

INNERVATION DU MUSCLE RÉTRACTEUR ANTÉRIEUR DU BYSSUS (ABRM) DE *Mytilus edulis* L.

IV. Étude par le microscope électronique à balayage

par

JACQUES GILLOTEAUX (*) (**) et GÉRARD PONCHEL

Laboratoires de Biologie animale et de Microscopie électronique
de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (France) et
Laboratoire de Physiologie animale de l'Université de Louvain,
Louvain-la-Neuve (Belgique)

RÉSUMÉ

Grâce au microscope électronique à balayage, nous avons pu obtenir des informations complémentaires relatives à l'organisation spatiale des terminaisons nerveuses du muscle rétracteur antérieur du byssus (ABRM) de *Mytilus*. Nous avons notamment retrouvé les deux types de jonctions neuro-musculaires évoqués précédemment.

SUMMARY

With the scanning electron microscope, some complementary informations about the spatial organization of the nerve terminals of the anterior byssus retractor muscle (ABRM) in *Mytilus* have been obtained. Especially, the two types of neuromuscular junctions previously noted have been rediscovered.

INTRODUCTION

Dans plusieurs contributions antérieures, nous avions décrit divers aspects de l'histologie nerveuse du muscle rétracteur antérieur du byssus (ABRM) de *Mytilus edulis* L. (Gilloteaux, 1970, 1971, 1972). Aussi, avant de présenter une étude effectuée par le microscope électronique par transmission, nous voudrions compléter nos premiers travaux en relatant ici des résultats obtenus par une étude effectuée à l'aide du microscope électronique par balayage.

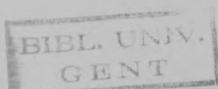
Cette note permet de confirmer nos présomptions et nous vérifions aussi ces résultats histologiques à l'aide de cette nouvelle technique d'observation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Après section des muscles adducteurs des valves et extirpation du manteau et de la plus grande partie de la masse viscérale, les ABRM sont fixés *in situ* pendant

(*) Adresse pour la correspondance : Dr J. Gilloteaux, Department of Physiology, Upstate Medical Center, State University of New York, SYRACUSE, N.Y. 13210 U.S.A.

(**) Cette publication est dédicacée à la mémoire du regretté Professeur G. Vandebroeck.



30 minutes par une solution de glutaraldéhyde à 4 % préparée dans le tampon phosphate (0,15 M) ajusté à pH 7,2. Les paires d'ABRM sont alors détachées des valves avec leurs masses ganglionnaires associées, ganglions cérébro-palléaux et pédiieux. Pour certaines préparations, la fixation est poursuivie par la solution de glutaraldéhyde durant 1 heure. D'autres muscles sont légèrement dilacérés en faisceaux après les avoir découpés en deux parts. Ces derniers sont aussi plongés dans le fixateur pendant 1 heure. Après lavage par la solution tampon (2 fois 30 minutes), la postfixation est obtenue grâce à une solution d' OsO_4 à 1 % préparée dans le même tampon. Les pièces sont alors lavées deux fois 10 minutes par le tampon seul et, enfin, par deux passages de 10 minutes dans de l'eau distillée.

Après lyophilisation, les spécimens sont montés sur des supports d'aluminium à l'aide de vernis à ongles.

Les surfaces des spécimens sont alors recouvertes d'un film d'or-palladium obtenu dans un évaporateur sous vide et soumises à une rotation constante avec une obliquité appropriée du support.

Toutes les pièces préparées furent examinées et photographiées sous le microscope à balayage Cambridge Stereoscan Model S4, à la tension de 20 KV.

RÉSULTATS

Après avoir ôté une grande partie de l'épithélium et du périmysium d'un ABRM, un réseau largement ramifié apparaît à sa surface. Ce réseau paraît bien être constitué par des troncs nerveux plus ou moins épais dont le diamètre s'amenuise distalement par rapport au connectif cérébro-pédiieux (fig. 2,3).

