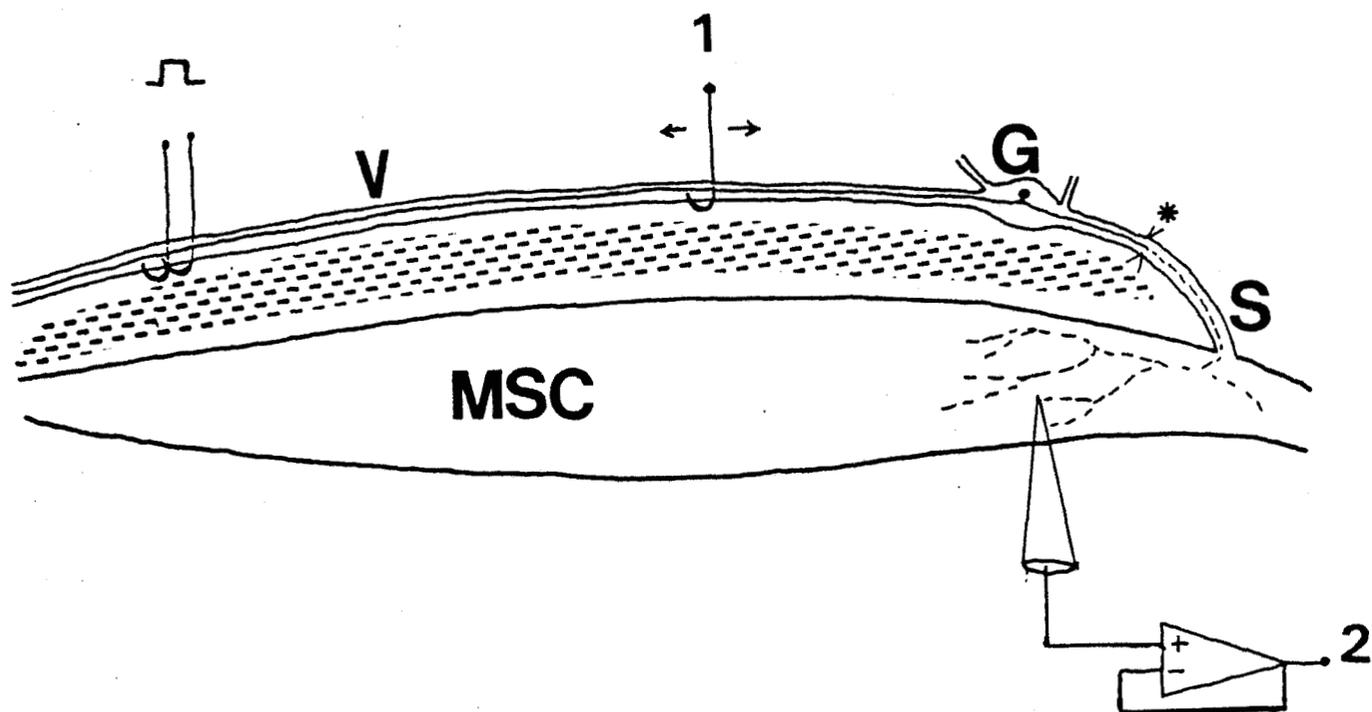


Figure 6 - Principe du contrôle électrophysiologique de la réinnervation.
Le système est constitué d'une électrode de stimulation bipolaire reliée à un générateur de courant constant (\square) et de deux électrodes de réception :

- La première (1), en forme de crochet, peut se déplacer le long du nerf (flèches) et permet, avec l'électrode de stimulation, la suspension de la préparation ;
- La deuxième (2) est une microélectrode reliée à un adaptateur d'impédance, qui permet l'exploration du muscle.

Les deux électrodes de réception sont montées en différentiel, l'une par rapport à l'autre. 1 et 2 sont reliées à l'entrée différentielle de l'oscilloscope.

G : ganglion plexiforme ; MSC : muscle sternocéphalique ; S : nerf spinal réinnervé ; V : nerf vague réinnervant ; * : emplacement de la suture ; \dots : huile de paraffine.

C) TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

1) Généralités

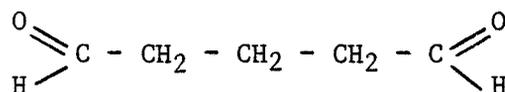
L'observation en microscopie électronique se fait dans des conditions de vide telles que l'examen d'échantillons vivants est impossible. Mais la mort des cellules s'accompagne d'une modification des édifices biomoléculaires qui se traduit par l'apparition d'artéfacts susceptibles de donner une idée fautive de l'organisation réelle des structures *in vivo*. Il est donc nécessaire que les échantillons destinés à la microscopie électronique soient traités de façon à stabiliser l'architecture biologique et à la maintenir dans un état aussi proche que possible de celui qui est le sien dans le tissu vivant, d'où l'importance de la fixation. Cette fixation bloque les réactions enzymatiques, insolubilise les protéines et stabilise les lipides. Le pouvoir de résolution du microscope électronique exige l'élaboration de coupes ultrafines de 60 à 90 nm d'épaisseur. L'obtention de telles coupes demande, en plus d'un appareillage performant, un traitement particulier des échantillons avant la microtomisation. La technique d'inclusion assure l'enrobage des tissus à étudier dans un milieu permettant d'obtenir les épaisseurs de coupes souhaitées. Enfin, l'observation des coupes exige qu'un contraste des structures soit réalisé. Les produits contrastants utilisés en microscopie électronique contiennent des ions lourds qui se lient sélectivement à des molécules biologiques au niveau de différentes structures cellulaires et réalisent le contraste permettant ainsi une meilleure analyse des coupes.

2) Fixation

Dans nos expériences, nous avons fait appel à deux fixateurs, le glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium.

a - Les fixateurs

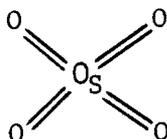
α) *Le glutaraldéhyde*



Le glutaraldéhyde est un dialdéhyde stable à basse température dont le pH est voisin de 3. Cette acidité provient de la transformation en présence d'oxygène, des fonctions aldéhydiques de la molécule, en fonctions acides. Commercialisé à 25 ou 50 %, il est conseillé soit de le distiller, soit de le traiter au carbone actif afin d'éliminer ces acides et les impuretés éventuelles.

Comme la plupart des fixateurs aldéhydiques, il pénètre rapidement les tissus et assure une fixation rapide. Par ces deux fonctions aldéhydiques, le glutaraldéhyde établit des liaisons entre les molécules de protéines, ce qui les rend insolubles. Il fixe aussi le glycogène. Par contre, c'est un mauvais fixateur des lipides qui, non fixés, subissent une forte extraction lors de l'étape de déshydratation par les alcools. Cette extraction se traduit par des artéfacts du type plissement de membranes ou enroulement concentrique de celles-ci, rappelant les gaines de myéline. En conséquence, la seule fixation glutaraldéhydique est insuffisante et une postfixation assurant la stabilité des lipides est nécessaire. C'est le tétroxyde d'osmium qui est alors utilisé.

β) Le tétroxyde d'osmium



Appelé improprement acide osmique, le tétroxyde d'osmium est un fixateur puissant malgré son pouvoir de pénétration des tissus relativement faible. Il agit en établissant des liaisons avec les acides aminés à noyau aromatique et les acides gras non saturés. C'est ainsi qu'il fixe les lipides et termine la fixation entamée par le glutaraldéhyde lors d'une double fixation.

b - Facteurs importants

Les solutions fixatrices doivent respecter les caractéristiques physiologiques de pH et d'osmolarité de l'échantillon.

α) pH

Le traitement d'un matériel biologique dont le pH est le plus souvent neutre voire légèrement alcalin, par un fixateur acide tel le glutaraldéhyde, risque d'entraîner la formation d'artéfacts. C'est ainsi que les solutions fixatrices ont un pH voisin de celui des tissus traités. Ce pH est maintenu constant grâce à la présence, dans la solution, d'un système tampon. Les systèmes tampons les plus utilisés sont les phosphates. Notre solution tampon est un mélange de phosphates mono- et disodique.

β) Osmolarité

Les organites cellulaires sont comparables à des osmomètres. Les pressions osmotiques de l'échantillon et de la solution fixatrice doivent être les mêmes, faute de quoi, des mouvements d'eau obéissant aux lois de l'osmose s'établiront d'un compartiment vers l'autre. Les anomalies résultantes comportent soit un gonflement, voire même un éclatement des structures (mitochondries, vésicules...) si la solution fixatrice est relativement hypotonique, soit une rétraction cellulaire qui se traduit le plus souvent par un écrasement des matrices mitochondriales et par un tassement du réticulum endoplasmique et des appareils de Golgi si la solution fixatrice est, au contraire, relativement hypertonique. Une connaissance de l'osmolarité du milieu intérieur de l'échantillon est essentielle. Chez les Vertébrés, elle est de l'ordre de 300 à 310 m.osmoles, ce qui correspond pour le glutaraldéhyde à une concentration de 2,5 % dans un tampon phosphate Soerensen 0,1 M à pH 7,20 à 7,30. C'est une solution fixatrice qui a été utilisée dans notre travail.

c - Technique de fixation de la préparation

a) *Fixation aldéhydique*

Les animaux sont préanesthésiés, puis anesthésiés comme cela a été décrit précédemment. Les muscles sternocéphaliques sont dégagés. Leur longueur est mesurée *in vivo*. Leur prélèvement est effectué en sectionnant les tendons le plus près possible de leur insertion sur l'os, après avoir repéré l'arrivée du nerf spinal accessoire. Les muscles sont épinglés sur une plaque de liège de telle sorte qu'ils retrouvent la longueur qui est la leur *in vivo*. Après quoi, ils sont fixés par immersion dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon phosphate Soerensen 0,1 M pH 7,2 pendant une nuit.

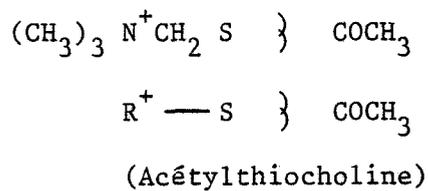
b) *Révélation des acetylcholinesterases*

* Généralités

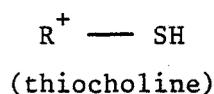
Son principe est basé sur l'hydrolyse, par l'enzyme, d'un substrat capable d'être ensuite transformé en un produit visualisable. Les différents protocoles expérimentaux dérivent de trois principales techniques d'étude des cholinesterases décrites par KOELLE et FRIEDENWALD (1949) ; CREVIER et BELANGER (1955) et KARNOVSKY et ROOTS (1964). Nous avons utilisé la technique de KOELLE et FRIEDENWALD.

L'addition au milieu d'incubation de l'iso-OMPA (Tetraisopropylpyrophosphoramide ; KOCH - Light Laboratories Ltd), qui a la caractéristique d'inhiber les pseudocholinesterases, permet la visualisation des seules acetylcholinesterases au niveau de l'appareil sous-neural de COUTEAUX. Dans cette technique, l'iodure d'acétylthiocholine est utilisé comme substrat de l'enzyme. La thiocholine libérée par l'hydrolyse enzymatique est piégée dans un complexe thiocholine-cuivre pour former un précipité blanc. La visualisation du précipité est ensuite améliorée par obtention d'un précipité noir de sulfure de cuivre. D'après TSUJI (1974), les étapes de la réaction sont les suivantes :

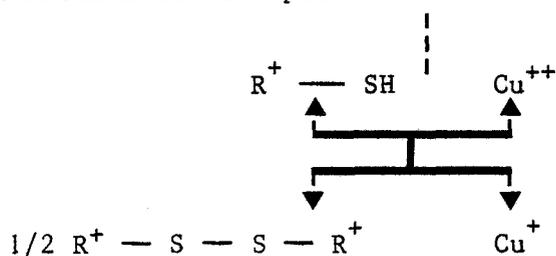
REACTION DE KOELLE



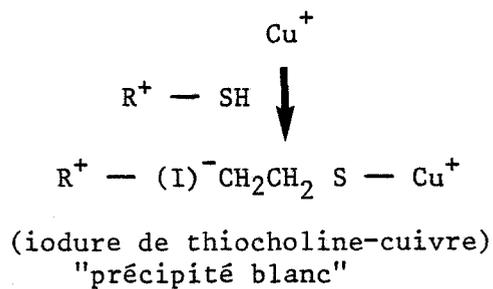
hydrolyse enzymatique



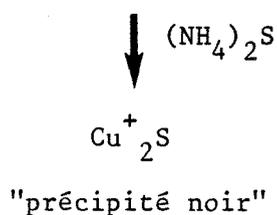
- 1ère étape : Réduction du Cu^{++} par $\text{R} \text{—SH}$ en Cu^+



- 2ème étape : Formation d'un complexe thiocholine-cuivre avec Cu^+ et $\text{R}^+ \text{—SH}$



- 3ème étape : Transformation de l'iodure du complexe cuivre-thiocholine en précipité noir par $(\text{NH}_4)_2\text{S}$



* Protocole expérimental

Après la fixation aldéhydique, les muscles sont débarrassés de l'essentiel de leur tissu conjonctif externe sous loupe binoculaire et immergés, pendant 5 minutes, dans le milieu d'incubation de KOELLE à 37° C. Ils sont ensuite égouttés sur papier filtre. Les sites de la réaction sont repérés grâce au dépôt blanc du complexe iodure (thiocholine - cuivre).

Dans ces conditions, la localisation des acetylcholinesterases est très mauvaise mais elle est suffisante pour permettre le repérage des plaques motrices. Par contre, la durée réduite de l'incubation assure une préservation correcte des structures.

γ) Postfixation

Les échantillons sont effectués sous loupe binoculaire, au niveau des zones de révélation caractérisées par le précipité blanc. Les échantillons sont rincés dans une solution de lavage tamponnée (Saccharose - Soerensen pH : 7,2) puis subissent une postfixation au tétroxyde d'osmium à 1 % en tampon phosphate Soerensen pendant une heure (3 x 20 min.). Les échantillons ainsi fixés sont alors prêts pour la déshydratation.

3) Déshydratation

Etape intermédiaire entre la fixation et l'inclusion, la déshydratation rend les tissus compatibles avec le milieu d'inclusion en assurant l'extraction de l'eau des échantillons. Elle est basée sur une substitution progressive de l'eau par l'alcool éthylique, puis de celui-ci par un solvant du milieu d'inclusion, le propylène oxyde.

Les échantillons issus de la postfixation sont mis dans des bains d'alcool éthylique de concentrations croissantes (30°, 50°, 70°, 80° et 90°) pendant cinq minutes chacun, puis dans l'alcool absolu pendant une heure (3 x 20 min.). Cette étape de déshydratation se termine par une immersion d'une heure (3 x 20 min.) des blocs de tissu dans du propylène oxyde.

4) Inclusion

L'inclusion consiste en une imprégnation et un enrobage des échantillons dans un milieu dont la dureté après polymérisation permet la réalisation de coupes compatibles avec le pouvoir de résolution du microscope électronique. Le principe est d'infiltrer les tissus par des monomères fluides qui, en se polymérisant à température élevée ($\approx 56^{\circ}\text{C}$), aboutissent à la formation d'un édifice consistant. La technique décrite par LUFT (1961) consiste à réaliser un mélange comprenant une résine époxy fluide : l'épon 812 (diépoxyde) et deux produits durcisseurs : le dodecanyl succinic anhydride (DDSA) et le methylnadic anhydride (MNA). Ces deux produits, dont la proportion détermine la dureté finale de l'édifice, réagissent avec l'épon 812 en présence d'une amine tertiaire qui catalyse la polymérisation : le Tris-dimethylaminomethy L phenol (DMP 30).

Avant d'être inclus définitivement, les échantillons issus de la déshydratation sont immergés pendant une heure dans un mélange équivolumique de propylène oxyde/milieu d'inclusion qui, par sa viscosité modérée, permet une infiltration progressive de l'échantillon par les résines. L'inclusion définitive s'effectue en deux temps :

- . Dans le milieu d'inclusion à température ambiante pendant une nuit ;
- . Dans le milieu d'inclusion versé dans les logettes d'un moule de silicone (LADD, Res., Ind. Burlington, Vermont), à température ambiante pendant une heure, puis dans l'étuve à 56°C . L'utilisation d'un tel moule permet une orientation correcte des échantillons, orientation très utile lors de la réalisation de coupes de tissu dans des plans bien définis. La polymérisation complète demande deux à trois jours.

5) Microtomie

Pour effectuer des coupes, il faut dégager l'échantillon. Le bloc ainsi préparé est placé dans le porte-objet sur l'ultramicrotome REICHERT OMU 3. A l'aide d'un couteau de verre muni d'un réservoir d'eau, on réalise tout d'abord des coupes semi-fines. Après coloration au bleu d'Azur, elles sont examinées au microscope optique afin de repérer les structures souhaitées.

Les coupes ultrafines, de 60 à 90 nm d'épaisseur, sont effectuées au couteau de diamant et récupérées à la surface de l'eau contenue dans le réservoir du couteau. L'épaisseur de coupes est appréciée par les couleurs d'interférence (ZELANDER et EKHOLM, 1960). La teinte ivoire correspond à l'épaisseur idéale. Les coupes, flottant à la surface de l'eau, sont prélevées sur des grilles HR 24 200 mesh Cu/Rh 3 mm et laissées à sécher à l'air, à l'abri de la poussière. Ensuite, elles sont conservées dans un boîtier de rangement LKB en attendant leur "coloration".

6) Contraste

En microscopie électronique, la formation et le contraste des images dépend de la diffusion des électrons. Les atomes de métaux lourds, en se fixant sur des structures membranaires, stoppent les électrons et assurent le contraste des images. Les métaux lourds sont utilisés lors du traitement des échantillons soit pendant la fixation (OsO_4), soit lors de la coloration (Plomb, Uranyl).

Les coupes sont contrastées par une double "coloration" d'acétate d'uranyl et de citrate de plomb. Cette technique a été décrite, pour la première fois, par HUXLEY et ZUBAY (1961). Elle est très efficace après une double fixation faisant intervenir successivement le glutaraldéhyde puis le tétr oxyde d'osmium.

a - Acétate d'uranyl (WATSON, 1958)

L'uranium est l'atome le plus lourd utilisé en "coloration" pour la microscopie électronique. Le mécanisme de "coloration" par les sels d'uranyl est inconnu (VRENSEN et al, 1981). Il semble que les ions uranium forment des complexes avec les groupes phosphoryls et carboxyls des membranes. L'intensité de la coloration dépend du pH de la solution, du type de tampon utilisé, du temps de "coloration" et de la concentration des ions uranium. Les structures riches en ADN sont préférentiellement colorées à de basses concentrations et pH 3,5. L'augmentation de la concentration ou la diminution du pH de ces solutions aboutit à la coloration intense des protéines. Ces solutions semblent avoir des propriétés fixatrices.

Les coupes sont colorées par flottaison, à l'obscurité, sur une solution d'acétate d'uranyl à 1 % dans l'eau bidistillée pendant 20 min. Les grilles sont ensuite rincées dans quatre bains d'eau bidistillée et mises à sécher, coupes au-dessus, sur papier filtre WHATMAN. L'acétate d'uranyl joue le rôle de mordenceur pour le colorant suivant.

b - Citrate de plomb (REYNOLDS, 1963)

Les solutions de plomb utilisées en microscopie électronique présentent une grande affinité pour la majorité des constituants cellulaires. Cependant, elles ont une spécificité pour le glycogène, les nucléoprotéines et les membranes. Préparé dans des solutions fortement basiques (pH 11-12), le plomb semble y être présent sous forme de complexe d'ions de charge positive. Ces cations réagissent avec les charges négatives des groupes de protéines et d'hydrates de carbone. Il réagit aussi avec l'osmium introduit pendant la fixation. Il en résulte une "coloration" intense des membranes. Une autre théorie précise que ce sont les complexes anioniques des sels de plomb qui sont responsables de la "coloration" (VRENSEN et al, 1981). Les solutions de plomb sont très variées. Elles sont toutes sensibles au gaz carbonique (CO₂) qui, réagissant avec les ions Pb⁺⁺ donnent un corps insoluble : le carbonate de plomb, à l'origine de dépôts opaques caractéristiques d'une contamination. Le citrate de plomb introduit par REYNOLDS (1963) est sensé être moins sensible au CO₂ et, par conséquent, c'est cette solution qui est recommandée pour la microscopie électronique. Le contraste des coupes est effectué dans des boîtes de Pétri, à l'obscurité, en présence de pastilles de soude destinées à absorber le CO₂, par flottaison sur des gouttes de la solution de REYNOLDS, pendant 20 min. Les grilles sont ensuite rincées dans quatre bains d'eau bidistillée et laissées à sécher, coupes au-dessus, sur papier filtre WHATMAN. Elles sont rangées dans un boîtier LKB en attendant l'observation.

7) Observation au microscope électronique

L'examen des coupes ainsi préparées se fait à l'aide d'un microscope JEOL (CX 100) à un voltage d'accélération de 80 KV.

D) TECHNIQUE HISTOCHIMIQUE DES ATPases

1) Généralités

RANVIER, dès 1874, montra que les muscles striés squelettiques n'avaient pas une structure homogène et qu'il était possible de distinguer des muscles constitués de fibres rouges et blanches indépendamment de leur degré de vascularisation, cette différence étant due également à des propriétés intrinsèques aux fibres musculaires.

Pour analyser, histochimiquement, la composition des muscles en différents types de fibres, il existe plusieurs techniques qui reposent toutes sur une activité enzymatique supposée être répartie de façon uniforme sur toute la longueur d'une fibre (FARDEAU, 1973).

Pour notre part, nous avons utilisé la technique de BROOK et KAISER (1970) basée sur l'activité ATPasique. Elle se fait en trois étapes :

- *La préincubation* s'effectue en milieu acide et permet, selon le pH, l'inhibition de l'activité ATPasique de tel ou tel type de fibres musculaires. C'est ainsi qu'une double préincubation, de 10 minutes chacune, aux pH respectifs de 4,35 et 4,63, permet une bonne distinction des trois types de fibres existant dans le muscle sterno-céphalique.

- *L'incubation* se fait à 37°C dans un milieu additionné d'ATP dont le pH de 9,4 (pH d'activité optimale) est maintenu grâce au véronal sodique. La réaction primaire libère des ions phosphates qui se combinent aux ions calcium présents dans le milieu d'incubation sous forme de chlorure de calcium. Il en résulte un dépôt de phosphate de calcium, insoluble en milieu alcalin, qui marque le lieu de l'activité enzymatique.

- *La coloration* de ce dépôt s'effectue en deux temps. Elle consiste en une transformation du phosphate de calcium en phosphate de cobalt puis en sulfure de cobalt (précipité noir).

2) Protocole expérimental

Le muscle est prélevé très rapidement sur les animaux anesthésiés et des bandes d'environ 5 mm y sont découpées transversalement. Ces échantillons sont inclus dans un milieu d'enrobage coulé dans des godets en papier aluminium. Ils sont orientés de telle sorte qu'ils permettent l'obtention de coupes transversales, avant d'être congelés dans l'isopentane refroidi à -160°C par de l'azote liquide. Les échantillons ainsi congelés peuvent être conservés à -70°C pendant plusieurs jours. Des coupes de 10 μm d'épaisseur sont effectuées à -20°C au cryostat. Elles sont récupérées sur des lames gélatinées puis laissées à sécher à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures. Les coupes sont ensuite traitées suivant le protocole suivant :

a - Préincubations

- 10 minutes à pH 4,35 dans un milieu comprenant 6,5 ml d'acide acétique à 0,2 M et 3,5 ml d'acétate de sodium à 0,2 M.

- 10 minutes à pH 4,63 dans une solution constituée de 5 ml d'acide acétique à 0,2 M et de 5 ml d'acétate de sodium à 0,2 M.

- Rinçage dans trois bains d'eau bidistillée d'une minute chacun.

b - Incubation pendant 40 minutes à 37°C dans le milieu suivant :

2 ml de véronal sodique à 0,1 M

1 ml de chlorure de calcium à 0,18 M

7 ml d'eau bidistillée

15 mg d'ATP

- Rinçage dans trois bains d'eau bidistillée d'une minute chacun.

c - Coloration

- Transformation du phosphate de calcium en phosphate de cobalt par une solution aqueuse de chlorure de cobalt à 2 % pendant trois minutes.

- Rinçage dans trois bains d'eau bidistillée d'une minute chacun.

- Transformation du phosphate de cobalt en sulfure de cobalt par une solution diluée de sulfure d'ammonium (un volume de sulfure d'ammonium pour quatre volumes d'eau bidistillée) pendant trente secondes.

- Rinçage dans trois bains d'eau bidistillée d'une minute chacun.

d - Déshydratation

- Dans une série d'alcools : 15 minutes à 70 %, 15 minutes à 95 % et deux fois 20 minutes dans de l'alcool absolu.
- Deux fois 20 minutes dans du xylène.

Les coupes ainsi déshydratées sont montées au baume de Canada sous lamelles couvre-objet puis observées au microscope optique. Elles sont ensuite analysées grâce à un analyseur d'images du type QUANTIMET 720 (Fig. 7).

E) TECHNIQUE DE L'ANALYSE D'IMAGES

L'analyse d'image est une technique qui consiste à extraire, d'une manière quantitative, tout ou partie des informations qui constituent cette image. Elle repose sur le principe de mensuration, sur coupe, d'un élément de l'image microscopique (diamètre, surface, nombre de particules etc...).

1) Organisation générale de l'analyse d'images

La lame à étudier est placée sur le microscope orthoplan LEITZ, éclairée par une source lumineuse stabilisée (lampe à halogène). Un champ d'observation est choisi, qui présente peu d'artéfacts histologiques, mais aussi peu de zones conjonctives entre les fibres (endo- et périnysium). Une image optique dont la qualité est contrôlée par des filtres intercalés sous le condenseur, est conduite vers la caméra électronique PLUMBICON.

