

PREMIERES TENTATIVES D'IMAGERIE RMN SUR DES INSECTES.

D. FRESNEAU¹, C. DANTAS DE ARAUJO^{1,2}, S.K. KAN³, P. GONORD³, J.M. JALLON⁴.

¹ Laboratoire d'Ethologie et Sociobiologie URA CNRS n° 667 Université Paris XIII F-93430 Villetaneuse -France, ² Université Fédérale de Sergipe, CAPES/MEC -Brésil, ³ Institut d'Electronique Fondamentale URA CNRS n° 22 Université Paris XI F-91405 Orsay cedex -France et ⁴ Laboratoire de génétique et Biologie évolutives C.N.R.S F-91198 Gif-sur-Yvette -France.

Résumé: Des explorations préliminaires d'imagerie RMN d'insectes ont été réalisées à l'Institut d'Electronique Fondamentale de l'Université d'Orsay sur une fourmi de grande taille et une drosophile. Les résultats obtenus sont actuellement limités mais prometteurs car ils montrent certains éléments anatomiques bien contrastés comme le tractus digestif, les masses musculaires et les corps gras. Dans le cas de la fourmi, des glandes importantes comme la glande labiale et les glandes maxillaires peuvent aussi être identifiées mais la mise au point de la méthode doit être poursuivie pour réaliser des applications morphologiques plus fines.

Mots-clés: Microscopie RMN, Morphologie, Formicidae, Drosophilidae.

Summary: First applications of NMR microscopy on insects.

Preliminary applications of NMR microscopy techniques were conducted on a big ant and a drosophila. Results obtained so far are limited but promising as they show clearly the digestive apparatus, muscles and fat of these insects. In the case of the ant, important anatomical structures such as the labial and mandibular glands can also be identified. Work is in progress to improve the NMR method for finer morphological applications.

Key words: NMR microscopy, Morphology, Formicidae, Drosophilidae.

INTRODUCTION

Développée depuis une quinzaine d'années, la technique d'imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est appliquée avec succès en médecine où elle a permis des progrès importants dans l'élaboration de certains diagnostics (Breton et Leroux, 1985). Cette méthode donne non seulement des images anatomiques de bonne qualité, mais également des informations physico-chimiques sur les tissus observés. La mise en oeuvre utilise les propriétés que possèdent certains noyaux d'absorber et de restituer sélectivement l'énergie lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique. Les atomes d'hydrogène présents dans les tissus biologiques possèdent ce magnétisme nucléaire et, placés dans un champ magnétique, peuvent être excités par une onde électromagnétique. L'amplitude du signal qu'ils émettent alors est, notamment, proportionnelle au nombre de noyaux d'hydrogène présents dans l'échantillon principalement dans l'eau et les corps gras. Les techniques d'imagerie par RMN permettent de localiser les positions des noyaux et d'en déduire une image montrant leur répartition dans l'échantillon.

Comme dans les scanners à rayons X et les autres techniques tomographiques, la technique RMN fournit des images en coupe du corps examiné, l'analyse des différentes coupes permettant ensuite de reconstituer les volumes. Mais l'avantage de la RMN est de ne faire intervenir aucun rayonnement ionisant. Dans l'état des connaissances, aucun effet nocif n'a pu être mis en évidence, ce qui permet de réaliser des examens répétés.

L'obstacle majeur à la généralisation des applications RMN aux différents domaines de la biologie résulte de la lourdeur des équipements nécessaires qui ont été spécialement conçus pour des applications médicales. En théorie, rien ne limite son emploi pour explorer des échantillons de petite taille, la mini-imagerie RMN a permis plus récemment d'effectuer des observations sur de petits animaux de laboratoire (rats et souris) et des plantes (House, 1984; Cho et coll., 1988 et Kuhn, 1990).

La construction d'un équipement spécialement conçu pour réaliser des images d'échantillons encore plus réduits à l'Institut d'Electronique Fondamentale de l'Université d'Orsay a permis d'obtenir les premières images RMN d'insectes, en l'occurrence, des Fourmis et des Drosophiles.