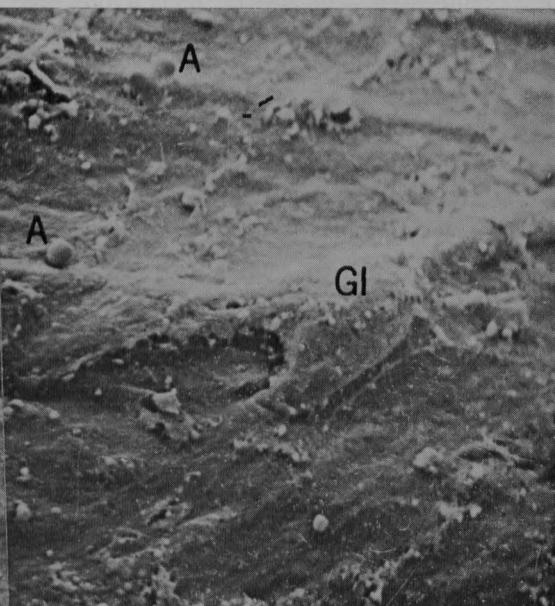
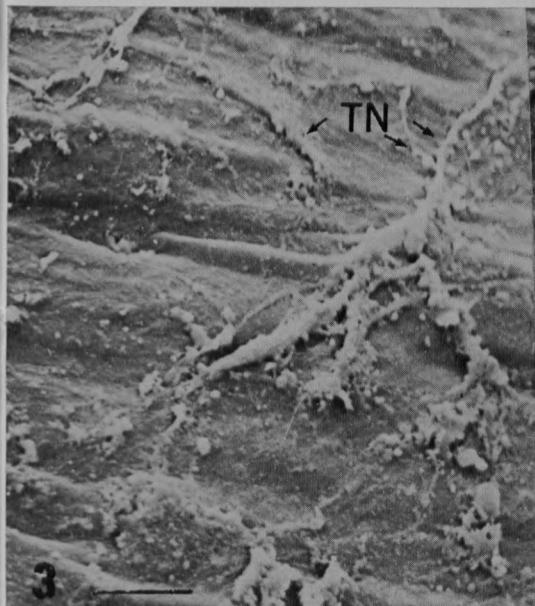
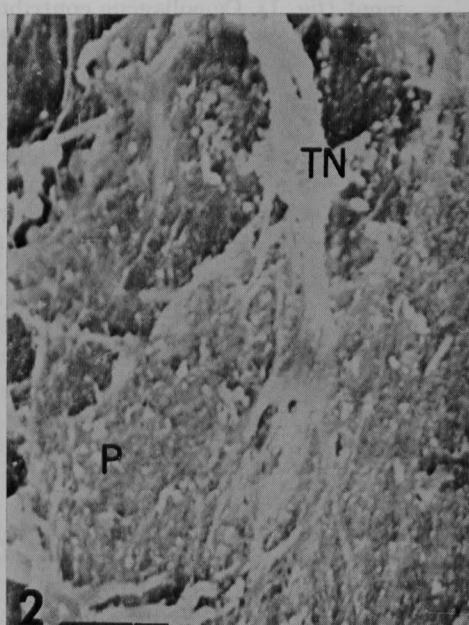
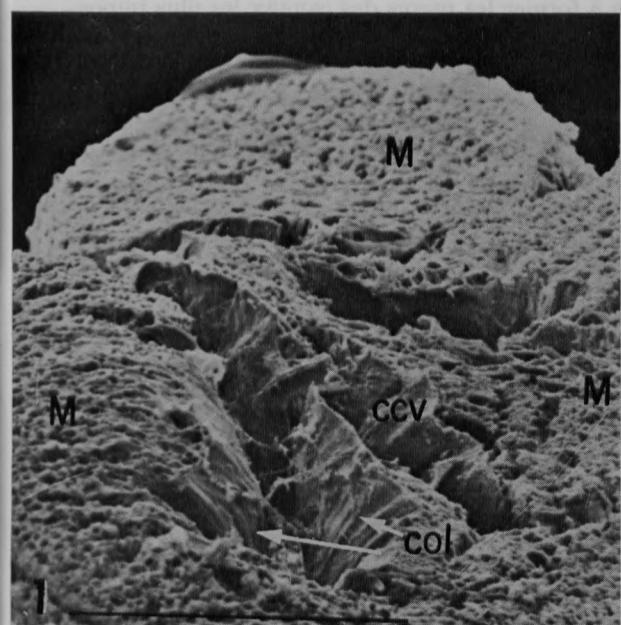
Des corps cellulaires sont reconnus là et là. Ces derniers pourraient être des fibroblastes issus des parois des espaces vasculaires périmusculaires abîmées lors de la dissection ou du conjointif périmysial (fig. 3). Certains de ceux-ci pourraient être des amibocytes issus du contenu des espaces vasculaires. Nous avions montré précédemment que ces espaces, délimités par des nappes collagènes, accentuent le découpage fasciculaire des masses musculaires de l'ABRM (Gilloteaux, 1976). Ce type de structure vasculaire a d'ailleurs été observé par Sanger et al. (1973) dans le muscle protracteur de la radula de *Busycon*. Par ailleurs, cette répartition du