La partie du champ analysée est restituée sur l'écran de contrôle de l'analyseur électronique d'image, donnant naissance à une nouvelle image optique dont la définition est supérieure à 630 000 points images (p.i. = pixel) répartis sur 704 lignes de balayage horizontales de 896 p.i. chacune. Une marge périphérique circonscrit un champ de travail rectangulaire de 625 lignes x 800 p.i. : fenêtre standard de 500 000 p.i. Un module annexe permet de sélectionner une fenêtre de travail de 300 000 p.i. ($1 \text{ p.i.} = 0,29 \mu\text{m}^2$), soit une surface d'observation de 1 200 000 p.i. ($348 000 \mu\text{m}^2$) pour chaque muscle, et selon chaque préparation de l'animal (mesure de quatre champs microscopiques minimum, pris au hasard, avec au

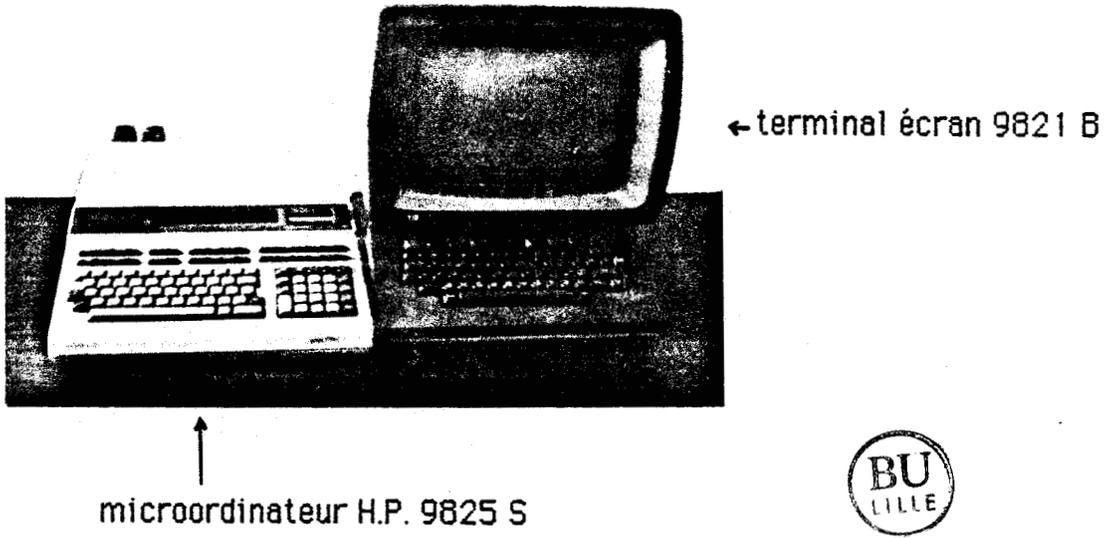
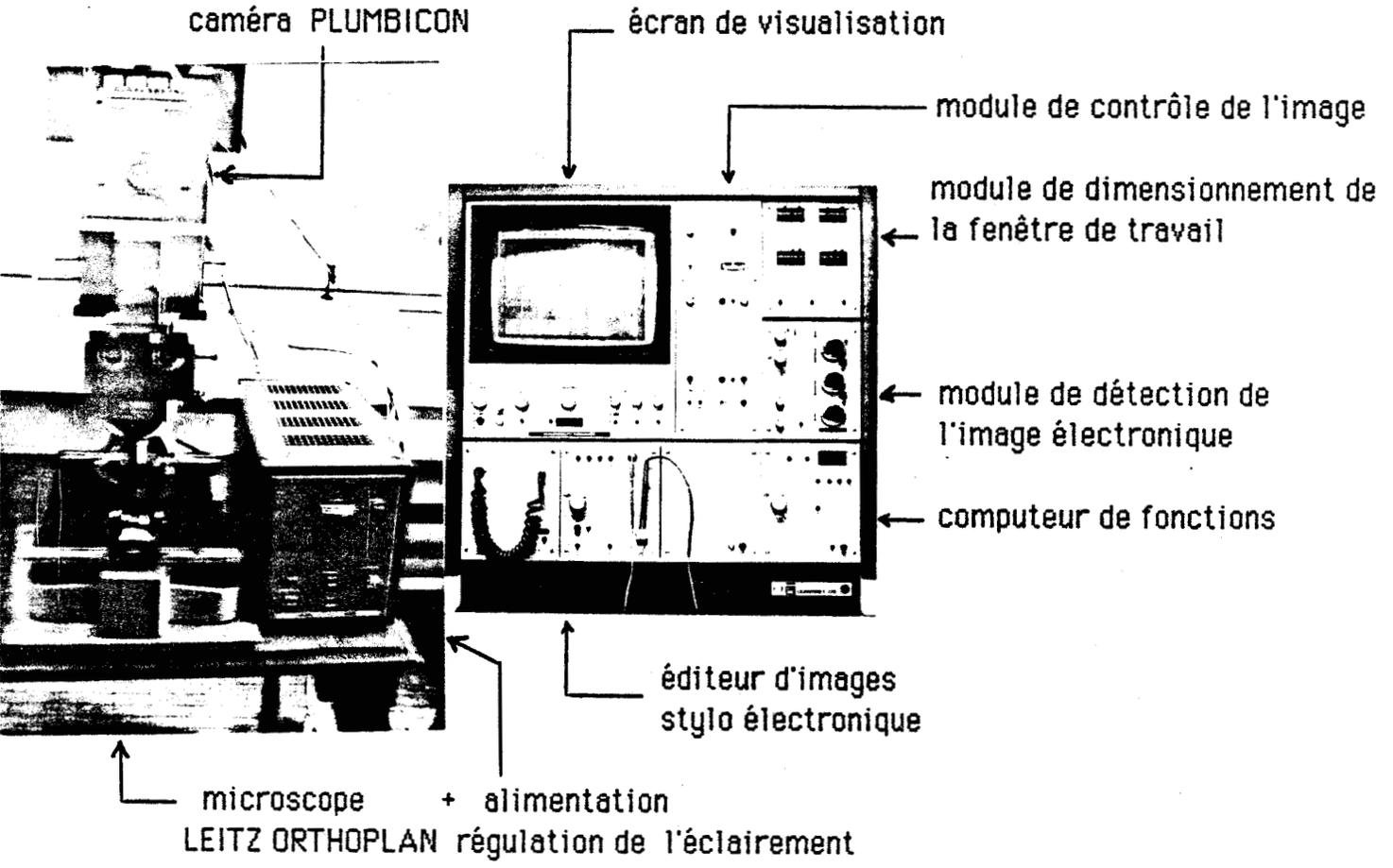


Figure 7 - **QUANTIMET 720**

total environ une centaine de fibres de chaque type). Différents réglages permettent de modifier la brillance de l'image optique, ainsi que son contraste.

L'image optique est exploitée totalement en 0,9 seconde par un spot se déplaçant de gauche à droite sur les lignes de balayage.

Ce balayage engendre un signal vidéo dont l'amplitude, en chaque point, est d'autant plus grande que la quantité de lumière reçue par le tube de la caméra en ce point est importante.

L'image optique est modifiée par l'utilisation du stylo électronique à fonctions multiples. Ainsi, chaque fibre peut être tracée, remplie, avec une correction par coupage si nécessaire. La valeur observée (surface de la fibre en p.i.) est dérivée vers un ordinateur.

Le principe de comptage (Fig. 8) est le suivant : dans la fenêtre de travail, toutes les fibres totalement incluses sont prises en compte ainsi que les fibres qui coupent les marges supérieures et droites. Celles qui coupent les marges inférieures et gauches sont exclues, ceci afin de minimiser les erreurs liées à une éventuelle double lecture.

Le traitement statistique instantané des données est rendu possible grâce au couplage du QUANTIMET avec un ordinateur HEWLETT-PACKARD (H.P. 9825T).

Notre étude a été réalisée sur dix-sept lapins dont la répartition en fonction des conditions expérimentales est la suivante :

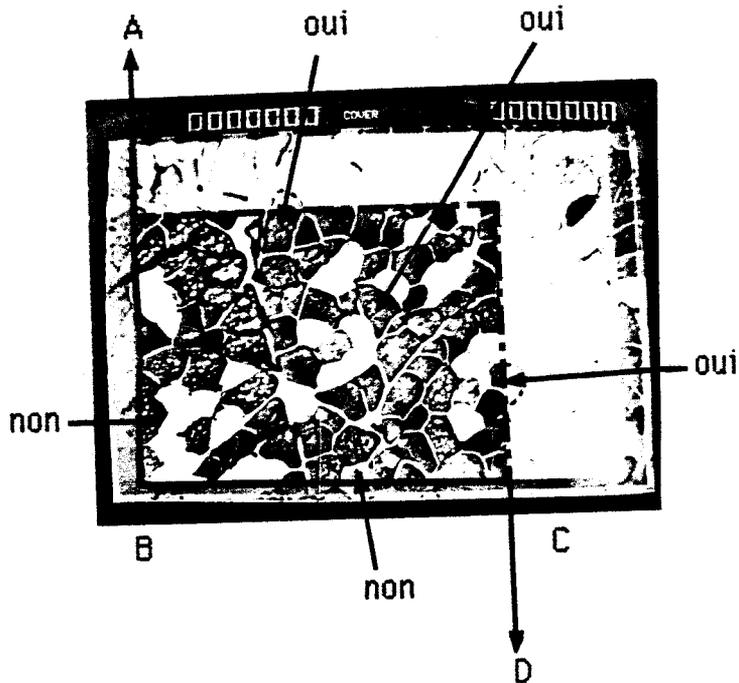


Figure 8 - Principe de mesure au Quantimet 720 : délimitation de la fenêtre de travail "600 x 500 pi".

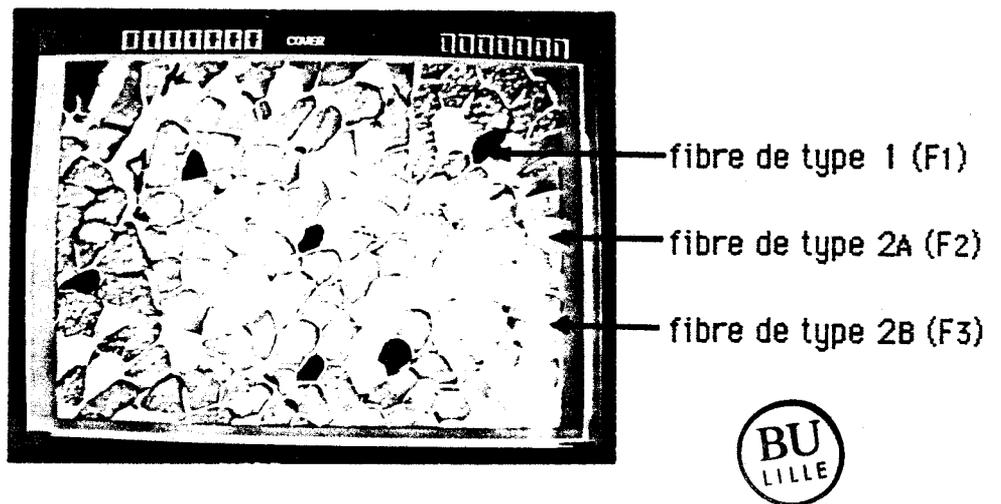


Figure 9 - Différents types de fibres musculaires du muscle sternocéphalique.

| STADES EXPERIMENTAUX | NOMBRE D'ANIMAUX |
|----------------------|------------------|
| - Témoins | 4 |
| - Dénervation | |
| + 3 jours après | 1 |
| + 5 jours après | 1 |
| + 10 jours après | 1 |
| + 15 jours après | 1 |
| + 30 jours après | 1 |
| + 60 jours après | 1 |
| - Suture | |
| + 15 jours après | 1 |
| + 30 jours après | 1 |
| + 45 jours après | 1 |
| + 90 jours après | 2 |
| + 270 jours après | 2 |

Cette étude porte sur les trois types de fibres mises en évidence par la technique histochimique (Fig. 9) :

- * Fibres de type I (F1), pauvres en ATPase et colorées en noir par la technique des ATPases inversées à pH acide ;
- * Fibres de type II_A (F2), riches en ATPase, les plus claires ;
- * Fibres intermédiaires II_B, appelées F3 pour des raisons de facilité dans les exposés.

2) Paramètres mesurés

Deux programmes de mesure permettent d'obtenir 15 paramètres de taille et 13 paramètres de distribution spatiale des fibres musculaires. Dans notre étude, nous n'en avons retenu que trois des premiers et un des seconds.

a - Paramètres de taille

Pour chaque type de fibres 1(I), 2 (= IIA) et 3 (= IIB), chaque section est tracée individuellement sur l'analyseur grâce au stylo électronique, et la surface est mesurée (Fig. 10). Cette surface exprimée en points image est ensuite convertie en m^2 selon le grossissement microscopique utilisé. Ainsi, pour chaque muscle, on définit sur l'ensemble des quatre fenêtres de mesure :

- . Le nombre total de fibres
- . Le nombre total de chaque type de fibres
- . Le nombre relatif de chaque type de fibres (ou fréquence numérique relative), exprimé en % du nombre total de fibres mesurées

$$\dots \text{NF \% (1)} = \frac{n_1}{(n_1 + n_2 + n_3)}$$

$$\dots \text{NF \% (2)}$$

$$\dots \text{NF \% (3)}$$

b - Paramètres de distribution spatiale (Fig. 11)

Ce programme de mesure est effectué en deux temps, à deux seuils de gris différents, déterminés par l'expérimentateur, sur la même image électronique :

- * premier temps : fibres 1 détectées (noires)
fibres 2 et 3 non détectées (blanches)
- * deuxième temps : fibres 1 et 3 détectées
fibres 2 non détectées

La distinction individuelle des trois types de fibres se fait ensuite par simple comparaison des deux séries de résultats.

La démarche consiste à balayer l'image par une fenêtre de détection de 50 x 10 points image (p.i.), soit 500 p.i. de surface.

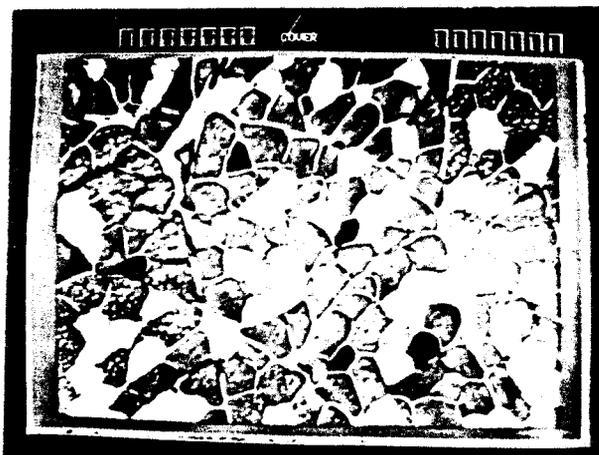
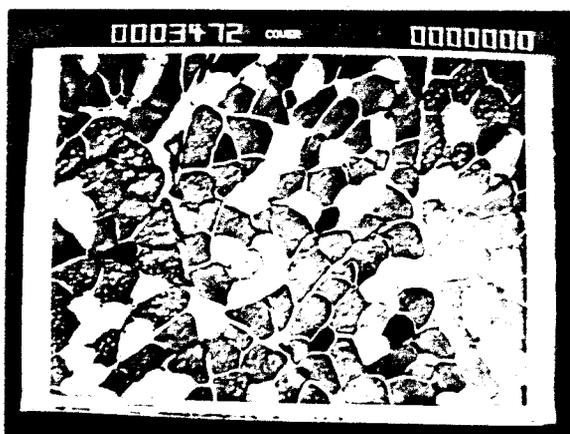


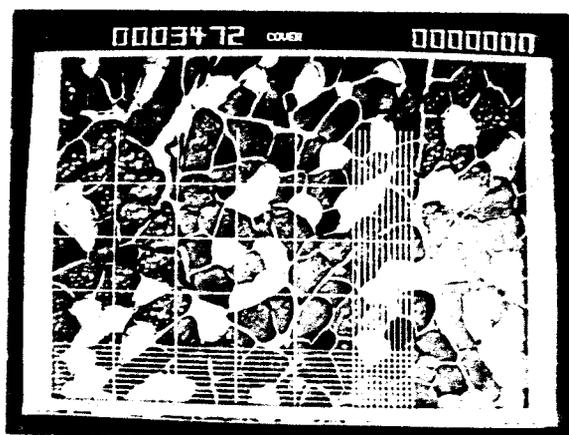
image visualisée
sur l'écran



tracage au stylo
d'une fibre F3
de surface 3472 p.i.



la fibre tracée est
visualisée en blanc
sur l'écran



grille de calibrage

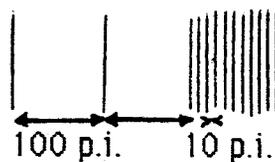


Fig.10 : Traçage et mesure des fibres musculaires



seuil de gris choisi de façon à ne détecter que les F1 (en blanc)

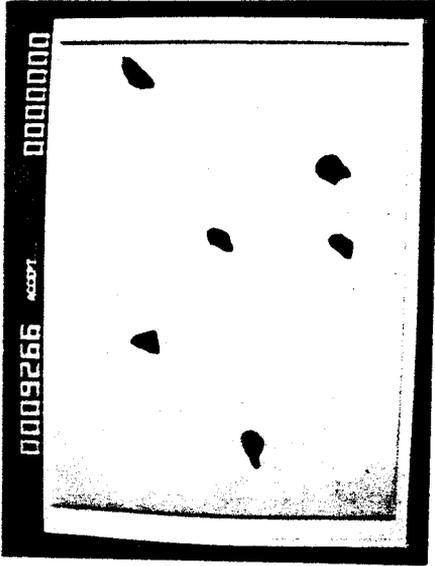


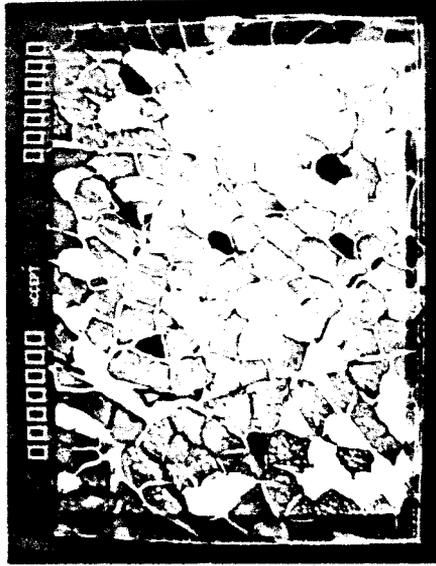
image électronique des F1



S = 288 pi > 250 pi
centre de la FSV dans F1



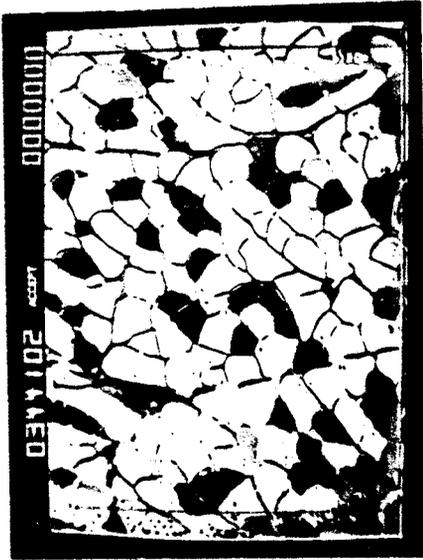
S = 0 pi < 250 pi
centre la FSV dans F3 ou F2



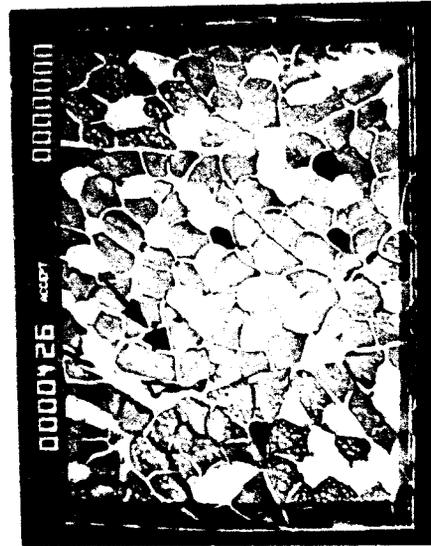
S = 0 pi < 250 pi
centre de la FSV dans F3 ou F2



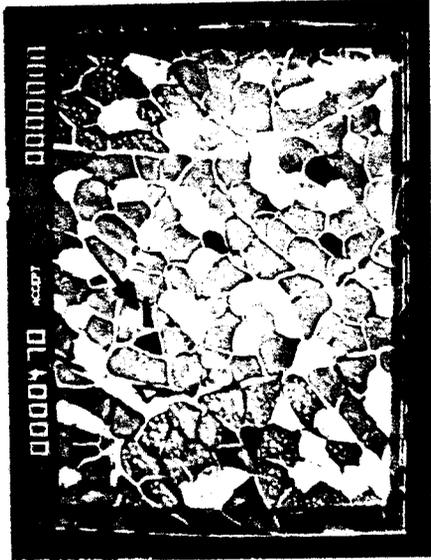
Figure 11A - Etude de la répartition spatiale à l'aide d'une fenêtre de détection standard en taille et variable en position (FSV) de 50 x 10 pi. F1 détectées.



seuil de gris choisi de façon à détecter les F1 et les F3



S = 426 pi > 250 pi
centre de la FSV dans F1 ou F3



S = 470 pi > 250 pi
centre la FSV dans F3 ou F1



S = 95 pi < 250 pi
centre de la FSV dans F2



Figure 11B - Etude de la répartition spatiale à l'aide d'une fenêtre de détection standard en taille et variable en position (FSV) de 50 x 10 pi. F1 et F3 détectées.

Cette petite fenêtre est appelée fenêtre standard variable (FSV) de façon à ce qu'il n'y ait pas de confusion avec la fenêtre de référence (ou champ microscopique) sur l'écran du QUANTIMET.

Le grossissement microscopique est choisi de telle façon que la longueur de cette FSV (50 p.i.) corresponde environ au diamètre moyen des fibres. La règle du comptage est de considérer que le centre de la FSV est dans une fibre détectée (fibre 1 dans le premier temps, fibres 1 ou 3 dans le deuxième temps) quand la surface mesurée est supérieure à la moitié de la surface de la FSV (surface détectée > 250 p.i.). Dans le cas contraire (surface détectée < 250 p.i.), le centre de la FSV est localisé dans une fibre non détectée (fibres 2 ou 3 dans le premier temps, fibre 2 dans le deuxième temps). Du fait des 10 p.i. d'épaisseur de cette fenêtre, les petites imperfections de structure comme les petits trous dans les fibres ou les fins espaces conjonctifs entre les fibres seront sans incidence sur la validité des résultats.

Pour l'échantillonnage, quatre champs microscopiques sont pris au hasard et dans chacun de ces champs de référence (d'une surface moyenne d'environ $750 \mu\text{m}^2$), quatre fois quinze FSV consécutives sont mesurées dans le sens du balayage indiqué sur la figure 11.

On obtient donc une succession de 240 FSV et on considère ensuite le nombre "S" de suites de FSV indentiques consécutives comme illustré dans l'exemple ci-dessous :

F1-F1-F2-F1-F1-F1-F1-F3-F1-F3-F3-F2-F2-F2-F1-F1-F1-F3-F2-F2-F2-F2-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Les paramètres obtenus sont donc :

- ... S nombre total de suites
- ... NS(1) nombre de suites de fibres de type 1
- ... NS(2)
- ... NS(3)

avec bien évidemment $S = NS(1) + NS(2) + NS(3)$.

Ainsi dans l'exemple cité précédemment:

S = 10 suites

NS(1) = 4 suites (les n°1, n°3, n°5 et n°8)

NS(2) = 3 suites (les n°2, n°7 et n°10)

NS(3) = 3 suites (les n°4, n°6 et n°9).

Il est évident que le nombre total de suites S donne une idée de la répartition relative des trois types de fibres à l'intérieur du muscle. Une valeur élevée indique une alternance régulière des trois types de fibres. Une valeur faible indique au contraire la présence de groupements de fibres de même type histochimique.

Le nombre de suites d'un type particulier de fibres (NS) est donc directement proportionnel au nombre relatif de ce type de fibres dans le muscle par rapport aux deux autres types.

I - RESULTATS

Dès sa pénétration dans le muscle sternocéphalique, le nerf spinal accessoire se ramifie en plusieurs branches. Ces ramifications nerveuses se subdivisent à leur tour à l'intérieur du muscle jusqu'à donner des fibres isolées. Au contact des fibres musculaires, ces axones établissent des jonctions fonctionnelles : les plaques motrices.

Les plaques motrices ou jonctions neuromusculaires comprennent deux composantes principales, l'une nerveuse et l'autre musculaire. Ces deux composantes sont séparées par un espace appelé fente jonctionnelle (Figs 12, 13, 14 et 15).

A) COMPOSANTE NERVEUSE

A proximité des sites jonctionnels, les axones perdent leur gaine de myéline et viennent se loger dans une gouttière synaptique. Une cellule de Schwann terminale, ou téloglie, ferme le côté extérieur de cette gouttière isolant ainsi l'extrémité axonique contrairement à ce qui est observé chez les Vertébrés inférieurs, la téloglie n'émet pas de prolongements qui viennent s'interposer entre l'axone et le muscle. Le cytoplasme téloglial, relativement dense aux électrons, est riche en réticulum endoplasmique granuleux et contient quelques vésicules et des mitochondries.

Quant à la terminaison axonique, elle présente un cytoplasme moins dense aux électrons. Elle contient principalement des vésicules et des mitochondries, ces deux types d'organites occupant la totalité du volume de la terminaison axonique.

1) Les vésicules

Il est possible de distinguer trois sortes de vésicules qui diffèrent les uns des autres par leur forme, leur taille et la densité

Figure 12 - Jonction neuromusculaire normale.