L'intérêt de l'adaptation de cette technique d'exploration aux recherches expérimentales sur la biologie des insectes réside dans son insensibilité aux tissus durs, comme la chitine, permettant de livrer aux chercheurs de précieuses informations sur l'état physiologique intérieur de l'animal. En outre, cette technique permettrait d'envisager la répétition du diagnostic plusieurs fois au cours de la vie de l'animal, sans que théoriquement il n'en subisse de dommages.

Par exemple, il est projeté d'utiliser la RMN sur des Drosophiles afin de pouvoir suivre la localisation de marqueurs spécifiques dans les structures nerveuses.

Les avantages de la RMN deviennent aussi évidents pour l'étude d'espèces rares ou difficiles à élever au laboratoire, dans la mesure où ils éviteraient des dissections qui ne peuvent être renouvelées. C'est typiquement le cas de la fourmi que nous étudions au laboratoire: *Dinoponera quadriceps* est une espèce primitive de la sous-famille des Ponerinae, originaire du Brésil. Les fourmis du genre *Dinoponera* sont surtout connues pour compter parmi les plus grandes de la sous-famille des Formicidae avec une taille pouvant atteindre 3 cm (Kempf, 1971). Mais leur principale particularité biologique est de former des sociétés sans reine, la reproduction y est assurée par une ou plusieurs ouvrières fécondées qui font office de reproductrices (Haskins et Zahl, 1971). Nous avons montré (Dantas et coll., 1988) que l'absence de la caste reine est à l'origine d'une compétition aboutissant à des rituels d'agression entre les ouvrières qui partagent la même aptitude à pondre, et ceci avant même d'être fécondées (Dantas et coll., 1990). Il est donc particulièrement intéressant de pouvoir estimer le développement ovarien des jeunes ouvrières pour comprendre comment s'opère la répartition des rôles entre celles qui deviendront des reproductrices fécondées et celles qui resteront des ouvrières stériles. C'est ce type même d'articulation entre l'exploration RMN et une recherche expérimentale sur la biologie de nos fourmis que nous comptons initier par ces essais préliminaires.

MATERIEL ET METHODE.

Les essais ont été réalisés sur l'imageur RMN de l'Institut d'Electronique Fondamentale de l'Université d'Orsay. Cet équipement a été spécialement conçu pour recevoir des sondes contenant des échantillons inférieurs à 4 cm. Etant donné la différence de taille entre les Drosophiles (*D. melanogaster*, environ 2 mm) et les fourmis (*D. quadriceps*, 3 cm), des sondes ont été spécialement construites pour recevoir chacun des échantillons. Ces sondes comprennent une tige de plastique creuse destinée à placer correctement les échantillons au centre du champ magnétique de l'appareil, ce dispositif reprend en miniature la structure utilisée en médecine.

Durant la phase d'acquisition du signal, l'animal doit impérativement rester immobile. Il est donc nécessaire de l'anesthésier, nous avons opté pour une anesthésie gazeuse à l'azote en enfermant la sonde et l'animal dans un tube à essai contenant l'azote.

La phase d'enregistrement est plus ou moins longue suivant le type et le nombre d'images désirées. Dans le cas des fourmis, leur taille relativement grande nous a contraint à visionner séparément l'ensemble tête-thorax et l'abdomen. Pour chacun de ces ensembles, l'enregistrement a été décomposé en une trentaine de coupe de 370 microns d'épaisseur. Le nombre et l'épaisseur des coupes ont été déterminés de manière à réaliser le meilleur compromis possible entre le temps d'enregistrement, l'intensité du signal et la résolution des images. En effet, les coupes les plus fines procurent une meilleure discrimination des détails qui risquent d'être superposés sur des coupes plus épaisses. Mais une faible épaisseur de coupe multiplie d'autant le nombre de coupes nécessaires à l'exploration complète de l'échantillon et par conséquent l'allongement du temps d'enregistrement.

Notre objectif préliminaire étant d'explorer la totalité de nos échantillons nous avons opté pour une anesthésie très poussée de manière à pouvoir réaliser les enregistrements durant plusieurs heures. Les résultats acquis portent donc sur des insectes sacrifiés qui ont été disséqués à l'issue de la phase d'enregistrement afin de comparer la morphologie réelle aux informations obtenues en imagerie RMN. Dans ces conditions, plusieurs plans de coupe transversaux et sagittaux ont été effectués sur les mêmes échantillons afin de reconstituer par la suite en trois dimensions les différentes structures anatomiques les plus significatives.