PLANCHE I

Micrographies obtenues par le microscope électronique à balayage :
ABRM de *Mytilus*

- Fig. 1 : Section transversale de la région médiane d'un muscle ; col : nappes de collagène (epimysium) ; ccv : canal vasculaire centromusculaire ; M : faisceaux musculaires ; échelle = 1 mm.
- Fig. 2 : Tronc nerveux (TN) traversant le périmysium tout en libérant de nombreuses collatérales ; échelle = 20 um.
- Fig. 3 : Réseau nerveux apparent après dissection du périmysium ; A : amibocyte ; GI : cellule(s) glio-interstitielle(s) ; TN : troncs nerveux. L'arrière-plan est entièrement constitué d'un film collagène recouvrant les faisceaux de fibres musculaires constituant le muscle ; échelle = 20 um.

PLANCHE I



collagène est nette au niveau des muscles découpés et observés à faible grossissement (fig. 1). Ce collagène contribue à former les parois des canaux les plus importants et ténus du système circulatoire ouvert de l'animal. De plus, les nappes de collagène pérимysial et épimysial s'appuient sur les masses musculaires. Elles contribuent à former un revêtement lisse à l'arrière-plan des champs d'observation. Par endroits, ce revêtement suggère le découpage en faisceaux de l'ABRM (fig. 3,4).

A plus fort grossissement, nous remarquons bien que les troncs nerveux courent étroitement accolés aux faisceaux musculaires. Tout en paraissant quelquefois traverser la nappe collagène, ils libèrent de nombreuses collatérales ténues. Ces dernières présentent sur leur trajet quelques dilatations qui suggèrent l'existence de boutons synaptiques «en passant». Nous pensons, ainsi que nos observations par le microscope électronique par transmission nous l'indiquent, que ces terminaisons agiraient directement sur l'activité contractile des fibres musculaires lisses du péri-myśium susceptibles de régler le flux du liquide circulant dans ce péri-myśium (fig. 4).

Le trajet terminal de certains troncs nerveux a pu être suivi en utilisant les muscles découpés et dilacérés. En effet, nous voyons que des troncs nerveux collatéraux, épais de ± 1 um enserrent ou longent des faisceaux musculaires groupant de 2 à 5 fibres (fig. 5). Au départ de ceux-ci, nous avons pu repérer des prolongements plus étroits, comme en histologie (Gilloteaux, 1972). Ces ramifications terminales présentent des dilatations ou varicosités sur leur trajet tout en étant accolées aux fibres musculaires. Ces dernières présentent nettement des dilatations de type «synapse en passage» (fig. 6).

Dans les zones de fracture tissulaire, sur un arrière-plan de collagène et de cellules glio-interstitielles, nous avons noté des prolongements neuritiques rarement ramifiés et terminés par des structures «en grappe» (fig. 7). Ces dernières sont plus rares et, de plus, essentiellement localisées dans l'épimysium musculaire de l'ABRM.

PLANCHE II

Micographies obtenues par le microscope électronique à balayage :
ABRM de *Mytilus*