La terminaison axonique est très riche en petites vésicules jonctionnelles (v) parmi lesquelles sont dispersées quelques vésicules à cœur dense de 100 nm de diamètre environ (flèches), entourant une mitochondrie (M) allongée. Cette extrémité axonique est recouverte par la lame cytoplasmique d'une cellule de Schwann (s). Le plan de coupe permet d'observer sur la face interne de la membrane préjonctionnelle quelques zones actives (ZA). L'appareil sous-neural est bien développé. Quant à la sole musculaire qui recouvre ici deux myofibrilles (mf), elle renferme des mitochondries arrondies ou ovoïdes (M), un appareil de Golgi (G), un noyau (N) et du glycogène (GL).

x 20 000

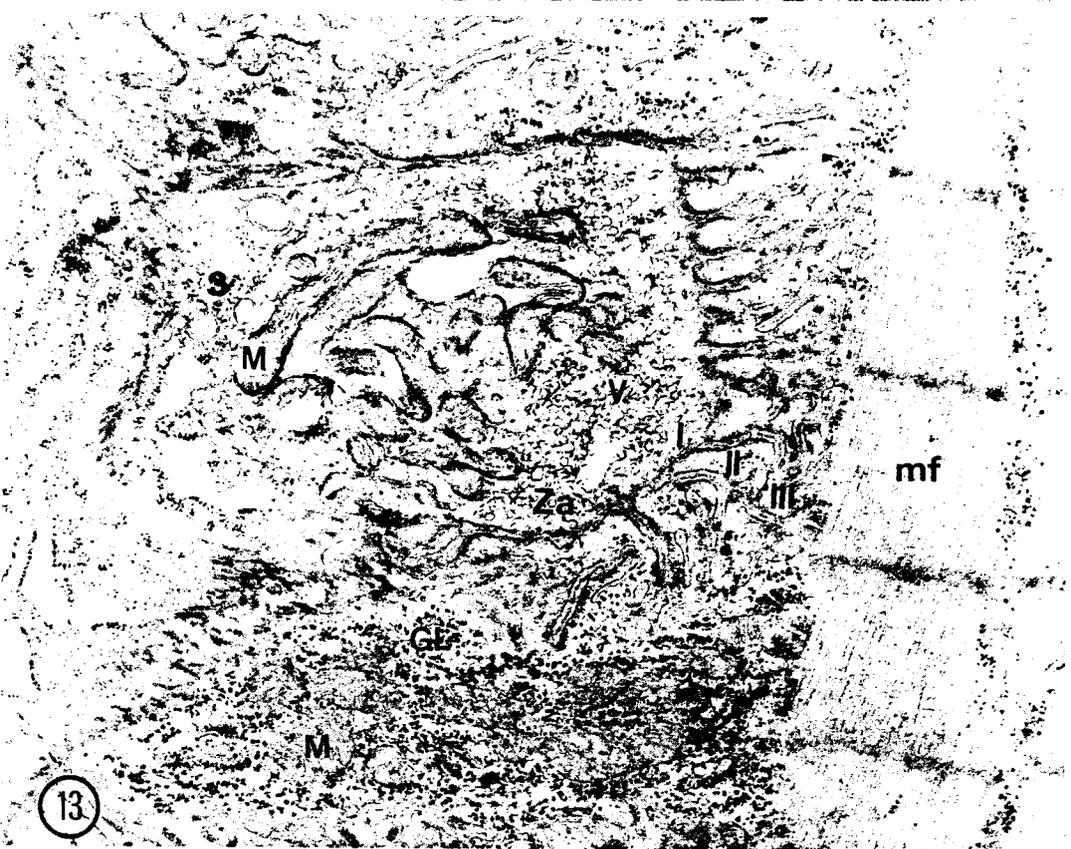
Figure 13 - Plaque motrice montrant l'abondance de mitochondries (M) allongées dans la terminaison nerveuse, arrondies ou ovoïdes dans la sole musculaire. Cette dernière est par ailleurs riche en glycogène (GL). La terminaison nerveuse contient de nombreuses vésicules jonctionnelles (V) qui se regroupent parfois au niveau des zones actives (ZA). L'appareil sous-neural, bien développé, présente des plis primaires (I), secondaires (II), voire tertiaires (III).

mf : Myofibrille ; S : Cellule de Schwann.

x 21 300

CHAPITRE I

ULTRASTRUCTURE DE LA JONCTION NEUROMUSCULAIRE NORMALE



aux électrons de leur contenu. Suivant la forme, deux catégories peuvent être décrites :

- Des vésicules allongées sont assez fréquemment observées au niveau des terminaisons axoniques. Ces vésicules ont une longueur moyenne de 75 à 100 nm et une largeur de 25 nm. Elles sont dispersées parmi les autres catégories de vésicules d'une manière assez homogène. Leur aspect aplati rappelle celui des vésicules rencontrées dans les synapses inhibitrices du système nerveux central.

- Les vésicules rondes peuvent être subdivisées, suivant la taille et la densité aux électrons de leur contenu, en deux sous-groupes, les petites vésicules, à coeur clair, dont le diamètre varie entre 50 et 60 nm, sont, de loin les plus nombreuses. Les autres, à coeur relativement plus dense, sont d'assez grande taille puisque leur diamètre est compris entre 100 et 120 nm. Ce sont les moins fréquemment observées.

2) Les mitochondries

Le nombre des mitochondries présentes dans les terminaisons axoniques est relativement important. Elles forment, généralement, des amas localisés dans la partie centrale de ces terminaisons. En coupe, elles peuvent apparaître sous des formes allongées ou arrondies. Si la longueur des mitochondries allongées peut être très importante (plus de 2 000 nm), leur diamètre avoisine 250 nm. Quant aux formes arrondies, elles ont un diamètre de 250 nm en moyenne. Ceci suggère que les mitochondries des terminaisons axoniques sont de forme plus ou moins cylindrique, avec une longueur très souvent importante et un diamètre assez stable, voisin de 250 nm. Enfin, les crêtes mitochondriales sont généralement orientées parallèlement à l'axe longitudinal de l'organite.

3) L'axolemme

L'axolemme ne présente de spécialisations notables que dans la région préjonctionnelle. Là, il forme des arêtes, saillant dans la partie jonctionnelle, renforcées côté axoplasmique, par un matériau dense. Ces ensembles constituent les zones actives. Ces zones actives sont des sites privilégiés au niveau desquels se réalise l'exocytose des vésicules.

Figure 14 - Jonction neuromusculaire normale du muscle sternocéphalique.

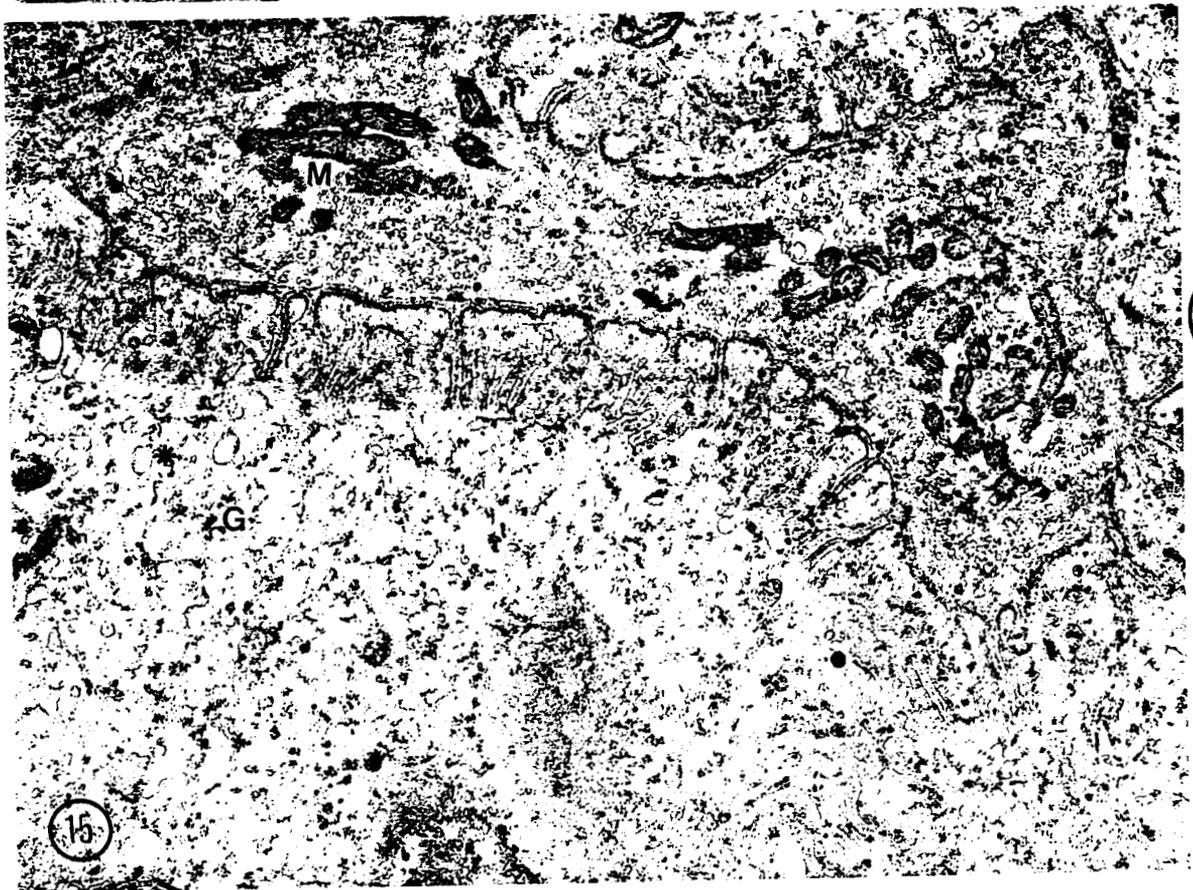
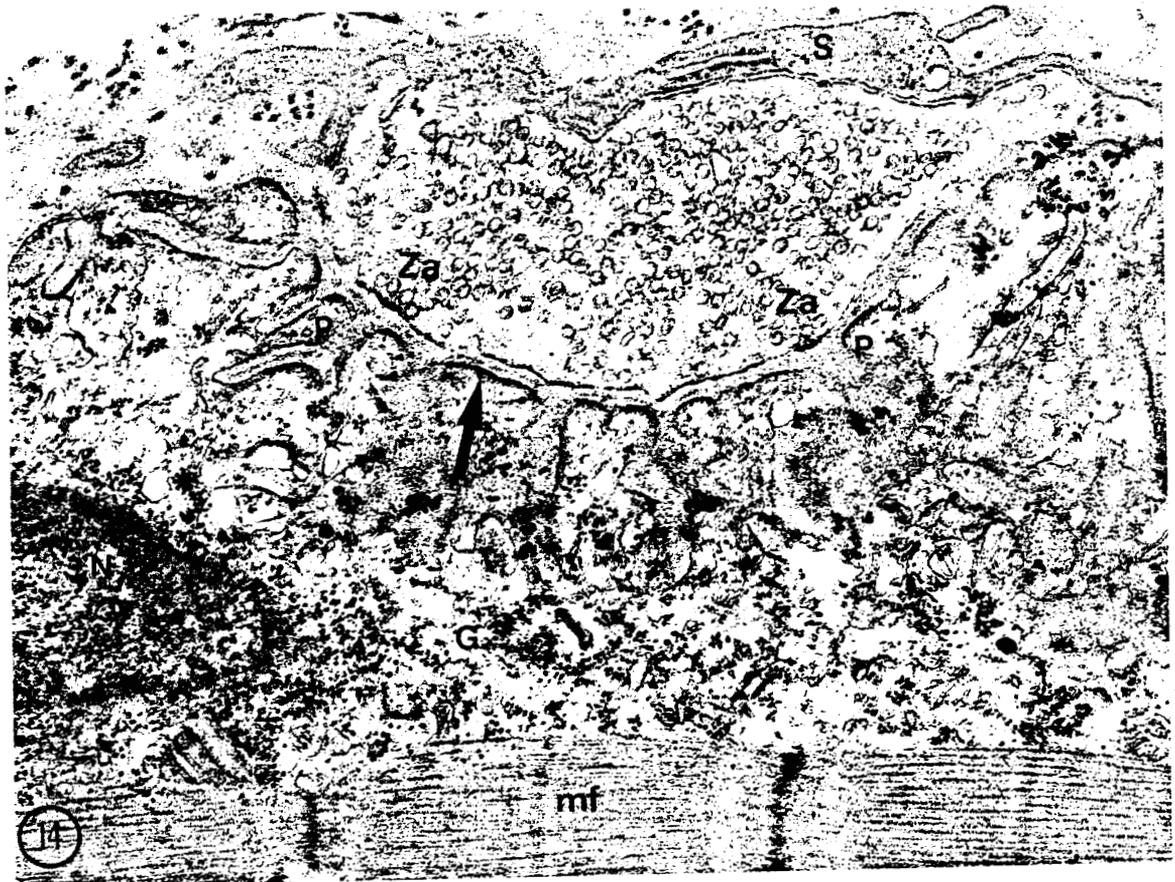
La cellule de Schwann (S), au cytoplasme dense, contient du réticulum endoplasmique granuleux et des vésicules. Près des zones actives (Za), situées en regard de l'ouverture des plis sous-neuraux (P), viennent s'accrocher des vésicules jonctionnelles. La sole musculaire est pauvre en mitochondries mais riche en glycogène (G) et en éléments vésiculaires (*). Le sarcolemme formant l'appareil sous-neural est très dense aux électrons dans les régions juxtaneurales (flèches).

N : noyau ; mf : myofibrilles.

x 30 800

Figure 15 - Plaque motrice témoin à sole musculaire pauvre en mitochondries mais riche en glycogène (G) et en vésicules (*). Les mitochondries (M) de la terminaison axonique sont allongées et ont des crêtes parallèles au grand axe de l'organite.

x 15 900



BU
LILLE

B) COMPOSANTE MUSCULAIRE

Comme chez tous les Mammifères, les jonctions neuromusculaires réalisées entre le nerf spinal et le muscle sternocéphalique sont très localisées. A ce niveau, les fibres musculaires présentent plusieurs particularités dont les plus importantes conservent le sarcolemme et le sarcoplasme.

1) Le sarcoplasme jonctionnel

Le sarcoplasme est normalement réparti en une très fine couche sous-sarcoplasmique. Son volume s'accroît au niveau des noyaux mais c'est dans la région postjonctionnelle, ou sole musculaire, qu'il est le plus abondant. A cet endroit, il renferme :

- . des mitochondries en très grand nombre réparties en paquets de formes plus ou moins ovoïdes et présentant des crêtes orientées tantôt longitudinalement, tantôt transversalement ;

- . du glycogène dont la présence en grande quantité, couplée à la richesse en mitochondries, atteste d'une activité métabolique locale très importante. Le reste de la sole musculaire est occupé par des vésicules de différentes tailles, quelques appareils de Golgi et des noyaux.

2) Le sarcoplasme jonctionnel ou membrane post-jonctionnelle

Le sarcolemme constitue une enveloppe parfaitement régulière autour de la fibre musculaire. Il ne présente de spécialisations notables qu'au niveau des invaginations du système tubulaire transverse et au niveau jonctionnel. Au fond de la gouttière jonctionnelle, creusée dans la sole musculaire, il s'invagine en une multitude de plis regroupés sous le terme d'appareil sous-neural. Les plis sous-neuraux peuvent être simples ou ramifiés. Ces derniers peuvent présenter des ramifications primaires, secondaires voire tertiaires ou quaternaires, ce qui augmente considérablement la surface cellulaire à ce niveau. En coupe, ces plis sous-neuraux sont plus ou moins rectilignes avec une lumière de 50 à 60 nm de large remplie par une substance dense aux électrons. Celle-ci se condense dans le plan médian du pli donnant à l'ensemble une allure pentalaminaire. C'est sous ce même aspect que se présente d'ailleurs la fente jonctionnelle. Enfin, sur les lèvres des plis sous-neuraux, la membrane postjonctionnelle présente des zones plus denses aux électrons.

II - DISCUSSION

L'étude ultrastructurale des jonctions neuromusculaires établies par le nerf spinal accessoire sur le muscle sternocéphalique, que nous avons menée, n'a pas tenu compte du type des fibres musculaires innervées, bien que, comme nous avons pu le constater, le muscle soit composé de trois types de fibres : rouges, blanches et intermédiaires. Les données bibliographiques suggèrent qu'à chaque type de fibres musculaires correspond un type de jonction neuromusculaire différent des deux autres par un certain nombre de caractéristiques. Ainsi, OGATA et al ont étudié en microscopie électronique à transmission (1967) et à balayage (1984, 1985) les jonctions neuromusculaires rencontrées dans les trois types de fibres du muscle intercostal de Rat. Ils en ont déduit les résultats suivants :

- Dans les fibres blanches, les jonctions neuromusculaires présentent un site jonctionnel de grande dimension. La gouttière sous-neurale, très profonde, présente de nombreux et importants replis. L'appareil sous-neural est lui-même constitué de plis profonds et ramifiés. Habituellement, les multiples ramifications de la terminaison axonique sont couvertes par trois cellules télogliales.

- Dans les fibres rouges, le site jonctionnel est de très petite taille. La gouttière sous-neurale, peu profonde et peu plissée, montre, en coupe, des plis sous-neuraux très courts et peu ramifiés. Une seule cellule de Schwann couvre les quelques ramifications axoniques terminales.

- Quant aux fibres intermédiaires, leurs caractéristiques se situent à mi-chemin entre celles des deux autres types de fibres et notamment les ramifications axoniques terminales sont couvertes par deux cellules télogliales.

Ceci étant, plusieurs de nos résultats méritent confrontation avec les données bibliographiques.

A) COMPOSANTE NERVEUSE

1) Les cellules télogliales

Quel que soit le nombre de ces cellules, elles ne recouvrent pas l'ensemble du site jonctionnel mais émettent des prolongements qui coiffent la totalité des ramifications de la terminaison axonique (COUTEAUX, 1960 ; OGATA et al, 1967, 1984, 1985). De ces prolongements, naissent de petites digitations qui assurent l'ancrage de ces cellules gliales dans la lame basale du sarcolemme. Chez les Amphibiens, BIRKS et al (1960a) et PEPPER et al (1974) ont observé des prolongements télogliaux pénétrant dans la gouttière jonctionnelle et s'intercalant entre les membranes pré- et postjonctionnelles. L'interposition de ces prolongements télogliaux dans la fente jonctionnelle serait une caractéristique des jonctions neuromusculaires de fibres rapides (PAGE, 1965 ; VERMA et REESE, 1984). Nous n'avons pas constaté une telle organisation dans les jonctions neuromusculaires que nous avons observées. Ceci rejoint les observations que PALADE et PALAY (1954), REGER (1954, 1955, 1957), ROBERTSON (1954, 1956) et COUTEAUX (1960) ont faites sur des jonctions neuromusculaires de Mammifères. Le cytoplasme de la cellule de Schwann a un aspect plus ou moins dense en microscopie électronique. La répartition des fins granules, des filaments, des vésicules de différentes tailles et des mitochondries varie d'une région à une autre.

2) La terminaison axonique

a - Les vésicules synaptiques

PALADE et PALAY (1954) et ROBERTSON (1956) ont décrit des vésicules d'un diamètre de 30 à 50 nm dans les terminaisons nerveuses en contact avec les muscles striés. Chez la Souris, ces vésicules ont un diamètre de 50 à 60 nm (REGER, 1959), ce qui rappelle les valeurs que nous avons trouvées dans les jonctions neuromusculaires de nos préparations. COUTEAUX (1960) compare leur aspect à celui des vésicules synaptiques décrites au niveau des synapses neuro-neurales. Les vésicules représentent le constituant le plus caractéristique de la région

présynaptique des synapses chimiques. Depuis, DEL CASTILLO et KATZ (1954) et DE ROBERTIS et BENNETT (1955) ces vésicules sont généralement considérées comme le lieu de stockage des neuromédiateurs.

Le nombre des vésicules est variable. Il varie, déjà, au cours de la synaptogenèse puisque les premières terminaisons nerveuses comptent très peu de vésicules (DELORME, 1971). Mais, chez l'adulte, il peut varier aussi en fonction du plan de coupe, de l'âge et de l'activité fonctionnelle de la cellule. Pour COUTEAUX et PECOT DECHAVASSINE (1973) et KÖNIG et al (1975), leur nombre dépendrait aussi de la méthode de préparation des échantillons.

Deux hypothèses complémentaires sont couramment avancées pour expliquer l'origine des vésicules synaptiques : l'une suggère leur synthèse au niveau du péricaryon et leur transfert vers le bouton synaptique au moyen du transport axonal, l'autre propose une formation locale. Cette dernière pourrait comprendre le recyclage des membranes vésiculaires incorporées dans la membrane présynaptique lors de la transmission comme l'ont proposé HEUSER et REESE (1973) dans leur cycle exo-endocytaire.

Dès 1965, UCHIZONO signale l'existence de deux types morphologiques de vésicules, sphériques et aplaties, dans les synapses du système nerveux central et suggère que les boutons terminaux contenant les vésicules aplaties sont inhibiteurs et ceux contenant les vésicules sphériques sont excitateurs. Cette dualité était mise en doute par WALBERG (1965), LUND et WESTRUM (1966) et CECCARELLI et PENSA (1968) qui attribuaient l'aplatissement des vésicules à un artefact de fixation. L'osmolarité du tampon (VALDIVIA, 1971) ou de la solution fixatrice (KORNELIUSSEN, 1972a) utilisés lors du traitement des échantillons serait impliquée dans l'aplatissement des vésicules. Le fait que les vésicules synaptiques observées en cryodécapage par SOTELO (1971) et AKERT et al (1972) sur des échantillons non fixés soient toutes sphériques pourrait être considéré comme une confirmation de cette explication. Cependant, d'autres hypothèses peuvent être avancées. L'aplatissement des vésicules pourrait être en rapport avec le vieillissement (LARRAMENDI et al, 1967), avec la dégénérescence des synapses (JONES, 1975) ou encore avec le fonctionnement synaptique (BIRKS, 1971 ; KORNELIUSSEN, 1972b ; KORNELIUSSEN et al, 1972). Tout comme MANOLOV

chez le Rat (1967), nous avons trouvé dans les jonctions neuromusculaires de nos préparations des vésicules aplaties coexistant avec de nombreuses vésicules sphériques. Si MANOLOV attribue, comme les auteurs cités précédemment, la présence des vésicules aplaties à un artéfact de fixation, une autre explication pourrait être avancée. En effet, pourquoi ne pas envisager la coexistence réelle et permanente des deux types de vésicules, les sphériques contenant le neurotransmetteur classique qu'est l'acétylcholine dont on connaît les effets activateurs, et les aplaties contenant une autre substance qui pourrait jouer un rôle modulateur lors de la transmission de l'information comme le suggère BURNSTOCK (1985) pour ce qui concerne les jonctions neuromusculaires du diaphragme de Rat. Cette hypothèse pourrait rejoindre celle qu'avait proposée UCHIZONO (1965), lorsqu'il attribuait des fonctions activatrices et inhibitrices respectivement aux vésicules sphériques et aplaties de boutons synaptiques différents.

A côté des vésicules claires dont nous venons de discuter de la taille, du nombre et de la forme, nous avons parfois trouvé des grandes vésicules sphériques à coeur dense. Leur taille dépasse généralement 80 nm (MANOLOV et OVTSHAROFF, 1982) ce qui est conforme aux valeurs que nous avons déterminées (100 - 120 nm). Ces vésicules ne représentent qu'une faible partie de la population vésiculaire. De telles vésicules sont également présentes dans des terminaisons synaptiques adrénérgiques, qu'elles soient localisées dans le système nerveux central ou périphérique (VAN ORDEN et al, 1966 ; BLOOM, 1972). TAXI (1965) en a également trouvé dans les boutons synaptiques cholinérgiques. Ces vésicules à grand coeur dense pourraient contenir des monoamines biogènes (RICHARDS et TRANZER, 1970).

b - Les mitochondries

Un des points remarquables concernant les mitochondries de la terminaison axonique est leur localisation groupée au centre de l'extrémité nerveuse. Cette disposition rappelle celle décrite par VERMA et REESE (1984) dans la jonction neuromusculaire de Grenouille.

c - La membrane préjonctionnelle

La membrane préjonctionnelle peut être facilement distinguée du reste de l'axolemme que ce soit en microscopie électronique classique ou en cryodécapage, car elle est soulignée par la présence d'un très grand nombre de minuscules indentations correspondant aux zones actives (COUTEAUX et PECOT DE CHAVASSINE (1970 a, b, 1973), DREYER et al (1973), PEPER et al (1974) et SANDRI et al (1977)). Les zones actives sont des lieux privilégiés au niveau desquels les vésicules synaptiques se fixent et libèrent leur neurotransmetteur. Chez la Grenouille, VERMA et REESE (1984) notent des répartitions différentes de ces zones actives selon les fibres musculaires innervées :

- Dans les jonctions neuromusculaires des fibres rapides, les zones actives sont situées en regard des ouvertures des plis sous-neuraux et les vésicules synaptiques se fixent par paires, de part et d'autre de la barre dense.

- Dans les jonctions neuromusculaires des fibres lentes, ces zones actives sont non seulement localisées en face d'invaginations du sarcolemme, mais aussi entre celles-ci et les vésicules synaptiques s'ouvrent de part et d'autre de la barre de façon irrégulière.

Les observations que nous avons réalisées ne nous permettent pas de relier la distribution des zones actives de telle ou telle jonction neuromusculaire à tel ou tel type de fibre musculaire. Par contre, elles se rapprochent beaucoup des résultats décrits par PEPER et al (1974) puisque si toutes les zones actives que nous avons observées sont situées en face de plis sous-neuraux, il n'y a pas forcément une zone active en face de chaque pli sous-neural. Par ailleurs, notre étude, purement qualitative des zones actives, ne nous permet pas d'établir la relation entre le nombre de zones actives et l'activité jonctionnelle comme l'ont fait HEUSER et al (1974).

B) FENTE JONCTIONNELLE

Si l'espace synaptique des synapses neuro-neurales est de 15 à 20 nm, celui des jonctions neuromusculaires est plus large et contient une substance amorphe subdivisée en deux couches par une ligne dense médiane. Certaines techniques de fixation et de contraste permettent une visualisation encore meilleure de cette ligne en mettant en évidence la présence de groupes acides. Cette ligne médiane correspond à l'adhésion des revêtements membranaires pré- et postjonctionnels (MANOLOV et OVTCHAROFF, 1982). Cet aspect correspond à celui que nous avons observé dans les jonctions neuromusculaires de nos préparations.

C) COMPOSANTE MUSCULAIRE

1) Membrane postsynaptique

Au niveau jonctionnel, le sarcolemme possède des spécialisations morphologiques et fonctionnelles lui permettant d'assurer son rôle dans la transmission de l'information. Contrairement à ce que l'on peut observer chez les Amphibiens, les fibres musculaires de Mammifères présentent des sites jonctionnels très localisés. Ceci pose d'ailleurs un problème d'échantillonnage qui peut être résolu par l'utilisation de la technique permettant la révélation de l'activité acétylcholinestérasique. Nous avons appliqué la technique de KOELLE et FRIEDENWALD (1949) qui, grâce à l'utilisation de l'iso OMPA, permet de ne révéler que la seule activité acétylcholinestérasique propre aux jonctions neuromusculaires.

Le sarcolemme jonctionnel s'invagine en une multitude de plis désignés sous le terme d'appareil sous-neural. Cet appareil a été observé pour la première fois, en microscopie photonique, par COUTEAUX (1944, 1947), puis en microscopie électronique par PALADE (1954) et ROBERTSON (1954, 1956b). Chez les Amphibiens, les plis sous-neuraux sont disposés perpendiculairement à l'axe longitudinal de la gouttière. Ils sont répartis d'une façon assez régulière : approximativement trois à quatre plis par sarcomère selon BIRKS et al (1960a). Par contre, chez les Mammifères, la répartition des plis sous-neuraux est beaucoup moins régulière (BIRKS et al, 1960 ; COUTEAUX, 1960). L'aspect, plus ou moins ramifié, des plis sous-neuraux dépend et du type de fibres musculaires (OGATA et al, 1967, 1984, 1985) et du plan de coupe :

une coupe perpendiculaire aux plis révélera l'abondance de ceux-ci au fond de la gouttière jonctionnelle (COUTEAUX, 1960). La lumière des plis sous-neuraux présente le même aspect que celui de la fente jonctionnelle. Nous avons également observé ces différentes caractéristiques morphologiques dans les jonctions neuromusculaires du muscle sternocéphalique du Lapin. La face cytoplasmique du sarcolemme recouvrant les lèvres des plis sous-neuraux est soulignée par la présence de matériel dense aux électrons. BIRKS et al (1960a) et RASH et ELLISMAN (1974) observent que la région juxtaneurale des invaginations postjonctionnelles des plaques motrices de Mammifères est plus dense aux électrons que les autres membranes cellulaires. En utilisant différents types de fixateurs, BIRKS et al (1960) purent montrer que ces zones denses étaient constituées par l'accumulation de molécules protéiques, lesquelles correspondraient à des récepteurs à acétylcholine et à des molécules d'acétylcholinestérases. Ces hypothèses ont été reprises par FAMBROUGH et HARTZELL (1972) et ALBUQUERQUE et al (1974). Elles ont été confirmées par des études autoradiographiques des jonctions neuromusculaires de Souris (FERTUCK et SALPETER, 1974) et par des analyses des régions juxtaneurales en cryodécoupage et en microscopie électronique à transmission après extraction lipidique (RASH et ELLISMAN, 1974). CHIU et al (1973) et KEMP et al (1973) ont isolé, au niveau des jonctions neuromusculaires de Mammifères, des complexes de récepteurs à acétylcholine d'un poids moléculaire (P.M.) d'environ 550 000 Daltons.