RESULTATS.

La qualité et la quantité des images obtenues révèlent à la fois l'intérêt et les limites de cette technique d'exploration. Comme il était prévu, la chitine ne gêne en rien la visualisation des structures anatomiques internes, toutefois l'intrication et la nature voisine de certains tissus rendent parfois complexe l'interprétation des images.

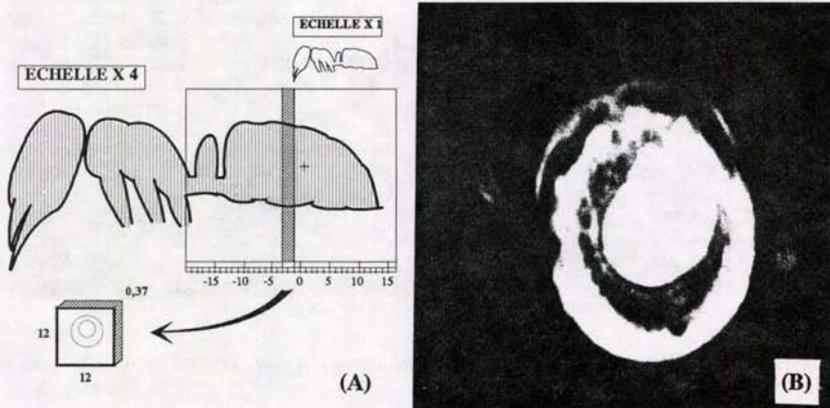


Figure 1: Coupe transversale de l'abdomen d'une ouvrière de *D. quadriceps*. (A) : Situation et dimensions de la coupe, les unités sont notées en millimètres. (B) : Image RMN de la coupe.

Figure 1: The cross sectional view of the abdomen of a *D. quadriceps* female worker. (A) : Site and dimensions (in millimeters of the slice. (B) : NMR image of the slice.

Les masses musculaires apparaissent très nettement dans la tête et le thorax. Au même niveau, certaines glandes comme la glande postpharyngienne, la glande labiale et les glandes mandibulaires présentent un contraste intéressant mais les contours demeurent difficiles à discerner avec rigueur.

En général, les structures nerveuses sont plus difficiles à identifier, mais le tractus digestif apparaît avec le meilleur contraste sur les images, il est logiquement très développé dans l'abdomen.

C'est précisément une coupe transversale de l'abdomen que l'on peut analyser sur les figure 1. Le schéma (A) permet de situer le plan de coupe au niveau du troisième segment abdominal. Le schéma (B) montre le cliché obtenu en RMN, on note au centre une énorme masse blanche parfaitement délimitée qui correspond à l'intestin moyen, sur la partie ventrale apparaissent en grisé les masses graisseuses et sur la partie dorsale plusieurs formations des appareils circulatoire et respiratoire. De chaque côté les portions grisées représentent les masses musculaires des pattes postérieures vues en section. En dehors de l'intestin qui apparaît le plus nettement, il est délicat d'identifier avec une sécurité absolue d'autres éléments anatomiques. Nous n'avons, à ce stade de la mise au point, pas encore pu identifier les ovaires qui se trouvent vraisemblablement confondus avec les corps gras abondants dans la partie postéroventrale de l'abdomen.

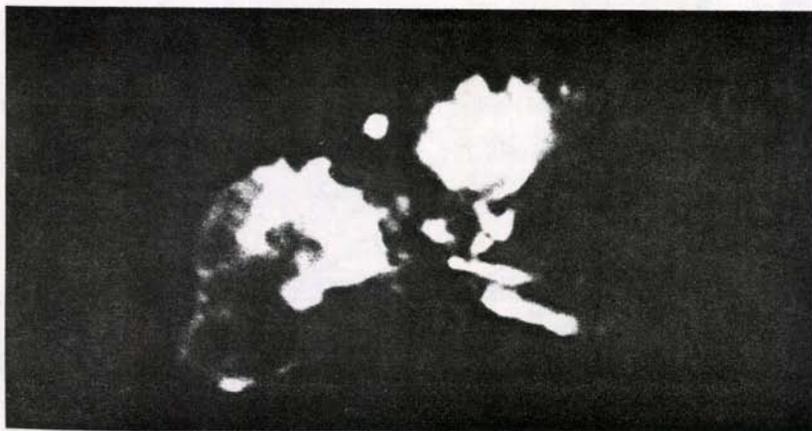


Figure 2: Vue générale de profil de *Drosophila melanogaster*. L'image est de 3 X 4 mm et 85 microns d'épaisseur.