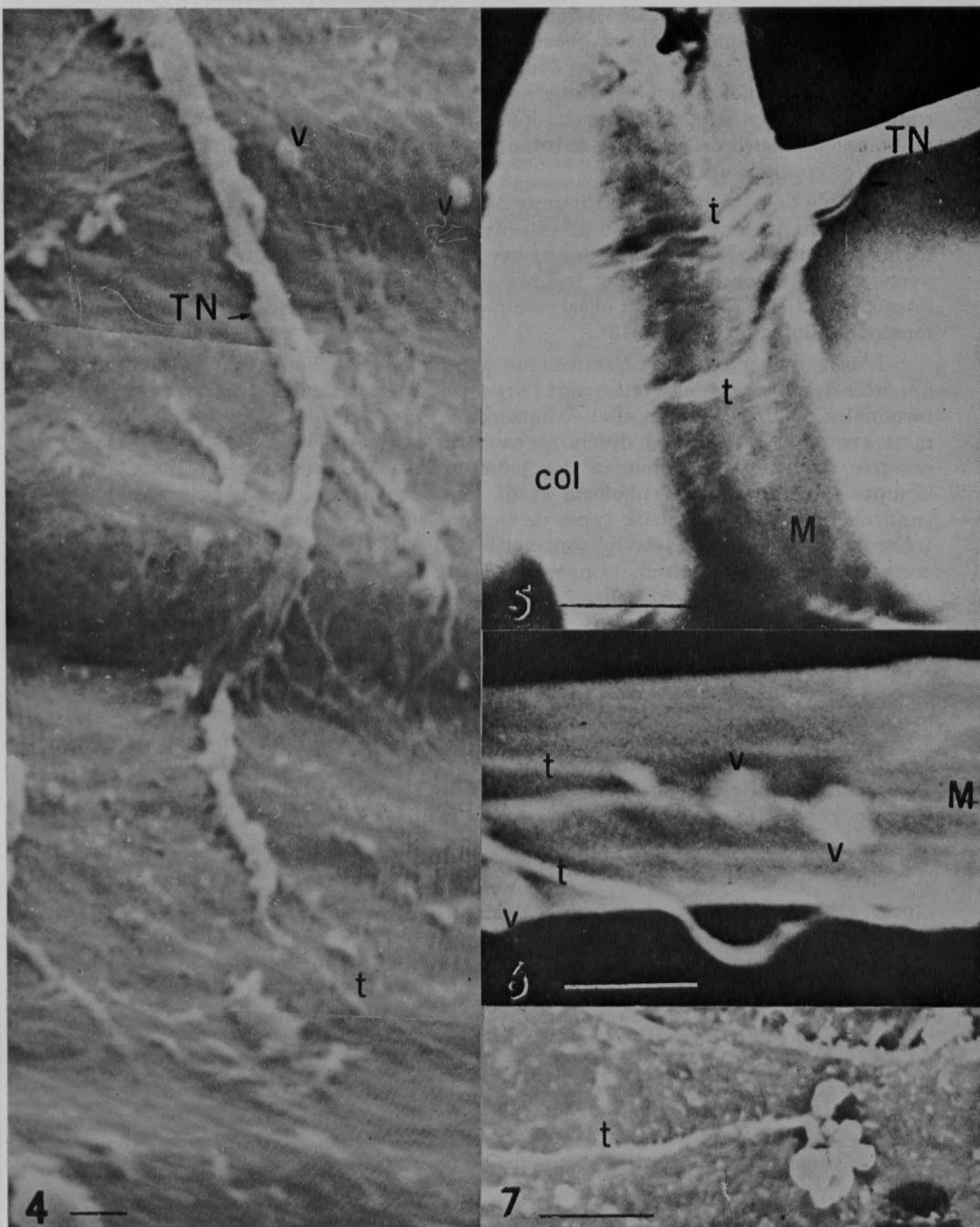
Fig. 4 : Détail d'un tronc nerveux (TN) courant à la surface du péri-myśium accolé aux faisceaux de fibres musculaires. Ce tronc libère des collatérales sous forme de prolongements nerveux terminaux (t) présentant des varicosités (v); échelle = 20 um.

Fig. 5 : Faisceau musculaire étroit composé de 3 fibres (M) entourées de leur collagène (col) endomysial et enserrées par un tronc nerveux étroit. Ce tronc libère au moins 2 collatérales apparentes (t). La brillance du collagène est nettement apparente suite à l'intense réflexion du faisceau électronique incident; échelle = 10 um.

Fig. 6 : Jonctions neuromusculaires «en passant» (v) sur le trajet de prolongements nerveux terminaux (t) courant accolés à une fibre musculaire; échelle = 4,5 um.

Fig. 7 : Jonction «en grappe» à l'extrémité d'un prolongement nerveux (t). La grappe synaptique terminale est apposée à l'endomysium collagène et fait face à une fibre musculaire fracturée après cryo-dessication localisée du côté lecteur; échelle = 5 um.

PLANCHE II



DISCUSSION

En 1954, Twarog isola l'acétylcholine de l'ABRM et décela une activité acétylcholinestérasique ainsi que la présence de 5-hydroxytryptamine (5-HT). Ultérieurement, York et al. (1973) ont pu en évaluer la quantité. De plus, grâce à l'étude des propriétés pharmacologiques, Twarog avait émis l'hypothèse que les deux types de contraction musculaire, phasique et tonique, pouvaient s'interpréter par l'effet isolé ou complémentaire de ces deux substances neurotransmettrices, libérées par deux types de terminaisons nerveuses.