En utilisant de la lécithine d'oeuf et des récepteurs à acétylcholine extraits de muscles squelettiques de Mammifères et partiellement purifiés, KEMP et al (1972, 1973) ont pu fabriquer des membranes artificielles à double couche dans lesquelles ces récepteurs, intégrés, présentaient une activité fonctionnelle. Cette activité est abolie quand ces complexes à haut P.M. sont traités avec un détergent très fort. C'est ainsi qu'en présence de S.D.S. (Sodium dodecyl sulphate), les complexes fonctionnels de récepteurs d'environ 500 000 Daltons se fragmentent en quatre à six sous-unités de 90 000 Daltons chacune. Ces sous-unités présentent deux sites à α BgTx (α -Bungaro-Toxine), le premier correspond au

site de fixation de l'acétylcholine susceptible d'être bloqué par la d-Tubocurarine, le second correspond au site modulateur de la conductance ionique (I.C.M.) non bloqué par le curare (ALBUQUERQUE et al, 1973, 1974b et c) et CHIU et al (1974).

Pour résumer, RASH et ELLISMAN (1974) suggèrent qu'*in vivo*, les complexes fonctionnels (AchR-I.C.M.) des jonctions neuromusculaires de Mammifères ont un P.M. de 500 000 Daltons, une taille d'environ 10 nm, contiennent, au moins, quatre à six sites récepteurs à acétylcholine et sont regroupés en amas protéiques dont la densité est d'environ 1 800 particules par μm^2 . Ces caractéristiques peuvent varier d'un Vertébré à un autre.

2) Le sarcoplasme jonctionnel

Trois constituants de ce sarcoplasme sont remarquables, ce sont les mitochondries, le glycogène et les vésicules.

a - Les mitochondries

Les mitochondries sont des constituants importants de la sole musculaire. Elles peuvent, selon le plan de coupe et selon le type de fibres musculaires, être peu nombreuses voire absentes au niveau de certains sites jonctionnels. Elles sont réparties en amas plus ou moins volumineux dans la sole musculaire. Elles sont ovoïdes et leurs crêtes sont généralement perpendiculaires à leur grand axe, différant en cela des crêtes des mitochondries de la partie nerveuse où elles sont orientées parallèlement à l'axe longitudinal de l'organite.

D'après OGATA et al (1967, 1984 et 1985), l'importance des mitochondries au niveau jonctionnel dépend du type de fibres musculaires. Ainsi, dans le muscle intercostal de Rat, les fibres rouges seraient très riches en mitochondries d'assez grande taille, alors que les fibres blanches en seraient presque dépourvues. Quant aux fibres intermédiaires, les nombreuses mitochondries qu'elles contiennent sont de petite taille. Ces mêmes remarques ont été faites par STEIN et PADYKULA (1962) et GAUTHIER

et PADYKULA (1966) sur le diaphragme de Rat. Pour VERMA et REESE (1984), la pauvreté en mitochondries serait une caractéristique des fibres lentes chez la Grenouille.

b - Le glycogène

Nous n'avons pas fait d'étude particulière pour déterminer la nature des grains que nous avons pris pour être faits de glycogène. Néanmoins, une simple observation permet de les discriminer des ribosomes que nous pouvons observer à la surface du réticulum endoplasmique granuleux souvent rencontré dans cette région. La présence de glycogène dans cette région a déjà été décrite par FAWCETT et SELBY (1958) chez la Tortue et REGER (1959) chez la Souris.

c - Les vésicules

La sole musculaire contient peu de vésicules. Quelques unes ressemblent aux vésicules synaptiques (REGER, 1959). D'autres possèdent un revêtement qui pourrait les faire assimiler à des vésicules enrobées. Pour ALTMAN (1971), les vésicules enrobées observées dans les régions postsynaptiques des synapses du système nerveux central participeraient à l'élaboration des densités de la membrane postsynaptique. Selon lui et d'après STELZNER et al (1973), ces vésicules seraient formées par l'appareil de Golgi et gagneraient la membrane postsynaptique dans laquelle elles fusionneraient. Par contre, KANASEKI et KODATA (1969) et HEUSER et REESE (1973) pensent que ces vésicules sont formées par endocytose au niveau du sarcolemme. Il est probable, comme le suggèrent BURRY et al (1984), que ces vésicules aient une origine double golgienne et sarcolemmique et qu'elles puissent participer à un cycle endoexocyttaire.

CHAPITRE II

ULTRASTRUCTURE DES PLAQUES MOTRICES EN COURS DE
DEGENERESCENCE

I - RESULTATS

Le protocole expérimental utilisé lors de la suture croisée hétérogène induit la dégénérescence des fibres motrices du nerf spinal accessoire dans sa portion périphérique et ipso facto celle des jonctions neuromusculaires. Afin de suivre la cinétique de cette dégénérescence, plusieurs stades ont été définis.

A) STADE I : 24 HEURES APRES DENERVATION (Figs 16, 17 et 18)

La composante musculaire ne semble pas avoir souffert de la dénervation. Le cytoplasme de la sole musculaire a conservé son aspect normal : il est toujours riche en glycogène et renferme de nombreuses mitochondries et quelques vésicules dont certaines ont un diamètre relativement important (40 à 50 nm). Elles sont situées sous la membrane postjonctionnelle entre les invaginations de l'appareil sous-neural. L'aspect de la membrane postjonctionnelle et de ses invaginations ressemble à celui qu'elle présentait chez les témoins.

En revanche, la composante nerveuse est relativement très touchée. En effet, le nombre des vésicules synaptiques chute considérablement sans, toutefois, que la proportion entre vésicules arrondies et vésicules aplaties soit altérée. Les vésicules restantes sont regroupées en agrégats dispersés à proximité de la membrane préjonctionnelle. Quant à leur aspect, il n'est pas modifié. Les mitochondries sont très sensibles à la dénervation. Dans certaines terminaisons, elles présentent un gonflement important, leur diamètre pouvant atteindre 700 nm. Ce gonflement se traduit par un éclaircissement considérable de la matrice. Le nombre des crêtes mitochondriales se réduit et leur disposition est le plus souvent radiaire. Les formes arrondies sont les plus fréquentes. La réduction du nombre de vésicules et le gonflement des mitochondries donnent à la terminaison un aspect plus clair. L'axoplasme semble s'être enrichi en neurofilaments. L'axolemme est parfois difficilement repérable.

Enfin, et contrairement à ce que nous avons vu chez le témoin,

Figure 16 - Jonctions neuromusculaires du muscle sternocéphalique, 24 heures après dénervation.

La réduction du nombre des vésicules jonctionnelles (V) agglutinées près de la membrane préjonctionnelle rend l'axoplasme clair. Les trois types de vésicules sont toujours présents ainsi que des mitochondries (M) arrondies dont les crêtes sont parfois disposées d'une manière plus ou moins radiaire.

La sole musculaire est riche en glycogène (G) et contient des mitochondries. Le sarcolemme jonctionnel est très dense aux électrons dans ses régions juxtaneurales (flèches).

NF : neurofilaments ; S : cellule de Schwann ; Za : zone active.

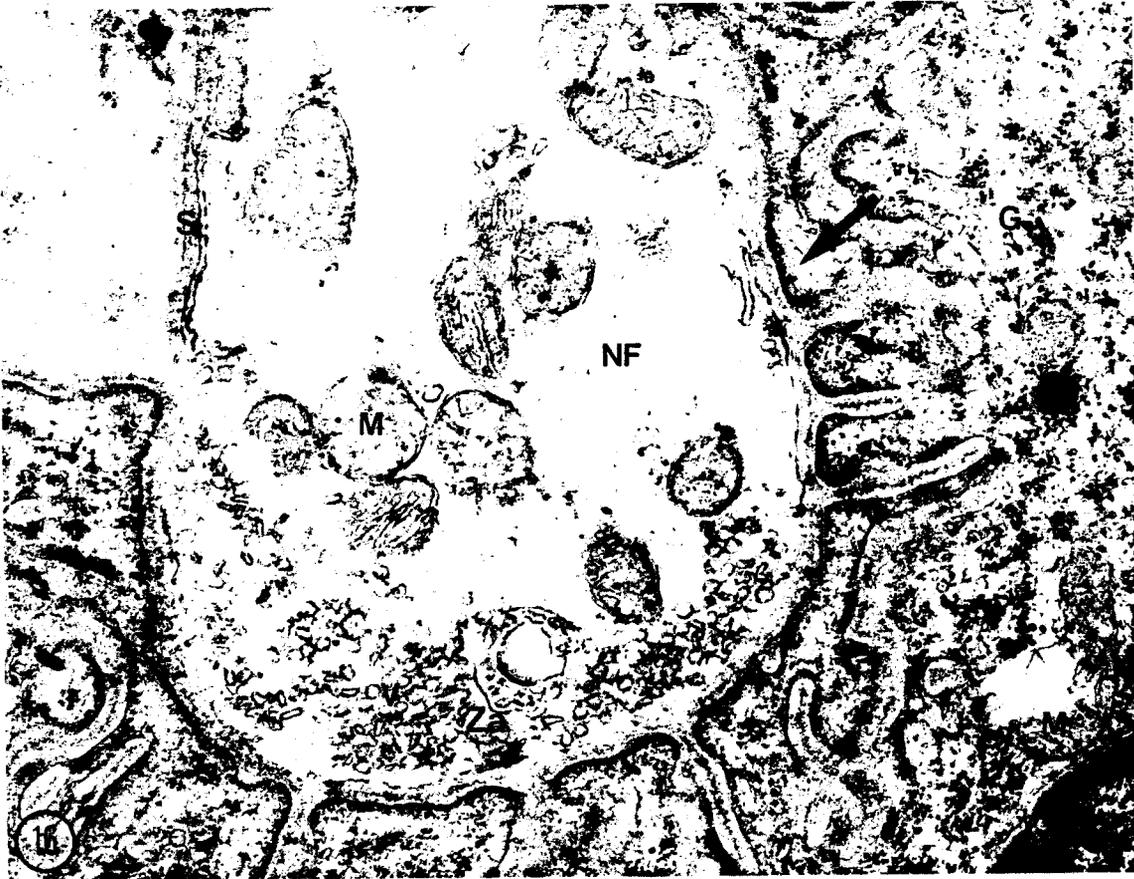
x 33 600

Figure 17 - La cellule de Schwann (S) émet des digitations qui viennent s'intercaler entre les membranes pré- (Δ) et post-jonctionnelles (*).

x 86 400

Figure 18 - Le gonflement des mitochondries (M) de la terminaison nerveuse dont les crêtes deviennent radiaires est très net.

x 69 600



des digitations télogliales peuvent venir s'intercaler entre les membranes pré- et postjonctionnelles. La terminaison axonique se trouve ainsi séparée localement de la gouttière synaptique (Fig. 17).

B) STADE II : 48 HEURES APRES DENERVATION (Figs 19 et 20)

Les processus de désorganisation des jonctions neuromusculaires observés après dénervation s'accroissent au fil du temps. La composition de la composante musculaire semble assez stable mais son épaisseur se réduit.

En revanche, la détérioration de la composante nerveuse se poursuit. La terminaison axonique semble se désagréger dans la gouttière jonctionnelle. L'espace jonctionnel devient, de ce fait, démesurément large et renferme des restes d'axones et du collagène. Rares sont les terminaisons axoniques qui présentent encore un aspect granuleux et relativement dense aux électrons. Dans la plupart d'entre elles, il n'y a ni mitochondries, ni vésicules. Les zones actives sont de plus en plus difficiles à distinguer.

Enfin, la téloglie se rapproche de la gouttière jonctionnelle ainsi dégarnie et vient, par endroit, s'accoler à l'appareil sous-neural.

C) STADE III : 72 HEURES APRES DENERVATION (Figs 21 et 22)

A ce stade, la composante musculaire commence à être touchée par la dégénérescence. Le volume de la sole musculaire est énormément réduit. Son cytoplasme contient toujours du glycogène, mais le nombre des mitochondries a considérablement diminué. Les mitochondries restantes sont plus ou moins gonflées et parfois éclatées. Les vésicules ne sont que rarement observées, alors que le réticulum endoplasmique granuleux est fréquemment observé. Quant au sarcolemme jonctionnel, il semble qu'il ait souffert par endroits et que ses replis sous-neuraux soient moins profonds.

La composante nerveuse, pour sa part, continue à se dégrader. Ainsi, nous n'avons pas pu distinguer d'éléments axoniques au niveau de

Figure 19 - Jonctions neuromusculaires du muscle sternocéphalique, 48 heures après dénervation.

Au niveau de la gouttière jonctionnelle, il ne reste plus que des débris d'axones (flèches). La cellule de Schwann (S) et du collagène (C) envahissent de plus en plus cette gouttière. La sole musculaire est très riche en glycogène (G) et en mitochondries (M).

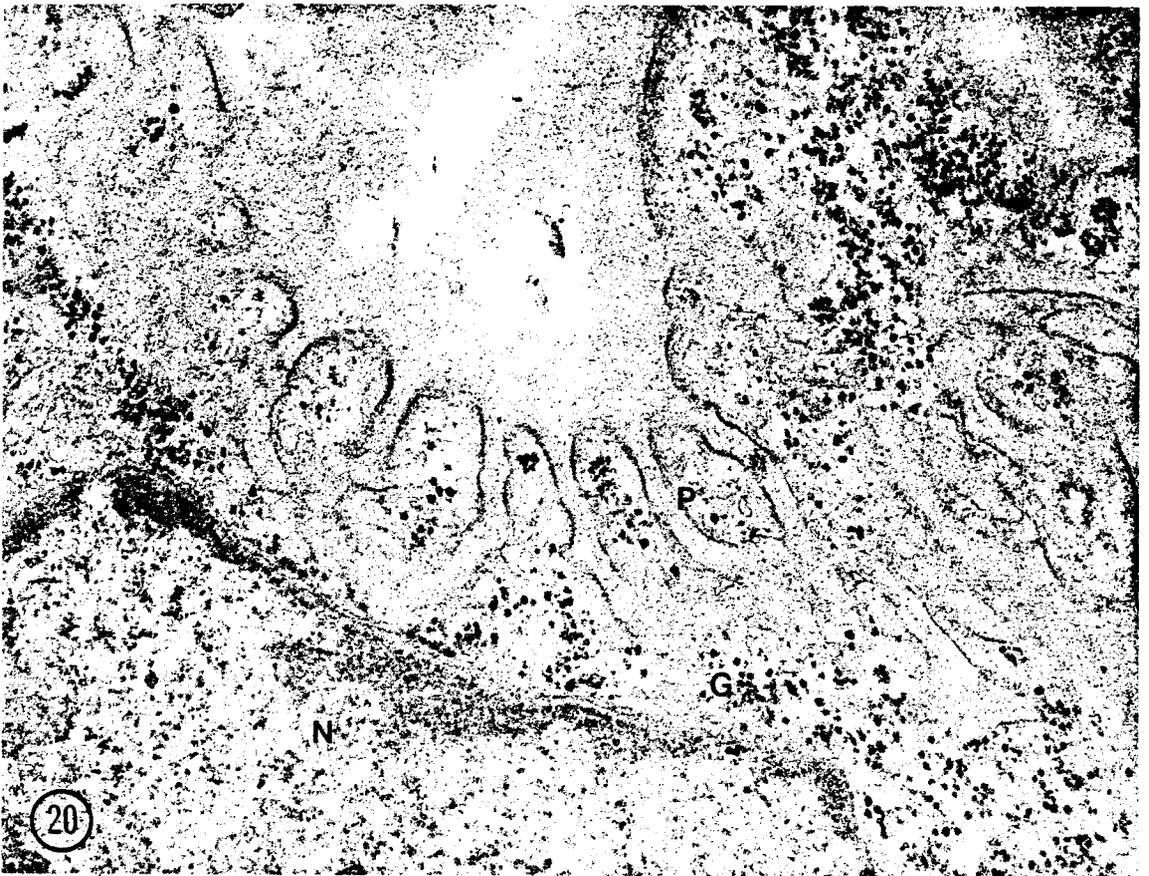
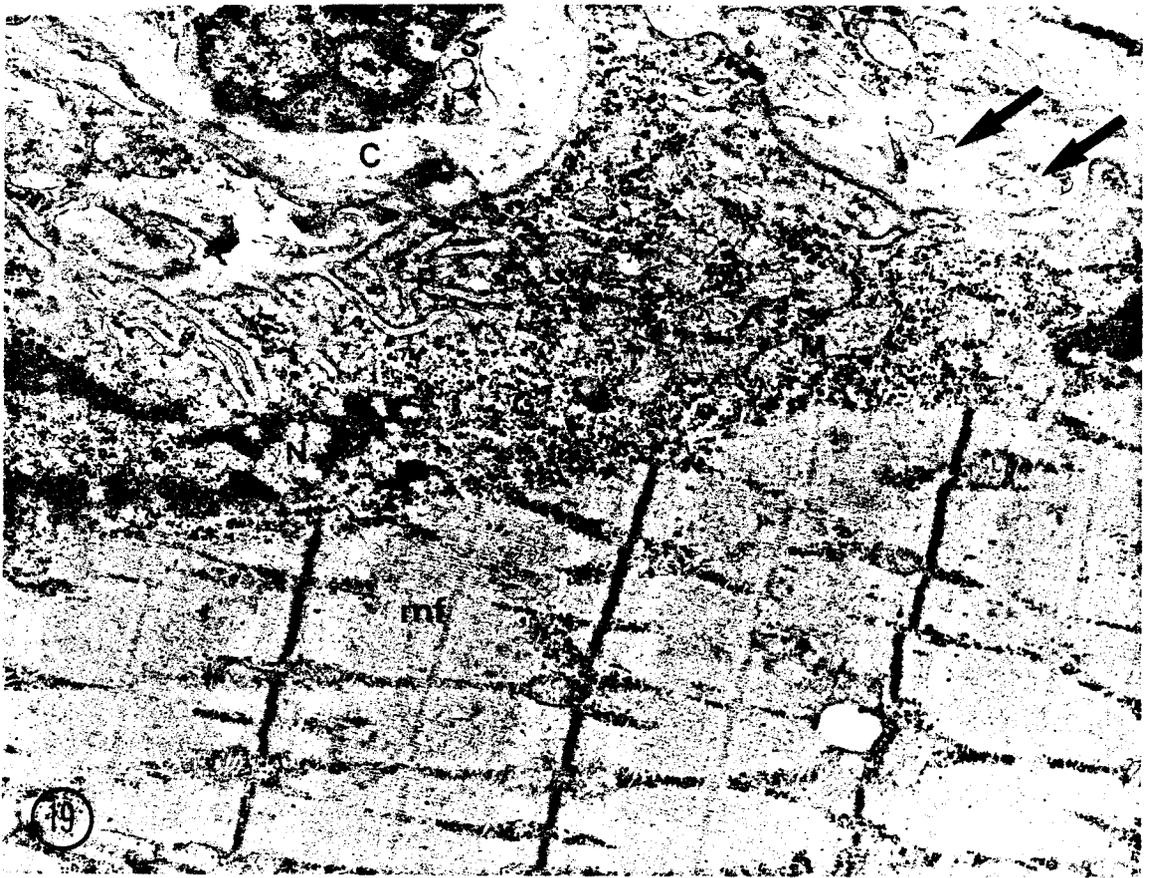
Mf : myofilaments ; N : noyau ; P : plis sous-neuraux.

x 17 300

Figure 20 - L'espace jonctionnel est démesurément large du fait de la disparition des éléments axoniques. La sole musculaire est très riche en glycogène (G), son sarcolemme semble intact et forme toujours les replis membranaires de l'appareil sous-neural (P).

N : noyau.

x 45 600



BU
LILLE

Figure 21 - Plaques motrices en dégénérescence, 72 heures après dénervation.

La gouttière jonctionnelle est envahie de plus en plus par la cellule de Schwann (S).

La sole musculaire est très réduite et contient du glycogène (G). Le sarcolemme jonctionnel, moins net par endroits, présente toujours des densifications juxtaneurales (flèches).

C : collagène ; mf : myofilaments ; RG : réticulum endoplasmique granuleux.

x 22 000

Figure 22 - Seules des fibres de collagène (C) et des digitations de la cellule de Schwann (S) sont présents dans la gouttière jonctionnelle. La sole musculaire, bien que de taille réduite, possède toujours ses plis sous-neuraux (P) et contient du glycogène (G).

M : mitochondries ; mf : myofilaments ; N : noyau.

x 17 300



BU
LILLE

la gouttière jonctionnelle. Cette dernière est envahie, d'une part, par la téloglie et, d'autre part, par une importante production de collagène. Très riche en réticulum endoplasmique granuleux, la téloglie vient très souvent s'appliquer contre l'appareil sous-neural.

D) DEGENERESCENCE A LONG TERME : 2 MOIS APRES DENERVATION

Chez les animaux dénervés deux mois, nous n'avons pas observé de jonctions neuromusculaires. Ainsi, l'étude de la cinétique de dégénérescence a été volontairement arrêtée au stade 72 heures après dénervation.

II - DISCUSSION

La section d'une fibre nerveuse induit un processus de dégénérescence de part et d'autre du site de la lésion. L'extrémité nucléée subit une dégénérescence rétrograde responsable, entre autre, d'une chromatolyse du soma. Ce phénomène transitoire est d'autant plus important que la section est proche du corps cellulaire. L'extrémité anucléée de la fibre connaît une dégénérescence définitive dite Wallerienne.

La dénervation des muscles striés squelettiques s'accompagne, entre autre, d'un certain nombre de modifications ultrastructurales des jonctions neuromusculaires. Comme nous l'avons observé au cours de la dénervation du muscle sternocéphalique de Lapin, ces modifications concernent principalement la composante nerveuse. Plusieurs travaux ont été consacrés à ce problème et les résultats qu'ils ont apportés sont les mêmes quel que soit le groupe animal sur lequel ils ont été effectués. Ainsi, REGER (1959) chez la Souris, BIRKS et al (1960b) chez la Grenouille, USHERWOOD et al (1968) chez le Criquet, MILEDI et SLATER (1970) chez le Rat et TACHIKAWA et CLEMENTI (1979) chez la Souris, ont observé, après dénervation, une chute du nombre de vésicules jonctionnelles avec agglutination des vésicules restantes, un gonflement des mitochondries de la terminaison axonique, une activation des cellules télogliales qui s'intercalent progressivement entre les membranes pré- et postjonctionnelles et finissent par occuper, après disparition complète de la terminaison axonique, la totalité de la gouttière jonctionnelle. Ces principales modifications, que nous avons également observées, surviennent plus ou moins tardivement après la section du nerf et ce délai est fonction du site de la section. En effet, suivant que la section du nerf phrénique est réalisée au niveau du cou ou au niveau de sa pénétration dans le muscle diaphragme, MILEDI et SLATER (1970) ont constaté que ces altérations apparaissaient après un délai plus ou moins important, les premières jonctions neuromusculaires touchées étant celles qui sont situées le plus près du point de pénétration du nerf dans le muscle.

Tous les auteurs admettent l'existence d'une période de latence post-dénervation. La durée de cette période est très variable : elle peut osciller, par exemple, entre 8 et 11 heures selon que le nerf moteur d'un

Rat est sectionné à proximité ou à longue distance de son point de pénétration dans le muscle (MILEDI et SLATER, 1970). Par contre, chez la Grenouille, ce délai peut varier de 3 à 4 jours, l'allongement de cette période de latence étant vraisemblablement lié à la température corporelle plus basse de cet animal (BIRKS et al, 1960b). Pour ce qui nous concerne, nous avons observé les premiers signes de dégénérescence dès le premier stade étudié, à savoir 24 heures après la dénervation. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux présentés par MILEDI et SLATER (1970).

Tout comme nous, REGER (1959) a commencé l'étude de la dégénérescence des jonctions neuromusculaires du muscle gastrocnémien de Souris 24 heures après la section du nerf sciatique réalisée à mi-cuisse et en a établi avec précision la cinétique. Cependant, ses observations diffèrent des nôtres sur certains points. C'est ainsi que 24 heures après dénervation, alors que nous notons une chute du nombre de vésicules jonctionnelles qui tendent à s'agglutiner, un léger gonflement des mitochondries et une faible activation des cellules télogliales, REGER ne décèle qu'une diminution de la densité de la matrice axonique terminale. Ce n'est que 48 heures après la dénervation qu'il mentionne des altérations touchant l'effectif des vésicules et l'axolemme. Il est vraisemblable que ce décalage de 24 heures est dû à la longueur relativement importante du segment périphérique du nerf. Il est à signaler que cet auteur ne fait aucune allusion aux cellules télogliales.

Si deux mois après dénervation, nous n'avons plus observé d'anciens sites jonctionnels reconnaissables, BIRKS et al (1960b) affirment que le dernier stade de la dégénérescence, au cours duquel les cellules de Schwann envahissent la gouttière jonctionnelle, est observable jusqu'au-delà de 130 jours.

Le devenir de la composante musculaire des jonctions neuromusculaires, après dénervation, a été abordé par peu d'auteurs. Nous avons signalé une diminution du volume de la sole musculaire qui s'appauvrit en mitochondries et une réduction de la taille des plis sous-neuraux. En ce qui concerne ces derniers, TACHIKAWA et CLEMENTI (1979) non seulement relèvent une diminution de leur taille mais aussi une réduction de leur nombre entraînant ainsi une diminution de la surface du sarcolemme.