Figure 2: General view of the profile. *Drosophila melanogaster* Image dimension is 3 by 4 mm and slice thickness is 85 microns.

La figure 2 montre en vue sagittale la silhouette complète d'une Drosophile. Il s'agit seulement d'une première exploration préliminaire donnant les éléments le plus marquants apparaissant sur un insecte aussi petit. On reconnaît la structure anatomique globale du corps, la tête, le thorax, les pattes repliées ainsi que des éléments très denses dans l'abdomen. On discerne même certains détails des segments abdominaux.

DISCUSSION.

Les résultats acquis sont encourageants, Ils montrent notamment pour le tractus digestif de la fourmi que les images obtenues pourraient permettre des mesures en volume de cet ensemble anatomique. Il reste cependant trois problèmes à résoudre avant d'entamer véritablement la phase expérimentale de notre recherche:

1° Il est nécessaire d'améliorer les contrastes afin de discriminer plus facilement les corps gras des tissus chargés d'eau, notamment pour tenter de visualiser les ovaires et les ovocytes qu'ils contiennent. De nombreux étalonnages restent encore à tester.

2° il paraît indispensable de reprendre un scanning détaillé par exemple de l'abdomen d'une ouvrière qui sera sacrifiée afin d'effectuer une étude anatomique approfondie par des techniques d'histologies classiques. Seule cette approche pourra nous fournir le témoin morphologique servant à évaluer valablement les performances de la microscopie RMN. Une meilleure connaissance de la morphologie de l'abdomen pourra aussi nous permettre de réduire la zone d'investigation et d'économiser le nombre de coupes lors de l'exploration.

3° Il est enfin important de réduire le temps d'enregistrement durant la phase d'acquisition du signal pour éviter une anesthésie trop longue qui est mal supportée par l'animal. Ce problème devrait être en partie résolu par une modification de la technique d'imagerie utilisée ce qui réduirait par 10 la durée utile de cette phase par rapport aux conditions dans lesquelles nous avons effectué les premiers essais.

Une fois ces contraintes maîtrisées, de multiples applications peuvent être envisagées, non seulement pour répondre aux questions que nous avons posées à l'origine de ce travail, mais aussi dans d'autres problématiques concernant la physiologie des insectes.

REFERENCES.

- BRETON E. et LE ROUX P., 1985. - L'imagerie par résonance magnétique. *La Recherche*, vol 16, n° 172, 1452-1463.
- CHO Z.H., AHN C.B., JUH S.C., LEE H.K., JACOBS R.E., LEE S. Yi J.H. and JO J.M. 1988.- Nuclear magnetic resonance microscopy with 4- μ m resolution: theoretical study and experimental results. *Med. Phys.* **15**, (6), 815-
- DANTAS DE ARAUJO C.Z., FRESNEAU D. et LACHAUD J.P., 1988.-Premiers résultats sur l'éthologie d'une fourmi sans reine: *Dinoponera quadriceps*. *Actes coll., Insectes Sociaux*, **4**, 149-155.
- DANTAS DE ARAUJO C.Z., LACHAUD J.P., et FRESNEAU D., 1990.- Le système reproductif chez une ponérine sans reine: *Dinoponera quadriceps* Sanschi. *Behav. Proc.*, **22**, 101-111.
- HASKINS C.P. and ZAHL P.A., 1971.- The reproductive pattern of *Dinoponera grandis* Roger (Hymenoptera, Ponerinae) with notes on the ethology of the species. *Psyche*, **78**, 87-112.
- HOUSE W. V., 1984.- NMR Microscopy. *IEEE. Trans. N. S.*, **31**, 1, 570-595.
- KEMPF W.W., 1971.- A preliminary review of the ponerine ant genus *Dinoponera* Roger Hym. Formicidae). *Studia Ent.*, **14**, 369-392.
- KUHN W., 1990.-NMR Microscopy - Fundamentals, Limits and possible applications. *Angew. Chem. Int. Engl.*, **29**, 1-19.