A l'aide de la technique de Champy-Maillet (1959), nous avions mis en évidence diverses structures nerveuses au niveau histologique (Gilloteaux, 1970, 1972). Néanmoins cette méthode ne s'étant pas avérée spécifique d'un neurotransmetteur, nous avons utilisé favorablement des techniques de différenciation histo-chimiques (Gilloteaux, 1974, 1977, 1978) et l'observation par le microscope électronique par transmission (Gilloteaux, 1974, 1975).

L'usage du microscope électronique par balayage a donc pu également nous apporter des observations confirmant l'organisation spatiale des structures nerveuses terminales de l'ABRM. En effet, comme dans le cas de notre étude histologique, nous avons pu retrouver à divers niveaux de ce muscle lisse des troncs nerveux enserrés de leur gaine gliale et des jonctions neuro-musculaires de deux types. Compte tenu de leur morphologie et de leur localisation, ces résultats viennent confirmer l'existence de deux types de terminaisons nerveuses susceptibles de contrôler extrinsèquement l'activité contractile de l'ABRM. Les jonctions « en passage » correspondent aux terminaisons nerveuses à 5-HT alors que les terminaisons de type « en grappe » seraient celles qui libéreraient l'acétylcholine.

REMERCIEMENTS

Toute notre gratitude va à MM. les Professeurs M. Durchon et E. Vivier qui nous ont accueillis dans leurs laboratoires suite à l'invitation du Dr J. Cl. Wissocq. Les frais de séjour et de voyage de J. G. ont été octroyés par le Service de la Direction de la Recherche Scientifique du Ministère de l'Éducation Nationale de Belgique.

BIBLIOGRAPHIE

- GILLOTEAUX, J. (1970). — Innervation du muscle rétracteur antérieur du byssus chez *Mytilus edulis* L. *C.R. Soc. biol. Paris*, **164**; 1439-1445.
- GILLOTEAUX, J. (1971). — Smooth muscle interoceptors. *Die Naturwissenschaften*, **58**; 271-272.
- GILLOTEAUX, J. (1972). — Innervation of the anterior byssal retractor muscle (ABRM) in *Mytilus edulis* L. I. Histology. *Z. Zellforsch.*, **124**; 204-216.
- GILLOTEAUX, J. (1974). — Aspects morphologiques des systèmes de contrôle de la contraction du muscle rétracteur antérieur du byssus (ABRM) de *Mytilus edulis* L., Thèse Dr Sc Université de Louvain.
- GILLOTEAUX, J. (1975). — Innervation of the anterior byssal retractor muscle (ABRM) in *Mytilus edulis* L. II. Ultrastructure of the glialinterstitial cells. *Cell Tiss. Res.*, **161**; 511-519.
- GILLOTEAUX, J. (1976). — Les spécialisations membranaires des fibres musculaires lisses d'un Mollusque : Ultrastructure du muscle rétracteur antérieur du byssus (ABRM) de *Mytilus edulis* L. (*Mollusca Pelecypoda*). *Cytobiologie*, **12**; 440-456.

- GILLOTEAUX, J. (1977). — Innervation du muscle rétracteur antérieur du byssus (ABRM) de *Mytilus edulis* L. III. Localisation histo chimique des terminaisons nerveuses à 5-hydroxytryptamine. *Histochemistry*, **51**; 343-351.

GILLOTEAUX, J. (1978). — Innervation du muscle rétracteur antérieur du byssus (ABRM) de *Mytilus edulis* L. et de *Mytilus galloprovincialis* L. V. Localisation cyto chimique d'activités cholinestérasiques. *Histochemistry*, sous presse.

MAILLET, M. (1959). — Modification de la technique de Champy au tétraoxyde d'osmium iodure de potassium. Résultats de son application à l'étude des fibres nerveuses. *C.R. Soc. biol. Paris*, **153**; 939-941.

SANGER, J. W. and R. B. HILL (1973). — The contractile apparatus of the radular protractor muscle of *Busycon canaliculatum*. *Proc. malac. Soc. Lond.*, **40**; 335-341.

TWAROG, B. M. (1954). — Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-HT. *J. Cell. comp. Physiol.*, **44**; 141-163.

YORK, B. and B. M. TWAROG (1973). — Evidence for the release of serotonin by relaxing nerves in molluscan smooth muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **44 A**; 423-430.