I - RESULTATS

A) CONTROLES ELECTROPHYSIOLOGIQUES DE LA REINNERVATION

Le contrôle de la réinnervation est assuré sur les animaux suturés par enregistrement de l'activité électrique de la préparation (cf. Matériel et Méthodes). Seules les préparations présentant une activité électrophysiologique ont été utilisées pour la microscopie électronique ou pour l'histochimie des ATPases. Les premières activités induites par stimulation du tronc vagal sont enregistrées 1,5 à 2 mois après suture (Fig. 23). Ces manifestations électriques, très peu nombreuses, sont détectées à partir d'un seuil d'excitation et leur amplitude ne semble pas être modifiée par l'augmentation de l'intensité de la stimulation. Les sites à partir desquels ces manifestations électriques ont été obtenues sont localisés très près de la zone d'arrivée du nerf. Les autres régions musculaires sont silencieuses et des stimulations, même très fortes, ne permettent l'enregistrement d'aucune activité.

Chez les animaux contrôlés à partir de trois mois après la suture, le nombre d'unités enregistrées après stimulation du nerf vague réinnervant est relativement plus important tout comme sont plus nombreuses les régions du muscle au niveau desquelles une activité électrique est détectée (Figs 24-27). L'importance de la réinnervation ainsi exprimée semble donc augmenter en fonction du temps post-opératoire. Ceci est confirmé lors de la révélation de l'activité acétylcholinestérasique puisque les sites mis en évidence sont de plus en plus nombreux. Si des stimulations croissantes n'augmentent que très légèrement l'amplitude des réponses enregistrées, elles peuvent cependant entraîner l'apparition de nouvelles unités (Fig. 26) ou réduire la latence d'unités préexistantes (Fig. 27).

Par ailleurs, on peut déceler, à ces stades de l'expérimentation, une activité spontanée plus ou moins régulière de certaines unités (Fig. 28).

Le recueil de ces activités est aboli après section du nerf vague

Figure 23 - Recrutement d'activités électriques au niveau d'un muscle, un mois et demi après suture.

Etalonnage : stimulation | 5v
 enregistrement | 10 mv
 temps ——— 20 ms

Figure 24 - Déclenchement d'une activité répétitive dans un muscle, cinq mois après suture.

Etalonnage : stimulation | 500mv
 enregistrement | 10mv
 temps ——— 20 ms

Figure 25 - Enregistrement d'une activité électrique dans un muscle, cinq mois après suture.

Etalonnage : stimulation | 2v
 enregistrement | 2mv
 temps ——— 5ms

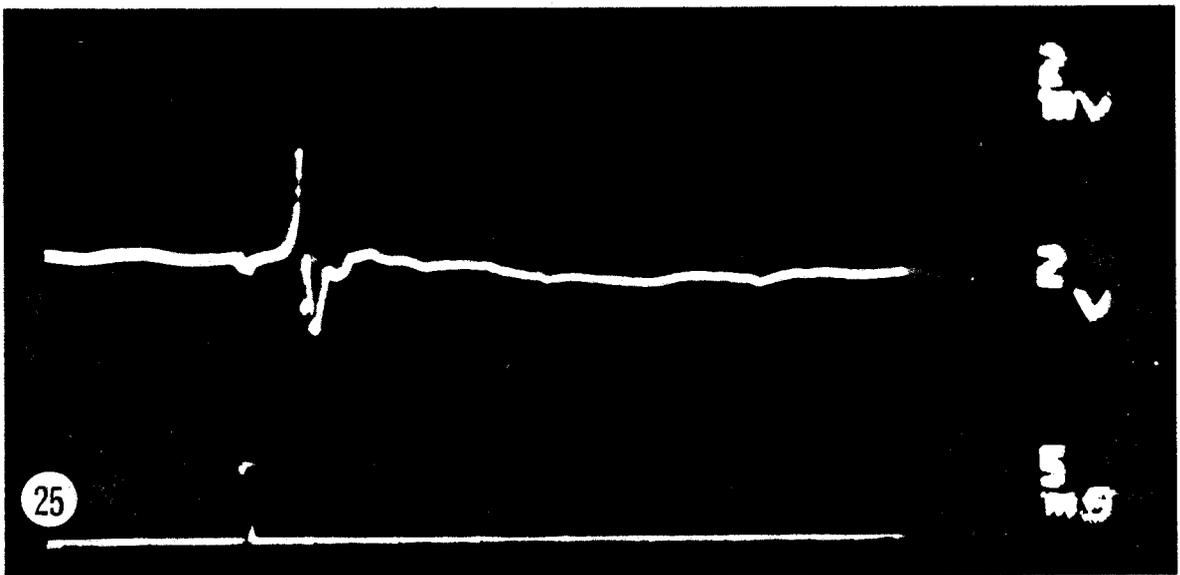
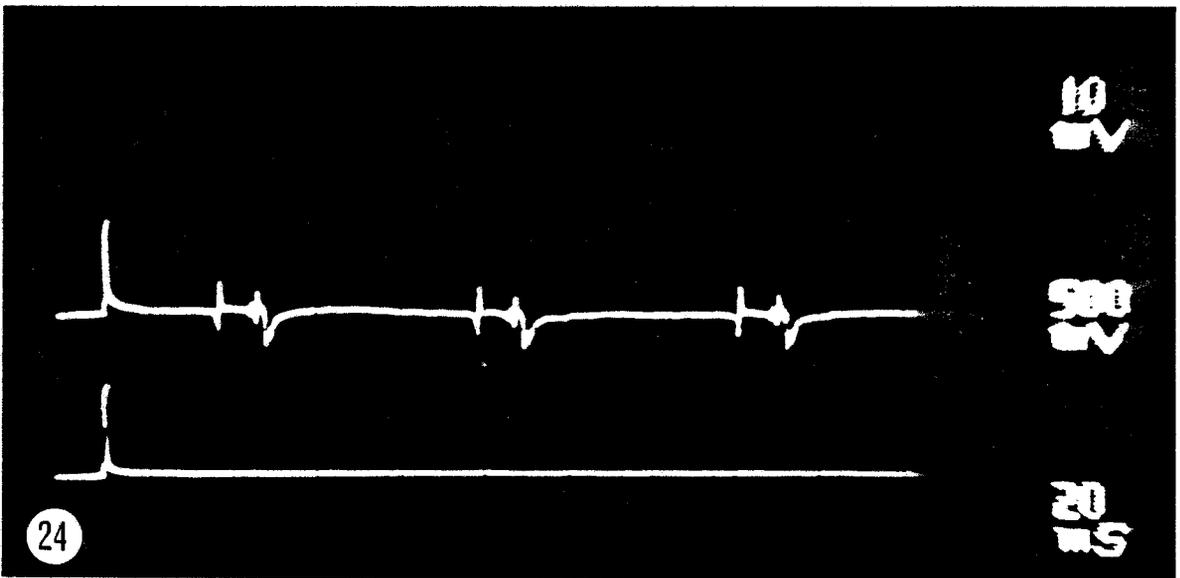
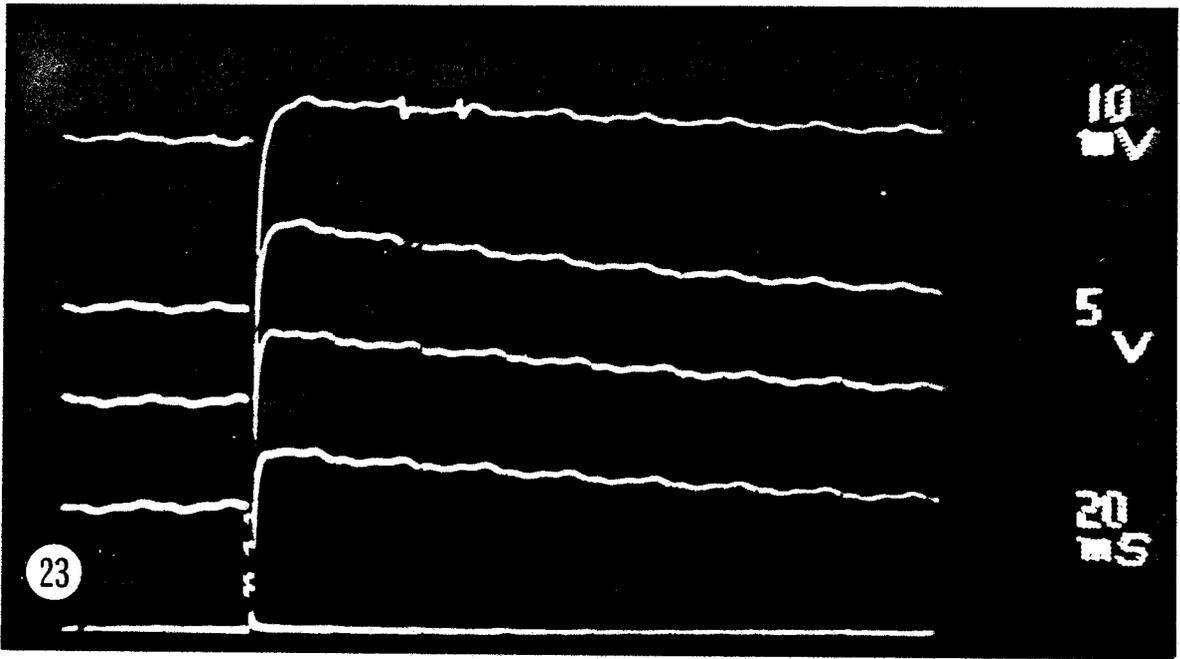


Figure 26 - Recrutement d'activités en fonction de l'amplitude de la stimulation.

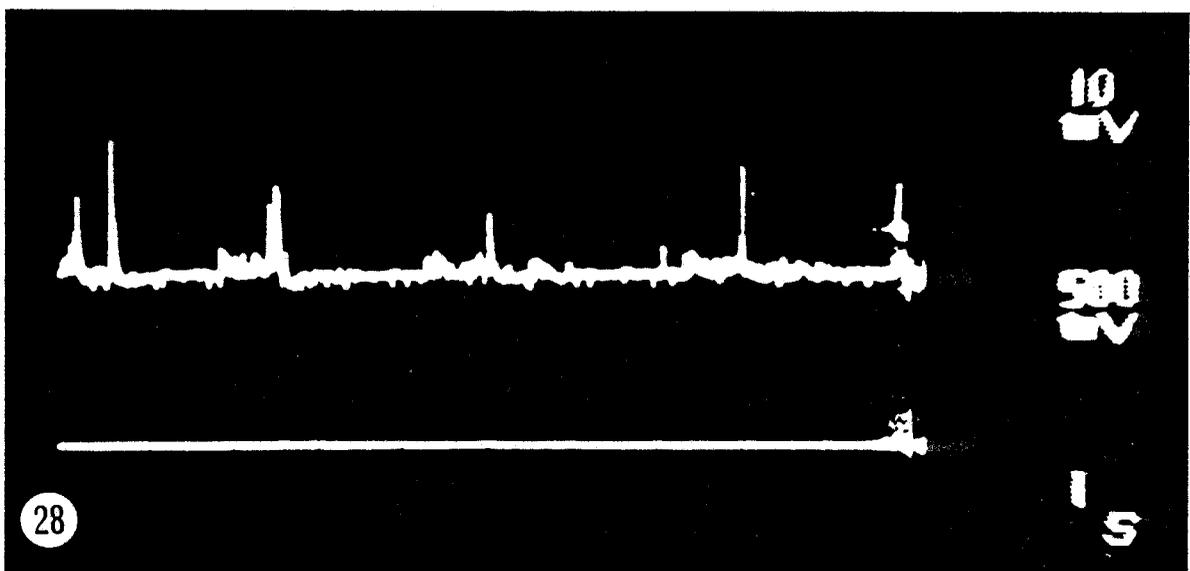
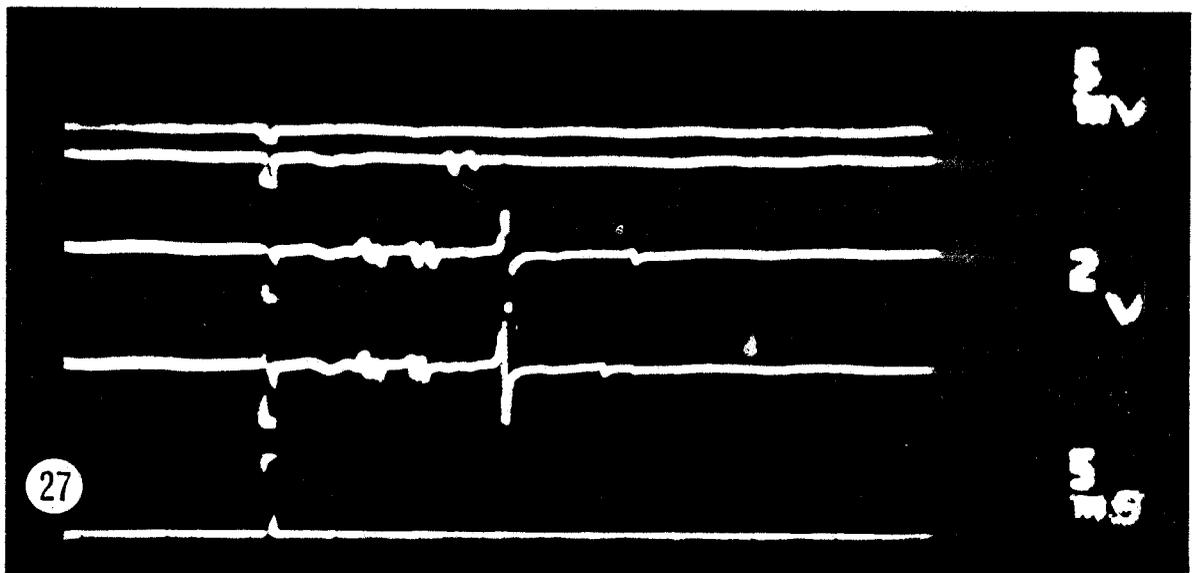
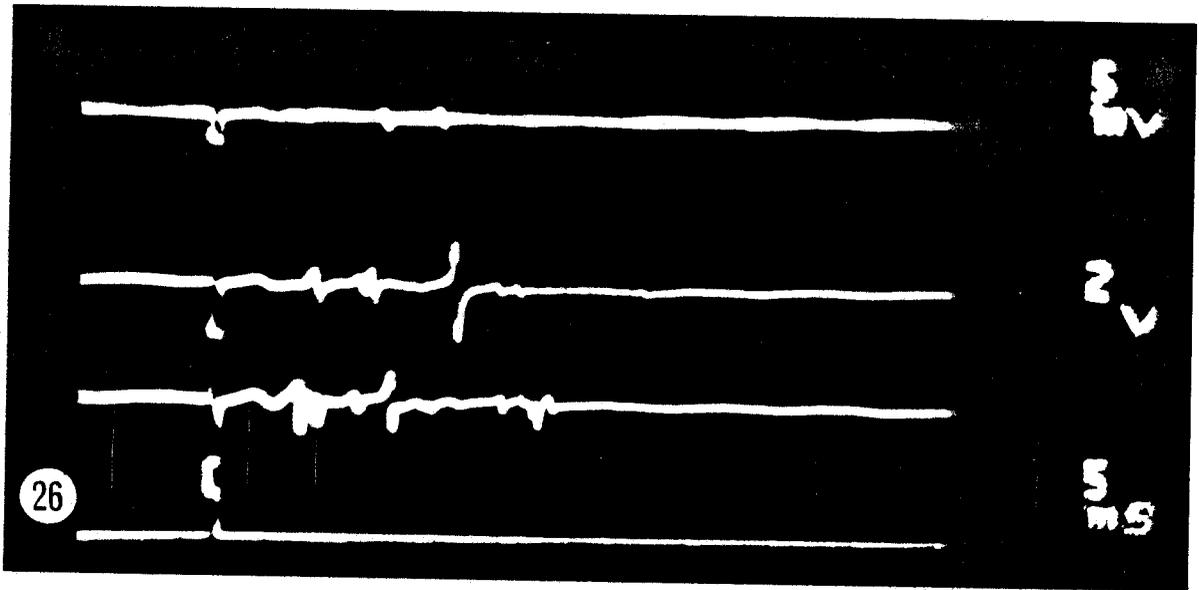
Etalonnage : stimulation | 2v
 enregistrement | 5mv
 temps ——— 5ms

Figure 27 - Autre exemple de recrutement d'activités en fonction de l'amplitude de la stimulation.

Etalonnage : stimulation | 2v
 enregistrement | 5mv
 temps ——— 5ms

Figure 28 - Enregistrement d'activité spontanée dans un muscle réinnervé, six mois après suture.

Etalonnage :
 enregistrement | 10mv
 temps ——— 1s



CHAPITRE III

ULTRASTRUCTURE DES JONCTIONS NEUROMUSCULAIRES ISSUES DE LA REINNERVATION

réinnervant entre les électrodes de stimulation et de réception.

B) OBSERVATIONS ULTRASTRUCTURALES DES JONCTIONS NEUROMUSCULAIRES

L'étude ultrastructurale des jonctions neuromusculaires établies par les fibres nerveuses afférentes vagales dans le muscle sternocéphalique réinnervé est rendu difficile par l'existence d'un certain nombre d'aléas. Au taux de mortalité important des animaux, à la suite de l'opération, viennent en effet s'ajouter un pourcentage de réinnervation moyen et une révélation des acétylcholinestérases médiocre. Cette dernière difficulté a d'ailleurs été rencontrée par KOENIG et PECOT-DECHAVASSINE (1971) les obligeant à incuber leurs échantillons de une heure à une heure trente minutes pour visualiser les plaques motrices néoformées. Pour notre part, elle a considérablement compliqué le prélèvement des échantillons, bien que nous ayons focalisé particulièrement notre attention sur les régions au niveau desquelles une activité électrophysiologique avait été détectée. Malgré toutes ces précautions, nous n'avons eu la chance, jusqu'à présent, d'observer des contacts neuromusculaires indiscutables que dans des échantillons prélevés chez des animaux dont le muscle sternocéphalique était suturé depuis cinq mois, en dépit du fait que nous ayons enregistré des activités électriques dès le deuxième mois. Il est à noter, cependant, que dans des échantillons prélevés quatre mois après suture, nous avons pu déceler des replis sarcolemmiques rappelant la structure de l'appareil sous-neural (Fig. 29). Dans ces cas, les plis sont peu nombreux, peu profonds et ne font face à aucune structure nerveuse. De telles différenciations du sarcolemme sont également observables chez des animaux dont la suture est beaucoup plus ancienne (Fig. 30). Leur présence peut être interprétée de deux manières :

- il pourrait s'agir de jonctions neuromusculaires de réinnervation. Mais, dans ce cas, nous aurions dû trouver, en effectuant des coupes sériées, des éléments nerveux en face des plis sarcolemmiques. Ce ne fut pas le cas.

- elles pourraient correspondre par ailleurs à d'anciens sites jonctionnels. En effet, comme l'ont montré BIRKS et al (1960) chez le Rat, de

Figure 29 - Muscle sternocéphalique, 4 mois après suture croisée hétérogène.

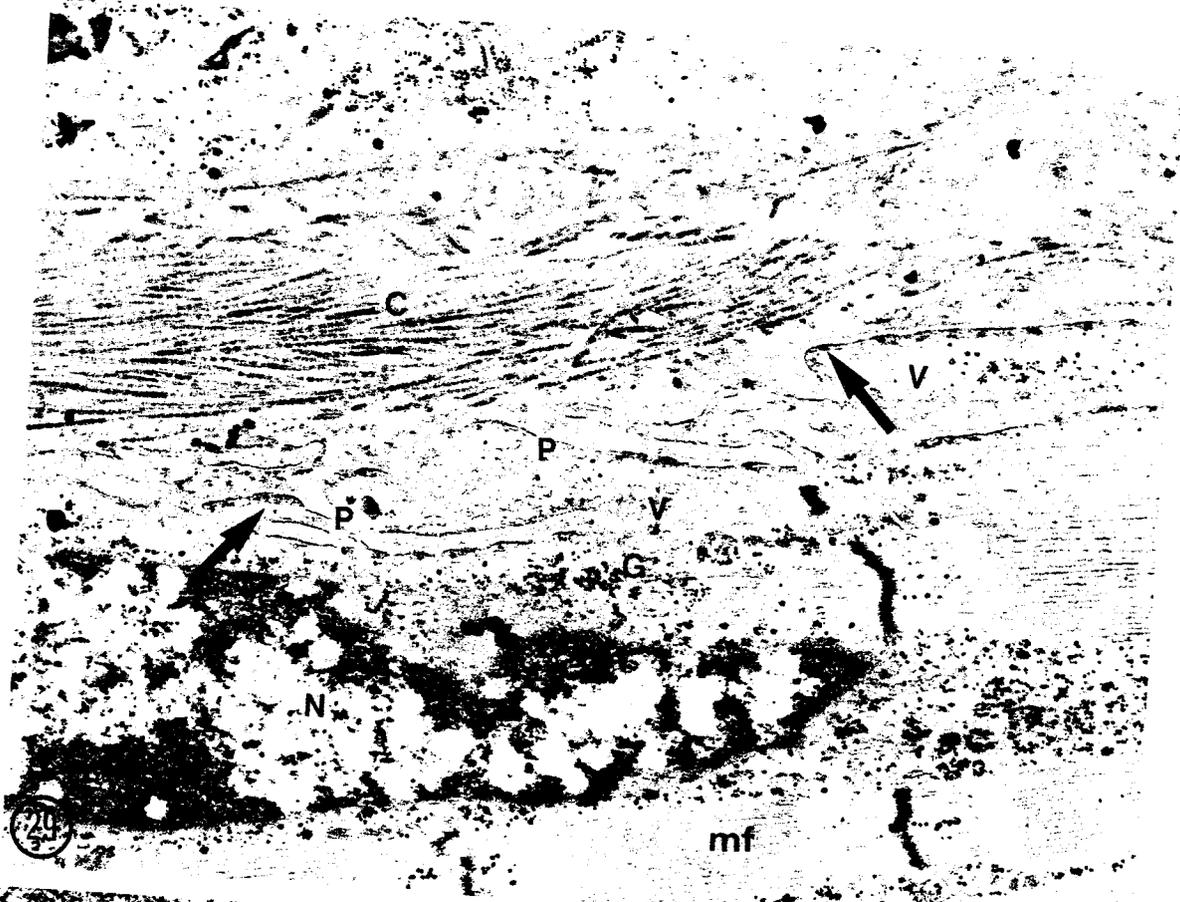
Le sarcolemme présente des replis (P) rappelant ceux d'un appareil sous-neural avec des zones de densité sur sa face sarcoplasmique (flèches). Le sarcoplasme sous-jacent, relativement riche en glycogène (G), contient beaucoup de vésicules (V). L'espace extracellulaire proche de cette région est riche en collagène (C).

mf : myofilaments ; N : noyau.

x 30 000

Figure 30 - Muscle sternocéphalique, cinq mois et demi après suture, montrant les mêmes caractéristiques que celles de la figure 23.

x 24 500



BU
LILLE

telles structures sont encore observables 130 jours après la dénervation. L'analyse ultrastructurale des contacts neuromusculaires observés au niveau du muscle sternocéphalique après sa réinnervation par des fibres afférentes vagales montre que ceux-ci, bien qu'ils possèdent un certain nombre de caractéristiques rappelant les plaques motrices normales, en diffèrent sur certains autres aspects.

1) Composante nerveuse

A côté des terminaisons axoniques, nous pouvons distinguer des cellules de Schwann qui, comme chez les animaux témoins, viennent se mettre en couvercle, isolant ainsi la terminaison nerveuse du milieu extérieur. Comme nous pouvons le constater sur les Figures 31, 32 et 34, ces cellules télogliales épousent parfaitement la forme externe de l'axone mais, en aucun cas, ne viennent s'intercaler entre les membranes pré- et postjonctionnelles. Quant aux terminaisons axoniques, elles sont de très petite taille et renferment quelques mitochondries et des vésicules. Ces dernières sont soit aplaties, soit arrondies et dans ce cas leur diamètre oscille entre 75 nm, pour les plus petites et 120 à 130 nm, pour les plus grandes.

Au niveau de la membrane préjonctionnelle, nous pouvons observer des zones actives soulignées par la présence, côté axoplasmique, de matériel dense aux électrons, au niveau desquelles des vésicules jonctionnelles viennent fusionner (Figs 33 et 34).

2) Composante musculaire

La membrane sarcolemmique est séparée de la membrane préjonctionnelle par un espace d'environ 100 nm. A l'inverse des jonctions neuromusculaires normales, la plaque motrice de réinnervation présente peu ou pas de plis sous-neuraux mais, comme chez les témoins, le sarcolemme postjonctionnel est renforcé de place en place par un matériel dense aux électrons (Figs 32-34).

Quant à la sole musculaire, elle renferme du glycogène en très grande quantité, quelques mitochondries allongées ou arrondies mais en plus ou moins bon état et une multitude de vésicules. Ces vésicules principalement situées à proximité du sarcolemme jonctionnel semblent contribuer à la formation des zones denses aux électrons décrites précédemment.

Figure 31 - Jonctions neuromusculaires établies par des afférences vagales dans le muscle sternocéphalique, cinq mois et demi après suture.

L'axoplasme est dense ne permettant pas de distinguer aisément ses différents éléments. Néanmoins, notons la présence de mitochondries abîmées (M), de vésicules jonctionnelles (V) et de réticulum endoplasmique (R).

Le sarcolemme jonctionnel ne présente pas de replis sous-neuraux comme chez le témoin.

La sole musculaire, riche en glycogène (G), renferme des mitochondries (M) plus ou moins reconnaissables et des vésicules (*).

F : fente jonctionnelle ; mf : myofilaments ; N : noyau ; S : cellule de Schwann.

x 19 700

Figure 32 - Contact neuromusculaire en cours de formation.

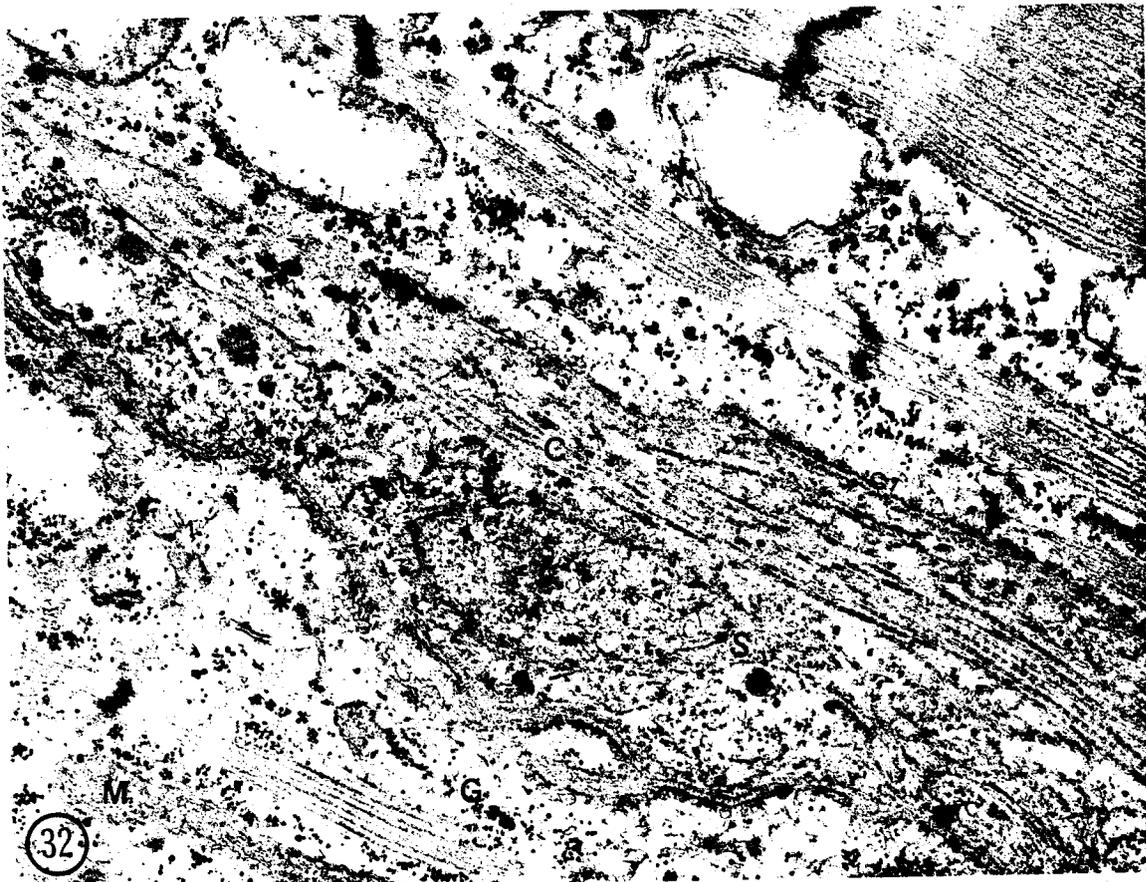
L'axone contient des vésicules jonctionnelles et semble entouré sur sa face extérieure par la cellule de Schwann (S).

Le sarcolemme présente un repli sous-neural typique encadré par des zones de forte densité aux électrons.

La sole musculaire, plus ou moins bien préservée, comprend des mitochondries (M), des vésicules (*) et du glycogène (G).

L'espace jonctionnel est très large et renferme encore du collagène (C).

x 30 000



BU
LILLE

Figure 33 - Jonctions neuromusculaires de réinnervation, six mois après suture.

L'axone est reconnaissable grâce à ses vésicules jonctionnelles (V). Le sarcolemme jonctionnel, renforcé côté juxtaneural par un matériel dense aux électrons (flèches), présente des ébauches de plis sous-neuraux (P).

La sole musculaire est très riche en glycogène (G) et renferme des mitochondries (M) et des vésicules (*).

F : fente jonctionnelle ; mf : myofilaments ; Za : zone active.

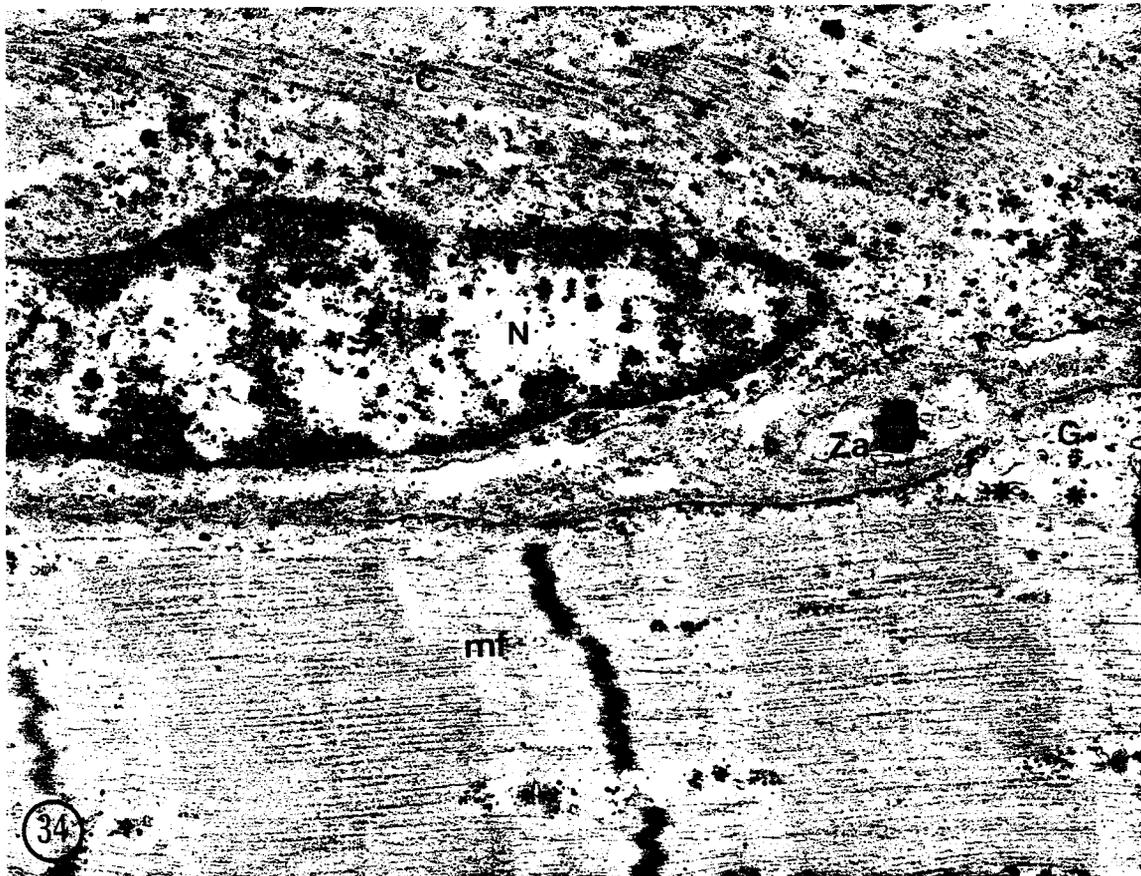
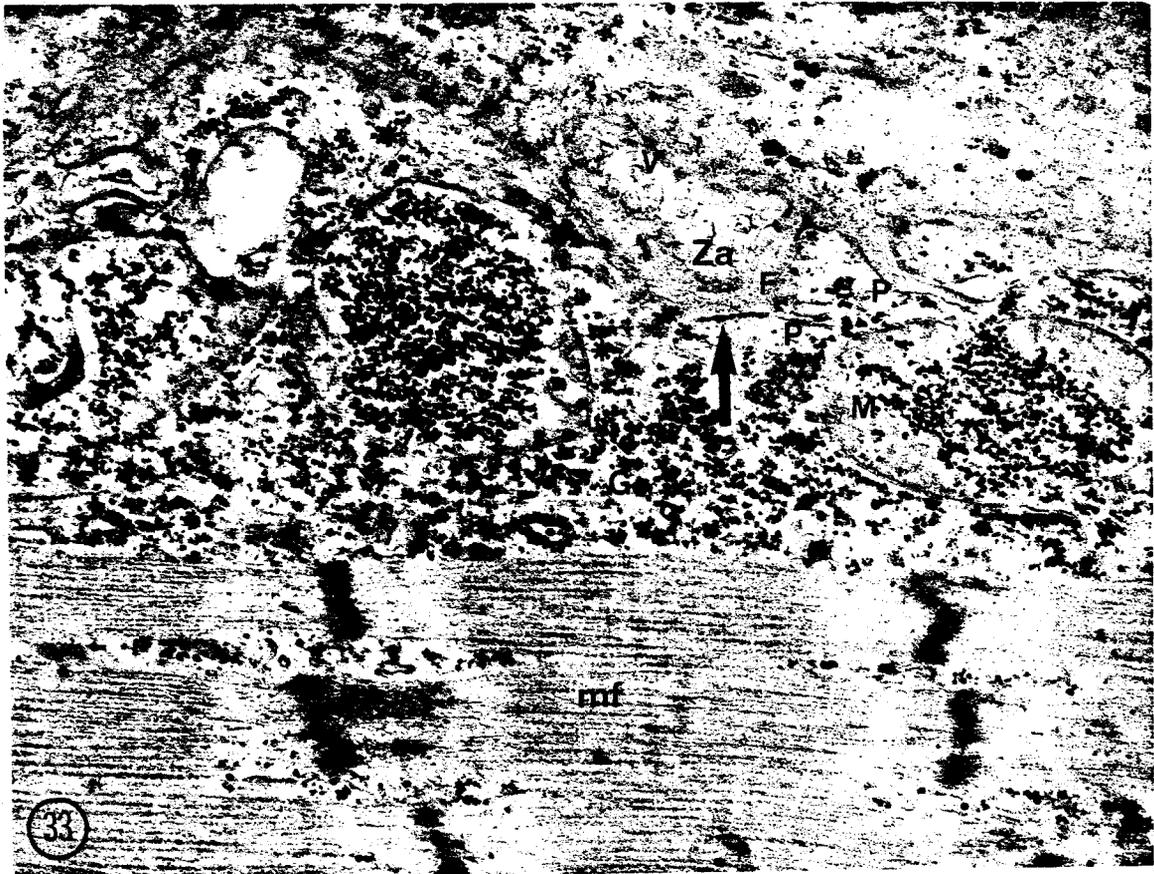
x 33 600

Figure 34 - La petite terminaison axonique renferme des vésicules jonctionnelles et une zone active (Za). Un espace jonctionnel classique sépare les membranes pré- et postjonctionnelles.

La sole musculaire, de taille réduite, renferme quelques grains de glycogène (G) et des vésicules (*).

C : collagène remplissant le milieu intercellulaire ; mf : myofilaments ; N : noyau de la cellule de Schwann (S).

x 28 000



BU
LILLE

II - DISCUSSION

Comme nous l'avons déjà signalé, peu d'auteurs ont abordé la réinnervation des muscles striés squelettiques par des fibres nerveuses sensitives. La validité de cette technique et la réalité de la réinnervation ne font pas encore l'unanimité bien que des résultats convaincants aient été obtenus. Les contrôles qui ont été effectués pour confirmer cette réinnervation ont fait appel à des techniques électrophysiologiques, histologiques et histochimiques.

Les techniques électrophysiologiques ont permis de recueillir au niveau du muscle réinnervé des activités spontanées concomitantes d'évènements respiratoires et digestifs, et d'induire d'autres activités par stimulation du nerf vague réinnervant, activités contrôlables par le curare ou la xylocaïne notamment.

Grâce aux techniques histologiques et cytologiques, il a été possible de comparer les populations de fibres des nerfs vague et spinal accessoire avant et après réinnervation. Les résultats décrits concordent avec ceux obtenus en électrophysiologie notamment en ce qui concerne la relation vitesse de conduction-taille des fibres.

Les techniques histochimiques ont apporté deux confirmations :

- L'implication des cellules du ganglion plexiforme dans le processus de réinnervation grâce à la technique de la peroxydase rétrograde ;
- Révélation de l'activité acétylcholinestérasique au niveau des sites des jonctions neuromusculaires de réinnervation couplée avec le recueil de l'activité électrophysiologique.

Ce travail apporte, entre autre, une preuve supplémentaire en faveur de la réinnervation puisqu'il nous a été possible de trouver dans les muscles réinnervés quelques jonctions neuromusculaires.

Rappelons que les nouveaux contacts neuromusculaires sont caractérisés notamment par leur petite taille. La littérature rapporte des résultats analogues aux nôtres obtenus, soit lors de réinnervations, soit

au cours du développement. Pour ce dernier cas, les premiers contacts entre le nerf et le muscle, morphologiquement identifiés, ont été décrits chez des embryons de rats de seize jours (KELLY et ZACHS, 1969), chez des embryons de Poulet de 4 à 6 jours (ATSUMI, 1971, 1977) ; SISTO-DANEO et FILOGAMO, 1974, 1975) et chez des larves de Xénope au stade 21 (KULLBERG et al, 1977). Ces contacts myoneuraux sont réalisés par une ou plusieurs ramifications axonales de petit diamètre. Ces terminaisons pouvant être enveloppées de façon assez lâche par des cellules qui sont vraisemblablement des cellules de Schwann mais elles peuvent également être totalement libres. Les vésicules qu'elles contiennent sont dispersées dans l'axoplasme sans présenter de concentration particulière, autour de points privilégiés de la membrane préjonctionnelle. Le sarcolemme postjonctionnel est souligné de place en place par des épaissements très localisés et ne présente aucune autre spécialisation morphologique. La largeur de la fente jonctionnelle est irrégulière et contient peu ou pas de lame basale.

Des contacts myoneuraux présentant des caractéristiques morphologiques de jonctions neuromusculaires indéniables n'apparaissent, chez les embryons de Rat, qu'au 18^{ème} jour de gestation. A ce moment, l'espace jonctionnel large de 50 à 90 nm est partiellement rempli par une lame basale, les épaissements du sarcolemme s'accroissent et de petites dépressions sont visibles sur la membrane postjonctionnelle. Ce n'est qu'à la naissance, voire plus tard, que des replis sous-neuraux classiques sont observables (KELLY et ZACHS, 1969). TAKAHASHI et al (1987), dans des cocultures de cellules musculaires et de neurones isolés à partir d'embryons de Xénope, observent, dès la quatrième heure, des contacts neuromusculaires voisins de ceux décrits précédemment aux stades les plus précoces. Par contre, aux stades les plus tardifs de leurs cultures (trois jours), ils décrivent des contacts présentant du côté nerveux des zones actives et des regroupements de vésicules et du côté musculaire, un épaissement du sarcolemme uniquement.

Le fonctionnement de la plaque motrice apparaît bien avant la

maturité structurale. Cette précession de la fonction pourrait faciliter la maturation structurale de la jonction (DENNIS, 1981).

La même cinétique de développement est observée au cours de la régénération des jonctions neuromusculaires au niveau de muscles striés squelettiques d'adultes lorsque ceux-ci sont réinnervés par leur propre nerf (KOENIG et PECOT-DECHAVASSINE, 1971) ou lorsqu'ils sont traités par la toxine botulinique (JIRMANOVÁ et THESLEFF, 1976) ou par le curare (WERNIG et al, 1980).

Enfin, dans un travail récent, HORVAT et al (1987) ont obtenu des plaques motrices reformées dans un muscle squelettique dénervé de Rat à partir de neurones médullaires empruntant la voie d'un autogreffon constitué par un fragment du nerf péronéal. Trois à cinq mois après la mise en place du greffon, ils observent des plaques motrices dont certaines présentent des plis sous-neuraux nombreux et profonds alors que d'autres en sont pratiquement dépourvues. Les résultats que nous avons obtenus sont en accord, pour l'une ou l'autre des caractéristiques des plaques motrices observées, avec les différentes données rapportées précédemment. En effet, leur composante nerveuse est généralement de petite taille renfermant parfois des zones actives et des regroupements de vésicules alors que dans la composante musculaire, le sarcolemme postjonctionnel est systématiquement souligné par des épaisissements et se différencie parfois en quelques rares petits plis sous-neuraux.

Quoi qu'il en soit, nous pouvons nous demander si les plaques motrices que nous avons trouvées sont encore en cours de maturation ou si nous avons affaire à des jonctions neuromusculaires définitives. La réponse à ces questions doit prendre en compte la nature des fibres réinnervantes et la durée de la période post-opératoire.

Nous devons rappeler que nous avons obtenu nos réinnervations à la suite de sutures croisées hétérogènes nerf vague sensitif-nerf spinal accessoire. Les fibres nerveuses afférentes n'étant pas à priori effectrices, nous pouvons envisager le fait qu'elles puissent former des

jonctions neuromusculaires différentes des plaques motrices témoins. Leur taille relativement petite pourrait être due au fait qu'elles sont issues de petits axones. Cette hypothèse pourrait s'avérer exacte puisque les études portant sur la composition du nerf spinal avant et après suture montrent que la majorité des fibres myéliniques qui participent à la réinnervation sont de petits calibres puisque leur diamètre avoisine 4 μm (COGET, 1980 ; FALEMPIN, 1981 ; ROUSSEAU et FALEMPIN, 1984 et DELORME et ROUSSEAU, 1985). La petite taille de ces fibres est peut être due à leur "jeune âge". En effet, les études réalisées par MIRA (1977) chez le Rat montrent que le calibre des fibres nerveuses régénérées après différentes lésions est au départ réduit et que son importance dépend, en partie, de la durée de la période post-opératoire. C'est ainsi que le nombre de fibres ayant retrouvé un diamètre moyen normal atteint 100 % un an et demi après congélation, 80 % deux ans après écrasement et 50 % deux ans après section du nerf. Toutefois, la petite taille des fibres qui a été rapportée peut être normale puisque les spectres des fibres myéliniques du nerf vague supranoueux et du nerf spinal réinnervé se superposent parfaitement. Ce qui pourrait signifier en effet que les fibres réinnervantes ont atteint leur taille définitive (DELORME et ROUSSEAU, 1985).

Les résultats relevés dans la littérature et mentionnés précédemment indiquent qu'il est possible d'obtenir des plaques motrices définitives entre un et cinq mois selon les protocoles expérimentaux. Nous pourrions donc estimer que les contacts myoneuraux que nous avons observés dans les échantillons prélevés cinq mois et demi après suture correspondent à des plaques motrices parfaitement constituées. Cependant, la réalisation de la suture croisée hétérogène pourrait accroître la durée nécessaire à la maturation des jonctions. Dans ce cas, les images que nous avons présentées correspondraient à des plaques motrices en cours de formation. La lenteur de la réinnervation dans nos préparations pourrait avoir deux explications principales :

- Lors de la réalisation de la suture, le nerf vague du Lapin est

sectionné, dans les meilleurs cas, deux à trois mm au-dessus du ganglion plexiforme. Cette proximité du ganglion fait que la dégénérescence rétrograde traumatise fortement les cellules ganglionnaires sensées réinnerver le muscle et retarde considérablement la récupération des cellules "rescapées".

- La suture de deux nerfs aussi différents que le nerf vague et le nerf spinal accessoire pose le problème de la discontinuité des gaines constituées par les cellules de Schwann et celui de la différence de diamètre de ces deux nerfs. En ce qui concerne ce dernier point, le diamètre plus petit du nerf spinal peut même entraîner une "perte" du contingent réinnervant. Enfin, on est en droit de se demander si la nature sensitive des fibres réinnervantes est compatible avec celle des gaines des anciennes fibres motrices qu'elles doivent emprunter pour réinnerver le muscle sternocéphalique.

CHAPITRE IV

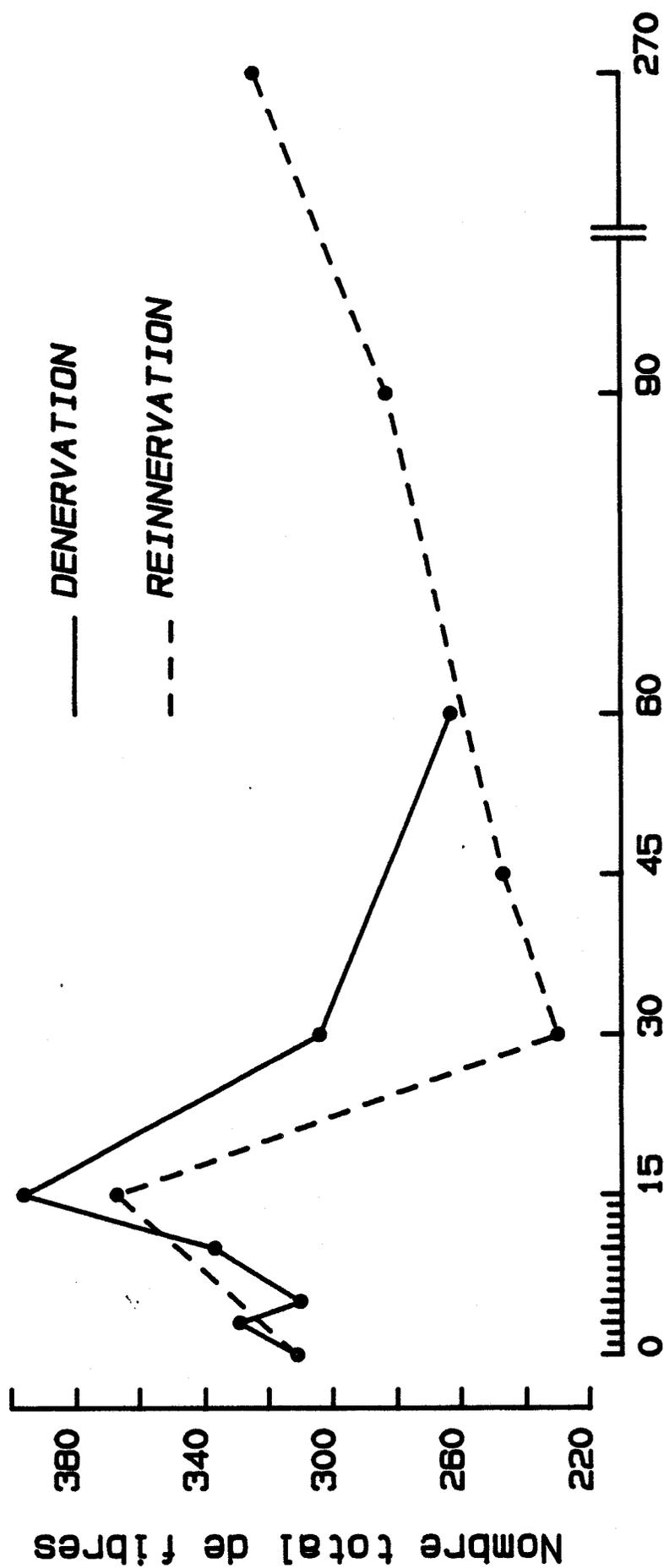
ETUDE MORPHOMETRIQUE DES FIBRES MUSCULAIRES DU MUSCLE
STERNO-CEPHALIQUE

I - RESULTATS

Au cours de notre étude ultrastructurale des jonctions neuromusculaires, nous avons été frappés par le fait que le muscle sternocéphalique, soumis à dénervation ou à réinnervation, comprenait normalement des fibres musculaires dont l'aspect était comparable à celui observé dans des muscles témoins, mais aussi d'autres fibres plus ou moins altérées selon les stades expérimentaux : altération des mitochondries, désorganisation des myofilaments pour ne citer que les principales modifications . Ces observations nous ont amené à penser que toutes les fibres musculaires d'un même muscle ne réagissaient pas de la même manière au traumatisme créé par la dénervation ou la réinnervation. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris l'étude des populations de fibres musculaires afin de préciser si celles-ci subissaient des variations en nombre, qualité etc... au cours des diverses situations expérimentales.

A) ANALYSE QUANTITATIVE DES FIBRES

Le nombre de fibres musculaires ($F_1 + F_2 + F_3$) constituant le muscle sternocéphalique est affecté lors de la dénervation et de la réinnervation par des fibres sensitives vagues (Fig. 35). Au cours de la dénervation, le nombre total des fibres musculaires diminue à partir du quinzième jour. Cette diminution explique l'atrophie des muscles dénervés, atrophie constatée lors de chaque prélèvement. Cette réduction du nombre des fibres est précédée d'une phase au cours de laquelle leur effectif total semble augmenter. Chez les animaux suturés, nous rencontrons une même phase ascendante qui est suivie, elle aussi, d'une phase descendante. Mais, contrairement à ce que nous avons vu chez les animaux dénervés, cette diminution est suivie d'une augmentation progressive de l'effectif total des fibres musculaires qui, au bout de neuf mois, avoisine celui des témoins. L'analyse séparée de chaque type de fibres (Fig. 36) suggère que la chute constatée chez les animaux dénervés est due essentiellement à une diminution des fibres F_2 et à un degré moindre de celle des fibres F_1 . Le ralentissement de la diminution du nombre total des fibres, à partir du trentième jour après

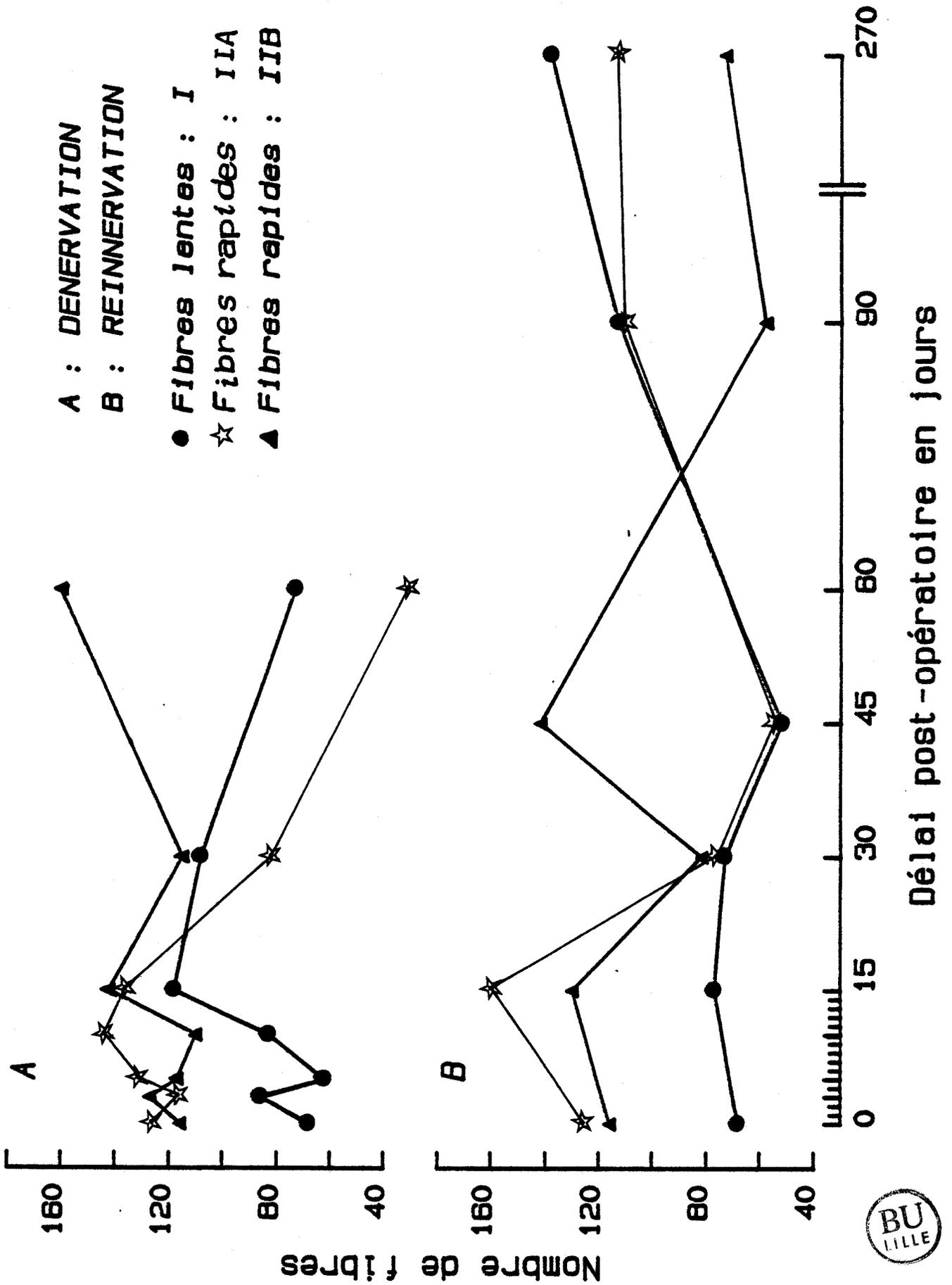


Délat post-opératoire en jours

Figure 35 - Evolution du nombre total de fibres musculaires dans le muscle sternocéphalique de Lapin dénervé et réinnervé.

Le zéro de l'abscisse correspond à la valeur témoin.

Figure 36 - Evolution de chaque type de fibres musculaires, au cours de la dénervation (A) et de la réinnervation (B), dans le muscle sternocéphalique de Lapin, exprimée en valeurs absolues.
Les points d'abscisse "zéro" correspondent aux valeurs moyennes obtenues chez des animaux témoins.



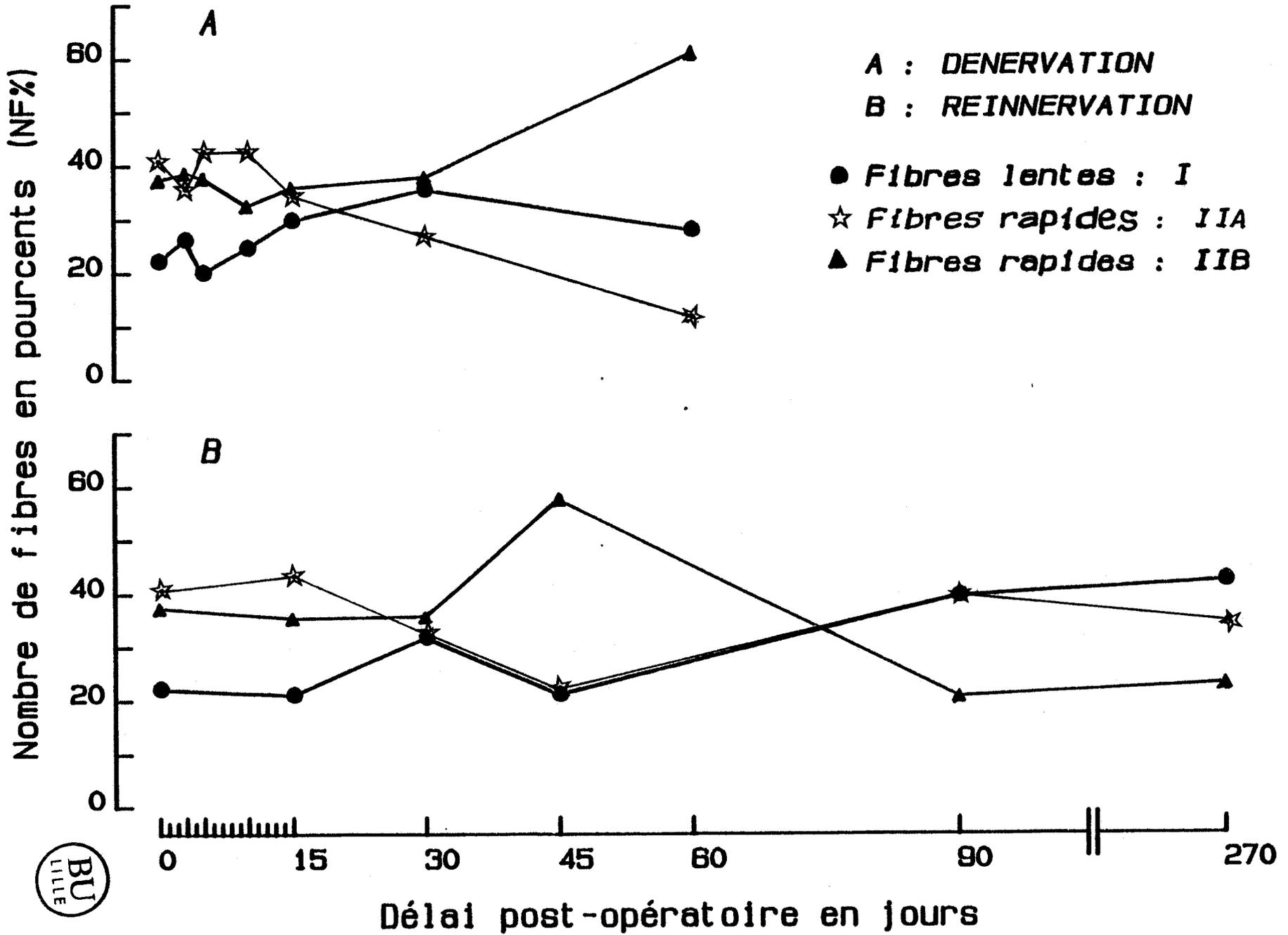
la dénervation semble lié à l'augmentation de l'effectif des fibres F_3 . Quant à la poussée de l'effectif total observée au quinzième jour, elle semble due à l'augmentation du nombre des fibres F_1 et F_3 . Dans les muscles réinnervés, la diminution de l'effectif total, enregistrée trente jours après la suture, est synchrone de la réduction du nombre des fibres F_2 et F_3 , celui des fibres F_1 semble stable. Quant au retour de la population totale de fibres vers un effectif voisin de la normale, il est concomitant, dans un premier temps, d'une importante augmentation du nombre des fibres F_3 et, dans un second temps, de l'accroissement progressif et régulier du nombre des fibres F_1 et F_2 alors que celui des fibres F_3 se réduit. Une analyse des différentes populations de fibres exprimée en pourcentage du nombre total conduit aux mêmes résultats (Fig. 37).

B) REPARTITION SPATIALE DES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES (Fig. 38)

L'étude de la répartition des différents types de fibres, exprimée par le paramètre N_s (nombre de suites), ne peut se concevoir sans faire appel à leurs effectifs respectifs. Ainsi, au cours de la dégénérescence, les fibres F_1 et F_2 paraissent évoluer de la même manière. En effet, pour ces deux types de fibres, les paramètres $N_{s(1)}$ et $N_{s(2)}$ évoluent dans le même sens que l'effectif, ce qui semble indiquer que leur type de répartition est peu affecté. En revanche, les fibres F_3 montrent une tendance au regroupement puisque leur $N_{s(3)}$ diminue alors que leur effectif augmente. Chez les animaux suturés, les paramètres $N_{s(2)}$ et $N_{s(3)}$ varient dans le même sens que les effectifs correspondants bien que le parallélisme entre l'évolution de ces deux paramètres soit plus ou moins étroit. Par contre, en ce qui concerne les fibres F_1 , les évolutions de N_s et de l'effectif témoignent d'une alternance de différentes phases : dispersion pendant le premier mois, stabilité au cours des quinze jours suivants, regroupement ensuite jusqu'au troisième mois à partir duquel la répartition de ces fibres ne semble plus varier.

Figure 37 - Evolution de chaque type de fibres musculaires, au cours de la dénervation (A) et de la réinnervation (B), dans le muscle sternocéphalique de Lapin, exprimée en % du nombre total de fibres.

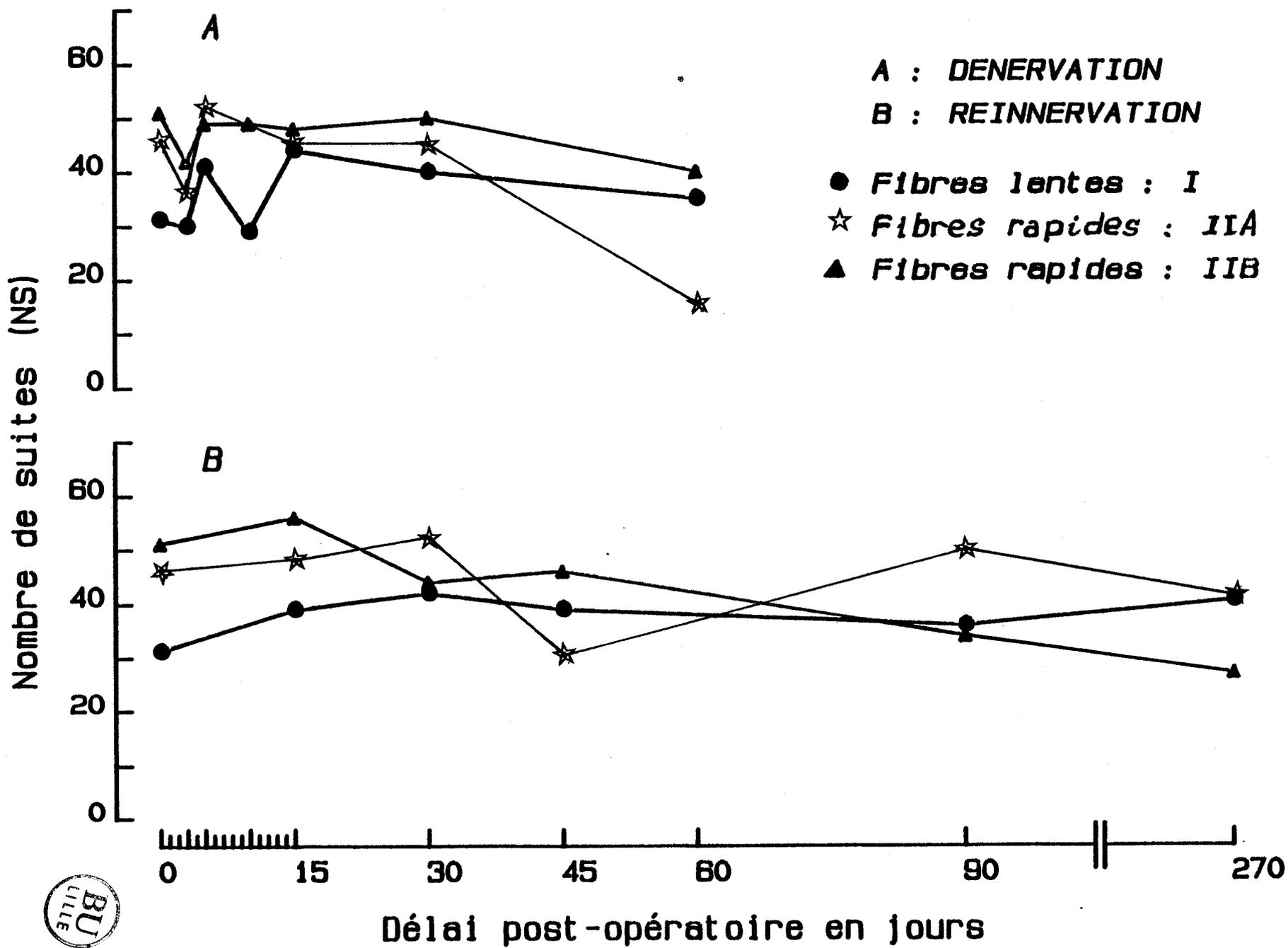
37



BU
LILLE

Figure 38 - Evolution de la distribution spatiale des différents types de fibres musculaires, lors de la dénervation (A) et de la réinnervation (B), du muscle sternocéphalique de Lapin.

38



BU
LILLE

II - DISCUSSION

L'étude de la composition du muscle sternocéphalique en différents types de fibres que nous avons effectuée est bien sommaire. Nous sommes parfaitement conscients qu'elle ne représente qu'une ébauche de réponse à la question que nous nous étions posée, et nous n'avons pas la prétention d'affirmer que nous avons fait une réelle étude statistique. En effet, le nombre d'échantillons que nous avons analysé par stade expérimental est bien trop faible pour cela. Toutefois, les résultats qu'elle fournit, bien qu'ils méritent d'être approfondis et confirmés, nous apportent déjà des enseignements intéressants.

Au cours de la dégénérescence (Fig. 35), et jusqu'au quinzième jour après dénervation, on assiste principalement à une augmentation de l'effectif total des fibres, suivie d'une réduction qui se ralentit à partir du premier mois. L'analyse de l'évolution de chaque type de fibres (Fig. 36) révèle que cette augmentation est due à un accroissement du nombre de toutes les catégories de fibres et principalement des F_1 . La réduction, quant à elle, est provoquée d'une part, par le retour des F_1 à leur effectif normal, d'autre part à une forte diminution des F_2 . La réduction moindre observée à partir du trentième jour est vraisemblablement due à l'accroissement de l'effectif des F_3 . La comparaison de l'effectif des fibres F_1 et F_2 et de leurs paramètres $Ns_{(1)}$ et $Ns_{(2)}$ semble indiquer que leur répartition spatiale reste stable. En effet, à partir du moment où ces deux paramètres évoluent dans le même sens, on est en droit de considérer que cette répartition ne change pas. Quant aux fibres F_3 , elles ont tendance à se regrouper puisque leur effectif s'accroît alors que leur paramètre de distribution ($Ns_{(3)}$) diminue. Ces évolutions de la population des fibres du muscle sternocéphalique aboutissent, deux mois après dénervation, à un muscle qualitativement différent du muscle témoin. En effet, si chez ceux-ci, le pourcentage des F_2 et F_3 est sensiblement égal (respectivement 41 % et 37 %) largement majoritaires devant les F_1 (22 %) dans les muscles dénervés, les F_3 représentent de loin le contingent le plus important de fibres (51 %) devant respectivement les F_1 (28 %), puis les F_2 (11 %) (Fig.37).

L'évolution du nombre total de fibres, au cours du premier mois

qui suit une suture, est semblable à celle qui est observée après dénervation (Fig. 35), après quoi les tendances s'inversent et l'effectif total des fibres du muscle réinnervé se retrouve, après neuf mois, proche de celui des muscles témoins. Ce retour à la normale à partir du 45ème jour est le résultat de la tendance évolutive inverse de celle observée lors de la dénervation. En effet, cette fois, on assiste à une augmentation du nombre de fibres F_1 et F_2 et à une réduction du nombre de fibres F_3 .

La répartition spatiale des fibres F_2 et F_3 est, en gros, celle qu'elles ont chez le témoin puisque, lorsque leurs effectifs augmentent, leur nombre de suites augmente également et vice versa. En revanche, les F_1 ont tendance à se disperser pendant les quarante-cinq premiers jours (effectif en faible baisse et nombre de suites en augmentation), on assiste ensuite à un regroupement (augmentation de l'effectif accompagnée d'une diminution du nombre de suites). Ainsi, neuf mois après suture, on aboutit à une composition qualitative du muscle sternocéphalique dans laquelle les F_1 représentent la catégorie la plus importante (42 %), devant les F_2 (35 %) et les F_3 (23 %) (Fig. 37).

Après ces quelques réflexions sur les résultats que nous avons obtenus, voyons ce que la bibliographie nous apporte à ce sujet. Face aux modifications fonctionnelles auxquelles ils sont soumis, les muscles striés squelettiques adaptent leur masse et leurs protéines contractiles. Ces adaptations peuvent se faire soit par conversion d'un type de fibre en un autre, soit par néo-formation de fibres à partir de cellules satellites, soit par les deux processus (MAIER et al, 1986). Ces différentes propositions ont été faites à la suite d'expériences utilisant des protocoles différents tels que la réinnervation d'un muscle lent par des motoneurones destinés, à l'origine, à un muscle rapide et vice versa (DUM et al, 1985a et b), la stimulation prolongée d'un muscle rapide (MAIER et al, 1986) ou encore la cordotomie (MUNSON et al, 1986).

L'évolution de la composition du muscle sternocéphalique, lors des différentes situations expérimentales que nous lui avons imposées, se rapproche de celle décrite par MAYER et al (1984) qui notent, dans le muscle

gastrocnémien médian de Chat après cordotomie, d'une part une augmentation des fibres II_B(F3) et d'autre part, une chute des fibres II_A(F2) et I(F1). Pour SWYNGHEDAUW (1986), la dénervation d'un muscle lent entraîne la synthèse de fibres rapides si bien que des muscles hétérogènes deviendraient homogènes par transformation des fibres lentes en fibres rapides (GAUTHIER et LOWEY, 1977 ; CARRARO et al, 1981a et b ; GAUTHIER et HOBBS, 1982). Enfin, si la cordotomie entraîne la transformation d'un muscle lent en muscle rapide, sa réinnervation par des fibres rapides n'assure pas cette transformation (DUM et al, 1985b).

Lors de la réinnervation du muscle sternocéphalique par des fibres sensibles vagales, nous avons observé un enrichissement de ce muscle en fibres lentes (42 % de F₁ au lieu de 22 % chez le Témoin). Des résultats analogues aux nôtres ont été obtenus par BALDWIN et al (1975) et GREEN et al (1983) qui, dans des muscles de rats soumis à un programme intensif, ont montré une augmentation des fibres I qui passent de 10 à 27 % et une transformation des fibres II_B en fibres II_A. Cette dernière constatation a également été faite chez des lapins dont le muscle tibialis antérieur a été soumis, à long terme et d'une manière intermittente, à des stimulations à basse fréquence (SWYNGHEDAUW, 1986). Les mêmes résultats ont été décrits par HOWALD (1982) chez des athlètes en entraînement d'endurance et par MAIER et al (1986) chez des lapins dont le muscle extensor digitorum longus était soumis, indirectement, à des stimulations de 10 Hz, douze heures par jour, pendant quatre semaines. Enfin, en réinnervant, chez le Chat, le muscle flexor digitorum longus (muscle rapide) par des motoneurons innervant à l'origine le muscle solaire (muscle lent), DUM et al (1985a) ont observé une importante augmentation de la population des fibres lentes. Par contre, la réinnervation de ce muscle par ses propres motoneurons préserve son intégrité histologique et fonctionnelle. Ces derniers résultats rappellent ceux que nous avons obtenus lors de la réinnervation du muscle sternocéphalique (muscle essentiellement rapide) par des fibres sensibles vagales puisque la composition qualitative du muscle réinnervé diffère de celle du muscle témoin. Ceci suggère que les fibres vagales réinnervantes et les fibres du nerf spinal accessoire ont des caractéristiques différentes, l'une d'elles réside dans le fait que les afférences vagales, à majorité amyélinique et de petit diamètre, déchargent d'une manière très lente.

CONCLUSION GENERALE

L'ultrastructure des jonctions neuromusculaires du muscle sterno-céphalique de Lapin a été étudiée dans trois situations :

- chez des animaux témoins ;
- au cours de leur dégénérescence après dénervation du muscle sterno-céphalique consécutive à la section du nerf spinal accessoire ;
- au cours de la réinnervation du muscle sternocéphalique par des afférences vagales après suture croisée hétérogène nerf vague sensitif-nerf spinal accessoire.

Il ressort de cette étude que les jonctions neuromusculaires témoins présentent les mêmes caractéristiques que celles décrites dans la littérature chez les Mammifères. La composante nerveuse renferme des vésicules jonctionnelles et des mitochondries. L'axolemme préjonctionnel présente des zones actives qui sont soulignées par la présence d'un matériel dense aux électrons. C'est à leur niveau que les vésicules viennent libérer leur contenu. Cette terminaison axonique est coiffée par une cellule de Schwann terminale qui forme un couvercle, isolant l'ensemble du site jonctionnel du milieu extérieur. La composante musculaire est formée, quant à elle, d'une sole musculaire riche en glycogène et en mitochondries. Elle forme une gouttière dans laquelle vient se loger la terminaison axonique. A ce niveau, le sarcolemme postjonctionnel s'invagine en une multitude de plis constituant l'appareil sous-neural.

La dénervation du muscle sternocéphalique induit la dégénérescence de ces jonctions neuromusculaires. La cinétique de ce processus a été étudiée en suivant le devenir de ces plaques motrices 24, 48, 72 heures et deux mois après dénervation. Dans un premier temps, c'est la composante nerveuse qui se désorganise : 24 heures après dénervation, l'effectif des vésicules jonctionnelles chute ; ces vésicules s'agglutinent à proximité de la membrane préjonctionnelle ; les mitochondries gonflent et les crêtes se disposent de façon radiaire. La rétraction de la terminaison axonique élargit l'espace jonctionnel, ce qui permet aux prolongements de la cellule télogliale de venir s'intercaler entre les membranes pré- et postjonctionnelles.

Quarante-huit heures après dénervation, on assiste à une accentuation de ces phénomènes. Ainsi, la terminaison axonique se trouve de plus en plus éloignée de la membrane postjonctionnelle et commence à se fragmenter. La gouttière jonctionnelle, ainsi plus ou moins dégagée, est envahie par la cellule de Schwann terminale et du collagène. Ce n'est qu'après soixante-douze heures, alors que la terminaison axonique a disparu et que la gouttière jonctionnelle est totalement occupée par la cellule télogliale et du collagène, que la sole musculaire commence à présenter les premiers signes de désorganisation : réduction du sarcoplasme, altération des mitochondries etc...

L'examen d'échantillons, prélevés deux mois après dénervation, n'a pas permis l'observation de sites jonctionnels reconnaissables. Par contre, l'altération des fibres musculaires est importante.

La réinnervation du muscle sternocéphalique par des afférences vagales a permis, cinq mois après suture croisée hétérogène, l'observation de contacts myoneuraux. Ces jonctions, généralement de petite taille, présentent les deux composantes observées chez les témoins. La terminaison axonique montre des vésicules jonctionnelles, des mitochondries et des zones actives. L'ensemble est couvert, côté externe, par une cellule télogliale. Quant à la composante musculaire, elle présente une membrane postjonctionnelle démunie d'appareil sous-neural et une sole musculaire relativement peu développée. Ces caractéristiques se rapprochent de celles décrites dans les plaques motrices en cours de formation.

Par ailleurs, les fibres musculaires ne semblent pas réagir de la même manière à la dénervation et à la réinnervation. L'évolution de la population de fibres musculaires constituant ce muscle a été étudiée par la technique des ATPases. Cette étude, bien que sommaire, a permis, entre autre, de montrer qu'après réinnervation, le muscle change qualitativement de composition. Muscle mixte à majorité rapide, le sternocéphalique montre après réinnervation, un enrichissement en fibres lentes (I) qui passent de 20 à plus de 40 %.

Tous ces résultats viennent s'ajouter à ceux décrits par nos prédécesseurs pour confirmer la réalité de la réinnervation d'un muscle strié squelettique par des afférences sensibles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AHIDOUCHE, A. (1985)

Etude ultrastructurale des jonctions neuromusculaires au niveau du muscle sternocéphalique de Lapin.
D.E.A., Lille I.

AKERT, K., PFENNINGER, K., SANDRI, C. and MOOR, H. (1972)

Freeze-etching and cytochemistry of vesicles and membrane complexes in synapses of the C.N.S.
Structure and function of synapses, G.D. PAPPAS and D.P. PURPURA (Eds), Raven Press, New York, 67-86.

ALBUQUERQUE, E.X., BARNARD, E.A., CHIU, T.H., LAPA, A.J., DOLLY, J.O., JANSSON, S.E., DALY, J. and WITKOP, B. (1973)

Acetylcholine receptor and ion conductance modulator sites at the murine neuromuscular junction : evidence from specific toxin reactions.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 70, 949-953.

ALBUQUERQUE, E.X., BARNARD, E.A., PORTER, C.W. AND WARNICK, J.E. (1974a)

The density of acetylcholine receptors and their sensitivity in the postsynaptic membrane of muscle end plates.
Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A.), 71, 2818-2822.

ALBUQUERQUE, E.X., KUBA, K. and DALY, J. (1974b)

Effect of histrionicotoxin on the ionic conductance modulator of the cholinergic receptor : a quantitative analysis of the end-plate current.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 189, 513-524.

ALBUQUERQUE, E.X., KUBA, K., LABA, A.J., DALY, J. AND WITKOP, B. (1974c)

Acetylcholine receptor and ionic current modulator of innervated and denervated muscle membranes. Effect of histrionicotoxins.
Cité par RASH, J. et ELLISMAN, M.H., 1974.

ALTMAN, J. (1971)

Coated vesicles and synaptogenesis. A developmental study in the cerebellar cortex of the Rat.
Brain Research, 30, 311-322.

ANOKHINE, P. and IVANOFF, A. (1934)

Materials to the problem of the centre and the periphery in the physiology of neurones activities. III-Communication : The relative estimation of restored sensitive and locomotion fonction in anastomosis of the vagues (en russe).
J. Physiol., U.S.S.R., 17 (5), 938-943.

ATSUMI, S. (1971)

The histogenesis of motor neurons with special reference to the correlation of their endplate formation. I. The development of end plates in the intercostal muscle in the chick embryo.
Acta Anal., 80, 161-182.

ATSUMI, S. (1977)

Development of neuromuscular junctions of fast and slow muscles in the chick embryo. A light and electron microscope study.
J. Neurocytol., 6, 691-709.

BALDWIN, K.M., WINDER, W.W. and HOLLOSZY, J.O. (1975)

Adaptation of actomyosin ATPase in different types of muscle to endurance exercise.

Am. J. Physiol., **229**, 422-426.

BARONE, R. (1980)

Anatomie comparée des animaux domestiques.

Édité chez Vigot.

BARONE, R., PAVAU, C., BLIN, P.C. et CUQ, P. (1973)

Atlas d'anatomie du Lapin.

Édité chez Masson and Cie.

BENNETT, M.R., Mc LACHLAN, E.M., TAYLOR, R.S. (1973a)

The formation of synapses in reinnervated mammalian striated muscle.

J. Physiol., London, **233**, 481-500.

BENNETT, M.R., Mc LACHLAN, E.M., TAYLOR, R.S. (1973b)

The formations of synapses in mammalian striated muscle reinnervated with autonomic preganglionic nerves.

J. Physiol., London, **233**, 501-517.

BIRKS, R.I. (1971)

Effects of stimulation on synaptic vesicles in sympathetic ganglia, as shown by fixation in the presence of Mg⁺⁺.

J. Physiol., **216**, 26P-28P.

BIRKS, R., HUXLEY, H.E. and KATZ, B. (1960a)

The fine structure of the neuromuscular junction of the frog.

J. Physiol., **150**, 134-144.

**BIRKS, R., KATZ, B. and MILEDI, R. (1960b)**

Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction in the course of nerve degeneration.

J. Physiol., London, **150**, 145-168.

BLOOM, F.E. (1972)

Neurotransmitters, Res. Publ. Assoc. for nervous and mental diseases.

I.J. Hopin, ed., pp. 25-57, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.

BROOKE, M.H. and KAISER, K.K. (1970)

Muscle fibre types : how many and what kind ?

Arch. Neurol., **23**, 369-379.

BURNSTOCK, G. (1983)

Recent concepts of chemical communication between excitable cells.

In Dale's principle and communication between neurones, pp. 7-35. Ed. N.N.

Osborne, Pergamon Press, Oxford.

BURRY, R.W., KNISS, D.A. and SCRIBNER, L.R. (1984)

Mechanisms of synapse formation and maturation.

Current topics in research on synapses, **1**, 1-51.

CAJAL, S.R.Y. (1909)

Histologie du système nerveux de l'Homme et des Vertébrés.

Maloine Ed., Paris, 986 p.

CARRARO, U., CATANI, C. and DALLA LIBERA, L. (1981a)

Myosin light and heavy chains in rat gastrocnemius and diaphragm muscles after chronic denervation or reinnervation.

Exp. Neurol., **72**, 401-412.

CARRARO, U., CATANI, C., DALLA LIBERA, L., VAXON, M. and ZANNELLA, G. (1981b)

Differential distribution of tropomyosin subunits in fast and slow rat muscles and its changes in long term denervated hemidiaphragm.

FEBS Lett., **128**, 233-236.

CECCARELLI, and PENSA (1968)

Sperimentale, **118**, 197.

Cité par MANOLOV, S. et OVTCHAROFF, W., 1982.

CHIU, T.H., DOLLY, J.O. and BARNARD, E.A. (1973)

Solubilization from skeletal muscle of two components that specifically bind alpha-Bungarotoxin.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **51**, 205.

CHIU, T.H., LAPA, A.J., BARNARD, E.A. and ALBUQUERQUE, E.X. (1974)

Binding of d-tubocurarine and alpha-bungarotoxin in normal and denervated mouse muscles.

Exp. Neurol., **43**, 399-413.

COGET, J. (1977)

Réinnervation d'un muscle strié squelettique par les axones sensitifs vagues à la suite d'une suture nerveuse hétérogène croisée.

D.E.A., Lille I.

COGET, J. (1980)

Réinnervation d'un muscle strié squelettique par des fibres vagues sensitives.

Thèse Doctorat 3e Cycle, Lille I.

COGET, J. and ROUSSEAU, J.P. (1983)

Reinnervation of striated muscle by peripheral vagal fibres cut above or below the nodose ganglion in the cat and rabbit.

J. Physiol., **335**, 481-493.

COUTEAUX, R. (1944)

Compt. rend. soc. biol., **138**, 976-.

Cité par COUTEAUX, R., 1960.

COUTEAUX, R. (1947)

Contribution à l'étude de la synapse myoneuronale.

Rev. Canad. Biol., **6**, 563-711.

COUTEAUX, R. (1960)

Motor end-plate structure.

Structure and Function of muscle. I.

Academic Press, New York and London, 337-380.

COUTEAUX, R. et PECOT-DECHAVASSINE, M. (1970a)

L'ouverture des vésicules synaptiques au niveau des "zones actives".
Favard, P., ed., Microscopie électronique, Paris, Soc. Franc. Micr. Electr.,
3, 709-710.

COUTEAUX, R. et PECOT-DECHAVASSINE, M. (1970b)

Vésicules synaptiques et poches au niveau des "zones actives" de la jonction neuromusculaire.
C.R. Acad. Sci., Paris, 271, 2346-2349.

COUTEAUX, R. et PECOT-DECHAVASSINE, M. (1973)

Données ultrastructurales et cytochimiques sur le mécanisme de libération de l'acétylcholine dans la transmission synaptique.
Arch. ital. Biol., III, 231-262.

CREVIER, M. and BELANGER, L.F. (1955)

Simple method for histochemical detection of esterase activity.
Science, 122, 256-259.

DELBARRE, G., SENON, D., BARSOTTI, J., JOBARD, F., DELBARRE, B. et DUJARDIN, C. (1974)

Néoformation de plaques motrices. Etude histochimique.
Ann. Histochemie, 19, 221-226.

DEL CASTILLO, J. and KATZ, B. (1954)

Changes in end-plate activity produced by presynaptic polarization.
J. Physiol., London, 124, 586-604.

DELORME, P. (1971)

Etude ultrastructurale du développement des capillaires, de leur environnement et des modifications de leur perméabilité à la peroxydase du Raifort dans le télencéphale du Poulet, au cours de l'embryogenèse et de la croissance postnatale, Thèse d'état, 232 pages.

DELORME, P. et ROUSSEAU, J.P. (1985)

Suture croisée vague sensitif-spinal accessoire chez le Mouton : analyse ultrastructurale des populations de fibres nerveuses.
J. Physiol., Paris, 80, 45A.

DENNIS, M.J. (1981)

Development of the neuromuscular junction : inductive interactions between cells.
Ann. Rev. Neurosci., 4, 43-68.

DE ROBERTIS, E.D.P. and BENNETT, H.S. (1955)

Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm.
J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1, 47-58.

DREYER, F., PEPPER, K., AKERT, K., SANDRI, C. and MOOR, H. (1973)

Ultrastructure of the "active zone" in the frog neuromuscular junction.
Brain Research, 62, 373-380.

DUM, R.P., O'DONOVAN, M.J., TOOP, J. and BURKE, R.E. (1985a)

Cross-reinnervated motor units in cat muscle. I. Flexor digitorum longus muscle units reinnervated by soleus motoneurons.
Journal of Neurophysiology, 54 (4), 818-836.

DUM, R.P., O'DONOVAN, M.J., TOOP, J., TSAIRIS, P., PINTER, M.J. and BURKE, R.E. (1985b)

Cross-reinnervated motor units in cat muscle. II. Soleus muscle reinnervated by flexor digitorum longus motoneurons.

Journal of Neurophysiology, **54** (4), 837-851.

DUSSARDIER, M. (1960a)

Recherches sur le contrôle bulbaire de la motricité gastrique chez les ruminants.

Thèse d'état, Paris, 199 p.

DUSSARDIER, M. (1960b)

Forme fluctuante des potentiels d'unités motrices d'un diaphragme réinnervé.

C.R. Soc. Biol., **154**, 34-38.

EVANS, D.H.L. and MURRAY, J.G. (1954)

Histological and functional studies on the fibre composition of the vagus nerve of the rabbit.

J. Anat., **88**, 320-337.

FALEMPIN, M. (1981)

Contribution à l'étude des afférences vagales digestives chez l'animal éveillé.

Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, Lille I.

FALEMPIN, M., GOMBERT, J.P. et ROUSSEAU J.P. (1977)

Réinnervation du muscle mastoïdo-huméral par des axones sensitifs vagues chez le Lapin.

J. Physiol., Paris, **73**, 20A.

FALEMPIN, M. and ROUSSEAU, J.P. (1983)

Réinnervation of skeletal muscles by vagal sensory fibres in the sheep, cat and rabbit.

J. Physiol., **335**, 467-479.

FAMBROUGH, D.M. and HARTZELL, H.C. (1972)

Acetylcholine receptors : number and distribution at neuromuscular junctions in rat diaphragm.

Science, **176**, 189-191.

FARDEAU, M. (1973)

Caractéristiques cytochimiques et ultrastructurales des différents types de fibres musculaires squelettiques extra-fusales (chez l'Homme et quelques Mammifères).

Ann. Anat. Path., **18**, I, 7-34.

FAWCETT, D.W. and SELBY, C.C. (1958)

Observations on the fine structure of the turtle atrium.

J. Biophys. Biochem. Cytol., **4**, 63-71.

FENG, T.P., WU, W.Y. and YANG, F.Y. (1965)

Selective reinnervation of a slow or fast muscle by its original motor supply during regeneration of a mixed nerve.

Scientia sin., **14**, 1717-1720.

FERTUCK, H.C. and SALPETER, M.M. (1974)

Localization of acetylcholine receptor by ^{125}I -labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates.

Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), **71**, 1376-1378.

FEX, S., SONESSON, B., THESLEEF, S., ZELENA, J. (1966)

Nerve implants in botulinum poisoned mammalian muscle.

J. Physiol., London, **184**, 872-882.

FLOURENS (1828)

Cité par LANGLEY, J.N. and ANDERSON, H.K. (1904).

Ann. des Sci. Naturelles. III, 113.

FOLEY, J.O. and DUBOIS, F.S. (1937)

Quantitative studies of the vagus nerve in the cat : I-the ratio of sensory to motor fibers.

J. Comp. Neurol., **67**, 49-67.

FRANK, E., JANSEN, J.K.S., LOMO, T. and WESTGAARD, R.H. (1975)

The interaction between foreign and original motor nerves innervating the soleus muscle of rats.

J. Physiol., London, **247**, 725-743.

GAUTHIER, G.F. and HOBBS, A.W. (1982)

Effects of denervation on the distribution of myosin isozymes in skeletal muscle fibers.

Exp. Neurol., **76**, 331-346.

GAUTHIER, G.F. and LOWEY, S. (1977)

Polymorphism of myosin among skeletal muscle fiber types.

J. Cell Biol., **74**, 760-779.

GAUTHIER, G.F. and PADYKULA, H.A. (1966)

Cytological studies of fiber types in skeletal muscle.

J. Cell. Biol., **28**, 333-354.

GORDON, T., HIVEN-JENKINS, N. and VRBONA, G. (1980)

Observations on neuromuscular connections between the vagus nerve and skeletal muscle.

Neurosci, **5**, 597-610.

GREEN, H.J., REICHMANN, H. and PETTE, D. (1983)

Fibre type specific transformations in the enzyme activity pattern of rat vastus lateralis muscle by prolonged endurance training.

Pfüegers Arch., **399**, 216-222.

GRINNELL, A.D., LETINSKY, M.S. and RHEUBEN, M.B. (1979)

Competitive interaction between foreign nerves innervating frog skeletal muscle.

J. Physiol., London, **289**, 241-262.

GRINNELL, A.D. and RHEUBEN, M.B. (1979)

The physiology, pharmacology and trophic effectiveness of synapses formed by autonomic preganglionic nerves on frog skeletal muscle.

J. Physiol., London, **289**, 219-240.

GRUBER, H. (1978)

Motor innervation of striated oesophageal muscle. Part. 2 : Characteristics of the oesophagomotor fibres in the rat studied by implanting the vagus nerve into a skeletal muscle.

J. Neurol. Sci., **36**, 171-186.

GRZYBOWSKI, J. (1936)

Etude expérimentale sur la répartition du nerf pneumogastrique chez le Lapin.

C.R. Assoc. Anat., **31**, 189-196.

GUNDERSEN, H.J.G. (1977)

Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profile : the edge effect.

J. Microsc., **111**, 219-223.

GUTH, L. (1968)

"Trophic" influences of nerve on muscle.

Physiol. Rev., **48**, 645-687.

GUTMANN, E. (1945)

The reinnervation of muscle by sensory nerve fibers.

J. Anat., **79**, 1-8.

GUTMANN, E. and HAZLIKOVA, V. (1967)

Effects of accessory nerve supply to muscle activated by implantation into muscle during regeneration of its nerve.

Physiologia Bohemoslov., **16**, 244-250.

GUTMANN, E. and YOUNG, J.Z. (1944)

The reinnervation of muscle after various periods of atrophy.

J. Anat., **78**, 15-43.

GWYN, D.G. and AITKEN, J.T. (1966)

The formation of new motor endplates in mammalian skeletal muscle.

J. Anal., **100**, 111-126.

HARRIS, A.J. (1974)

Inductive functions of the nervous system.

Ann. Rev. Physiol., **36**, 251-305.

HEUSER, J.E. and REESE, T.S. (1973)

Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction.

J. Cell. Biol., **57**, 315-344.

HEUSER, J.E., REESE, T.S. and LANDIS, D.M.D. (1974)

Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze-fracture.

J. Neurocytol., **3**, 108-131.

HOH, J.F.Y. (1971)

Selective reinnervation of fast-twitch and slow graded muscle fibres in the toad.

Expl. Neurol., **30**, 263-276.

HOH, J.F.Y. (1975)

Selective and non-selective reinnervation of fast-twitch and slow-twitch rat skeletal muscle.

J. Physiol., London, **251**, 791-801.

HORVAT, J.C., PECOT-DECHAVASSINE, M. et MIRA, J.C. (1987)

Réinnervation fonctionnelle d'un muscle squelettique du Rat adulte au moyen d'un greffon de nerf périphérique introduit dans la moëlle épinière par voie dorsale.

C.R. Acad. Sc., Paris, **304**, série III, n° 6.

HOWALD, H. (1982)

Training-induced morphological and functional changes in skeletal muscle.

Int. J. Sports Med., **3**, 1-12.

HUXLEY, A.F. and ZUBAY, G.J. (1961)

Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy.

J. Biophys. Biochem. Cytol., **11**, 273-296.

IP, M.C. and VRBOVA, G. (1973)

Motor and sensory reinnervation of fast and slow mammalian muscles.

Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., **146**, 261-279.

JIRMANOVA, I. and THESLEFF, S. (1976)

Motor end-plates in regenerating rat skeletal muscle exposed to botulinum toxin.

Neuroscience, **1**, 345-347.

JONES, D.G. (1975)

Synapses and synaptosomes, morphological aspects.

Chapman and Hall, Ltd., London.

KANASEKI, I. and KODATA, K. (1969)

The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of guinea pig brain, with special reference to the mechanisms of membrane movement.

J. Cell. Biol., **42**, 202-220.

KARNOVSKY, M.J. and ROOTS, L. (1964)

A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterase.

J. Histochem. Cytochem., **12**, 219-221.

KELLY, A.M. and ZACKS, S.I. (1969)

The fine structure of motor endplate myogenesis.

J. Cell. Biol., **42**, 154-169.

KEMP, G., DOLLY, J.O., BARNARD, E.A. and WENNER, C.E. (1972-1973)

Reconstitution of a partially purified endplate acetylcholine receptor preparation in lipid bilayer membranes.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **55**, 1044-1050 (Reprint of 1972, **54**).

KOELLE, G.B. and FRIEDENWALD, J.S. (1949)

A histological method for localizing cholinesterase activity.

Proc. soc. expt. biol. med., **70**, 617-622.

KOENIG, J. et PECOT-DECHAVASSINE, M. (1971)

Relations entre l'apparition des potentiels miniatures spontanés et l'ultrastructure des plaques motrices en voie de réinnervation et de néoformation chez le Rat.

Brain Research, **27**, 43-57.

KONIG, N., ROCH, G. and MARTY, R. (1975)

The onset of synaptogenesis in Rat temporal cortex.

Anat. Embryol., **148**, 73.

KORNELIUSSEN, H. (1972a)

Ultrastructure of normal and stimulated motor-endplates with comments on the origin and fate of synaptic vesicles.

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie, **130**, 28-36.

KORNELIUSSEN, H. (1972b)

J. Neurocytol., **1**, 279.

Cité par MANOLOV, S. et OVTSCHAROFF, W., 1982.

KORNELIUSSEN, H., BARSTAD, J.A. and LILLEHEIL, G. (1972)

Vesicle hypothesis : effect of nerve stimulation on the synaptic vesicles of motor endplates.

Experientia, **28**, 1055-1057.

KORNELIUSSEN, H. and SOMMERSCHILD, H. (1976)

Ultrastructure of the new neuromuscular junctions formed during reinnervation of rat soleus muscle by a "foreign" nerve.

Cell. Tiss. Res., **176**, 439-452.

KULLBERG, R.W., LENTZ, T.L. and COHEN, M.W. (1977)

Development of the myotomal neuromuscular junction in *Xenopus laevis* : An electrophysiological and fine structural study.

Dev. Biol., **60**, 101-129.

LANDMESSER, L. (1971)

Contractile and electrical responses of vagus-innervated frog sartorius muscles.

J. Physiol., London, **213**, 707-725.

LANDMESSER, L. (1972)

Pharmacological properties, cholinesterase activity and anatomy of nerve-muscle junctions in vagus-innervated frog sartorius.

J. Physiol., London, **220**, 243-256.

LANGLEY, J.N. and ANDERSON, H.K. (1904)

The union of different kinds of nerve fibres.

J. Physiol., London, **31**, 365-391.

LARRAMENDI, L.M.H., KICKENSCHER, L. and LEMKEY-JOHNSTON, N. (1967)

Synaptic vesicles of inhibitory and excitatory terminals in the cerebellum.

Science, **156**, 967-969.

LUFT, J.H. (1961)

Improvements in epoxy resin embedding methods.

J. Biophys. Biochem. Cytol., **9**, 409-414.

LUND, R.D. and WESTRUM, L.E. (1966)

Synaptic vesicle differences after primary formalin fixation.

J. Physiol., London, **185**, 7P-9P.

MAIER, A., GAMBKE, B. and PETTE, D. (1986)

Degeneration-regeneration as a mechanism contributing to the fast to slow conversion of chronically stimulated fast-twitch rabbit muscle.

Cell. Tissue Res., **244**, 635-643.

MANOLOV, S. (1967)

Investigations on the morphology of synaptic vesicles of the spinal cord of the cat.

C.R. Acad. Bulg. Sci., **20(5)**, 493-495.

MANOLOV, S. and OUTSCHAROFF, W. (1982)

Structure and cytochemistry of the chemical synapses.

International review of cytology, **77**, 243-284.

MAYER, R.F., BURKE, R.E., TOOP, J., WALMSLEY, B. and HODGSON, J.A. (1984)

The effect of spinal cord transection on motor units in cat medial gastrocnemius muscle.

Muscle nerve, **7**, 23-31.

Mc ARDLE, J.J. and ALBUQUERQUE, E.X. (1973)

A study of the reinnervation of fast and slow mammalian muscles.

J. Gen. Physiol., **61**, 1-23.

MILEDI, R. (1960)

The properties of regenerating neuromuscular synapses in the frog.

J. Physiol., London, **154**, 190-205.

MILEDI, R. and SLATER, C.R. (1970)

On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section.

J. Physiol., London, **207**, 507-528.

MILEDI, R. and STEFANI, E. (1969)

Non-selective reinnervation of slow and fast muscle fibres in the rat.

Nature, Lond., **222**, 569-571.

MIRA, J.C. (1977)

Etudes quantitatives sur la régénération des fibres nerveuses myélinisées. III. Variations du nombre et du calibre des fibres régénérées après une congélation localisée.

Archives d'Anatomie microscopique et de Morphologie expérimentale, **66**, n° 1.

MOHLANT, M. (1913)

Le nerf vague. Etude anatomique et expérimentale. III. Les ganglions périphériques du vague.

Le neurone, **15**, 521-579.

MUNSON, J.B., FOEHRING, R.C., LOFTON, S.A., ZENGEL J.E. and SYPERT, G.W. (1986)

Plasticity of medial gastrocnemius motor units following cordotomy in the cat.

Journal of Neurophysiology, **55** (4), 619-634.

OGATA, T., HONDO, T. and SEITO, T. (1967)

An electron microscopic study on differences in the fine structures of motor endplate in red, white and intermediate muscle fibers of rat intercostal muscle. A preliminary study.

Acta Med. Okayama, **21**, 327-338.

OGATA, T. and YAMASAKI, Y. (1984)

Scanning electron microscope studies on the Schwann cells in rat motor endplates with special reference to their finger-like projections.

Arch. histol. jap., **47** (5), 533-539.

OGATA, T. and YAMASAKI, Y. (1985)

The three-dimensional structure of motor endplates in different fiber types of rat intercostal muscle. A scanning electron-microscopic study.

Cell. Tissue Res., **241**, 465-472.

PAGE, S.G. (1965)

A comparison of the fine structures of frog slow and twitch fibres.

J. Cell. Biol., **26**, 477-497.

PALADE, G.E. and PALAY, S.L. (1954)

Electron microscope observations of international and neuromuscular synapses.

Anat. Record, **118**, 335-336.

PEPER, K., DREYER, F., SANDRI, C., AKERT, K. and MOOR, H. (1974)

Structure and ultrastructure of the frog motor endplate.

Cell. Tissue Res., **149**, 437-455.

RANVIER, L. (1874)

De quelques faits relatifs à l'histologie et à la physiologie des muscles striés.

Arch. physiol. Norm. Path., **2**, ser. I, 5-15.

RASH, J.E. and ELLISMAN, M.H. (1974)

Studies of excitable membranes. I. Macromolecular specializations of the neuromuscular junction and the junctional sarcolemma.

J. Cell. Biol., **63**, 567-586.

REGER, J.F. (1954)

Anat. Record, **118**, 344.

Cité par COUTEAUX, R., 1960.

REGER, J.F. (1955)

Anat. Record, **122**, 1.

Cité par COUTEAUX, R., 1960.

REGER, J.F. (1957)

The ultrastructure of normal and denervated neuromuscular synapses in mouse gastrocnemius muscle.

Exptl. Cell. Research, **12**, 662-665.

REGER, J.F. (1959)

Studies on the fine structure of normal and denervated neuromuscular junctions from mouse gastrocnemius.

Ultrastructure Research, **2**, 269-282.

REYNOLDS, E.S. (1963)

The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.

J. Cell. Biol., **17**, 208-212.

RICHARDS, J.G. and TRANZER, J.P. (1970)

The ultrastructural localisation of amine storage sites in the central nervous system with the aid of a specific marker, 5-hydroxydopamine.

Brain Res., **17**, 463-469.

ROBERTSON, J.D. (1954)

Anat. Record, **118**, 346.

Cité par COUTEAUX, R., 1960.

ROBERTSON, J.D. (1956a)

Some features of the ultrastructure of reptilian skeletal muscle.

J. biophys. biochem. cytol., **2**, 369-380.

ROBERTSON, J.D. (1956b)

The ultrastructure of a reptilian myoneural junction.

J. biophys. biochem. cytol., **2**, 381-394.

ROMAN, C. (1967)

La commande de la motricité oesophagienne et sa régulation.

Thèse de Doctorat ès Sciences, Marseille, 181 p.

ROUSSEAU, J.P. (1970)

Contribution à l'étude de la rumination et de l'éruclation chez le Mouton.

Thèse de Doctorat d'état, Aix-Marseille, 156 p.

ROUSSEAU, J.P. and FALEMPIN, M. (1984)

Reinnervation of a striated muscle by vagal sensory axons.

Journal of the Autonomic Nervous System, **10**, 217-223.

SANDRI, C., VAN BUREN, J.M. and AKERT, K. (1977)

Prog. Brain Res., **46**,

Cité par MANOLOV, S. et OVTCHAROFF, W., 1982.

SCHMIDT, H. and STEFANI, E. (1976)

Reinnervation of twitch and slow muscle fibres of the frog after crushing the motor nerves.

J. Physiol., London, **258**, 99-103.

SISTO-DANEO, L. and FILOGAMO, G. (1974)

Ultrastructure of developing myo-neural junctions. Evidence for two patterns of synaptic area differentiation.

J. submicro. cytol., **6**, 219-228.

SISTO-DANEO, L. and FILOGAMO, G. (1975)

Differentiation of synaptic area in slow and fast muscle fibers.

J. submicro. cytol., **7**, 121-132.

SOTELO, C. (1971)

General features of the synaptic organization in the central nervous system. *Chemistry and brain development advances in experimental medicine and biology* (R. Paoletti and A.N. Davison, eds, vol. 13, 239-280. Plenum, New York.

STEIN, J.M. and PADYKULA, H.A. (1962)

Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *Amer. J. Anat.*, **110**, 103-124.

STELZNER, D.J., MARTIN, A.H. and SCOTT, G.L. (1973)

Early stages of synaptogenesis in the cervical spinal cord of the chick embryo. *Z. Zellforsch.*, **138**, 475.

SWYNGHEDAUW, B. (1986)

Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiological Reviews*, **66**, n° 3, 710-771.

TACHIKAWA, T. and CLEMENTI, F. (1979)

Early effects of denervation on the morphology of junctional and extrajunctional sarcolemma. *Neuroscience*, **4**, 437-451.

TAKAHASHI, T., NAKAJIMA, Y., HIROSAWA, K., NAKAJIMA, S. and ONODERA, K. (1987)

Structure and physiology of developing neuromuscular synapses in culture. *The Journal of Neuroscience*, **7** (2), 473-481.

TAXI, J. (1965)

Contribution à l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. *Ann. Sci. Nat. Zool.*, **7**, 413-674.

TSUJI, S. (1974)

On the chemical basis of thiocholine methods for demonstration of acetylcholinesterase activities. *Histochemistry*, **42**, 99-110.

UCHIZONO, K. (1965)

Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature*, **207**, 642-643.

USHERWOOD, P.N.R., COCHRANE, D.G. and REES, D. (1968)

Changes in structural, physiological and pharmacological properties of insect excitatory nerve-muscle synapses after motor nerve section. *Nature*, **218**, 589-591.

VALDIVIA, O. (1971)

Methods of fixation and the morphology of synaptic vesicles. *J. Comp. Neurol.*, **142**(3), 257-274.

VAN ORDEN, L.S., BLOOM, F.E., BARNETT, R.J. and GIARMAN, N.J. (1966)

J. Pharmacol. Exp. Ther., **154**, 185.

Cité par MANOLOV, S. et OVTSCHAROFF, W., 1982.

VERAN C.L. and LUCO, S.V. (1967)

Reinnervation of smooth and striated muscle by sensory nerve fibers.

J. Neurophysiol., **30**, 620-627.

VERMA, V. and REESE, T.S. (1984)

Structure and distribution of neuromuscular junctions on slow muscle fibers in the frog.

Neuroscience, **12**, n° 2, 647-662.

VRENSSEN, G., DE GROOT, D. and BOESTEN, A. (1981)

Electron microscopy in neurobiology.

Methods in Neurobiology, vol. 2, 433-500, ed. by R. Lahue (Plenum Publishing Corporation, 1981).

WALBERG, F. (1965)

A special type of synaptic vesicles in Boutons in the inferior olive.

J. Ultrastruct. Res., **12**, 237(B6).

WATSON, M.L. (1958)

Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.

J. Biophys. Biochem. Cytol., **4**, 475-478.

WEISS, P. (1934)

Motor effects of sensory nerves experimentally connected with muscles.

Anat. Rec., **60**, 437-448.

WEISS, P. (1935)

Experimental innervation of muscles by the central ends of afferent nerves (establishment of a one neurone connection between receptor and effector organ), with functional test.

J. Comp. Neurol., **61**, 135-175.

WEISS, P. and EDDS, P. (1945)

Sensory-motor nerve crosses in the rat.

J. Neurophysiol., **8**, 173-194.

WERNIG, A., PECOT-DECHAVASSINE, M. and STOVER, H. (1980)

Sprouting and regression of the nerve at the frog neuromuscular junction in normal conditions and after prolonged paralysis with curare.

Journal of Neurocytology, **9**, 277-303.

ZALEWSKI, A.A. (1970)

Effects of reinnervation on denervated skeletal muscles by axons of motor, sensory and sympathetic neurons.

Am. J. Physiol., **219**, 1675-1679.

ZELANDER, T. and EKHOLM, R. (1960)

Determination of the thickness of electron microscopy sections.

J. Ultrastruct. Res., **4**, 413-419.

