

Méthode d'étude de la forme d'une structure microscopique, opaque et solide, appliquée à l'œil d'une fourmi

Marie-Claire CAMMAERTS¹, Alexandre VANDENBUSSCHE², Olivier DEBEIR²

¹ Faculté des Sciences, CP 160/11; ² Faculté des Sciences Appliquées, CP 165; Université Libre de Bruxelles, 50 Av. F. Roosevelt, 1050 Bruxelles, Belgique (e-mail: mtricot@ulb.ac.be ; avdbussc@ulb.ac.be ; odebeir@ulb.ac.be).

Abstract

Method allowing the morphological study of a microscopic, solid and opaque structure, applied to the eye of an ant. - We present an accessible method enabling to see and determine the shape of any microscopic, solid and opaque structure. First, the structure is covered with an acetonic solution of varnish. As soon as the film of varnish is dry, this replicate is removed from the structure and mounted in order to be observed under a microscope. A numerical camera is adapted to the microscope and a series of photos are taken from the upper zone down to the lower zone of the replicate, the gap between two successive photos being ideally always the same (for instance: 2 μm). The series of digital photographs is then analysed using a software such as ImageJ, that can be modified and/or completed according to the research requirement.

Keywords: ant, eye, morphology, Myrmicinae, 3D model.

Résumé

Nous présentons une méthode accessible à tous permettant d'appréhender la forme exacte d'une structure microscopique, opaque et solide. La structure est enduite d'une solution acétonique de vernis. Une fois sèche, la pellicule de vernis est décollée de la structure et montée entre lame et lamelle. Cette préparation est placée sous microscope. Un appareil photographique ou une caméra est adapté au microscope. Le moulage de la structure est photographié une série de fois, en mettant au point à tous ses niveaux, depuis sa zone supérieure jusqu'à sa zone inférieure, le pas entre chaque photo étant idéalement toujours le même (exemple : 2 μm). La série de photos digitales est ensuite analysée à l'aide d'un logiciel approprié (exemple : ImageJ) modifié et /ou complété selon les besoins.

Introduction

La perception visuelle des ouvrières de la fourmi *Myrmica sabuleti* MEINERT 1861 ayant été précisée à l'aide d'études éthologiques (CAMMAERTS, 2004, 2005, 2006, 2007a, 2007b, 2008), il convenait d'étudier anatomiquement et cytologiquement l'œil composé de cette espèce afin d'établir un lien entre la structure de cet organe et les comportements qu'il permet. Dans un premier temps, nous voulions en déterminer la morphologie externe. Nous aurions pu utiliser un microscope électronique à balayage, mais cette technique coûteuse ne permet pas de garder intacte la structure étudiée. Des microscopes stéréoscopiques (loupes binoculaires) de très haut niveau associés à des chambres claires d'excellente qualité ou couplés à des appareils photographiques très performants auraient pu être recherchés. Mais nous avons voulu trouver une technique peu coûteuse, accessible à tous, sauvegardant la structure à étudier, afin de voir et de préciser la forme exacte de cette structure.

Un microscope stéréoscopique (loupe binoculaire) usuel, même d'excellente qualité, ne permet pas d'obtenir une vue suffisamment agrandie de l'œil d'une fourmi du genre *Myrmica*. Un microscope grossissant au moins 400 fois est nécessaire. L'œil, isolé par dissection, est rempli de pigments, donc opaque, et ne laisse pas transparaître sa structure au microscope : on n'aperçoit que quelques ommatidies situées à sa base. Il est donc nécessaire d'imaginer une nouvelle technique. On pourrait réaliser puis observer des moulages transparents de telles structures microscopiques et opaques. La technique serait encore insuffisante car tout appareil optique ne donne une image nette que de la zone située dans sa profondeur de champ. Or l'œil (ainsi que toute autre structure de même caractéristique), et donc son moulage, a une hauteur bien supérieure à celle de cette profondeur de champs. On ne le voit donc jamais en entier. Le dessiner en chambre claire en mettant au point à différents niveaux est long ; le fragile moulage pourrait se dégrader sous l'effet de la chaleur de la lampe du microscope. Il convient donc de mettre au point une technique adéquate simple, utilisable par tous et peu coûteuse afin d'étudier morphologiquement une structure microscopique et opaque telle qu'un œil d'une fourmi du genre *Myrmica*.

Pour obtenir la meilleure vue qui soit d'un œil de guêpe (*Sphex cognatus* SMITH), RIBI (1978) a utilisé une technique de moulage de la cornée (technique des « corneal replicates ») qu'il décrit très succinctement. Il enduit la tête de l'insecte d'un vernis. Après un ou deux jours, il ôte cette pellicule de vernis, la découpe aux ciseaux et la regarde sous microscope. Si le principe de cette méthode est excellent, la technique n'est pas, telle quelle, applicable à une fourmi du genre *Myrmica* (insecte de taille bien inférieure à celle d'un sphex) et ne suffit pas pour obtenir une image nette en tous points et /ou un modèle 3D de la structure à étudier. Nous avons donc modifié et complété la méthode de RIBI (1978), et mis au point, par essais et erreurs, une méthode inédite, aisément accessible, applicable à toute structure opaque et solide. Le présent travail relate cette méthode dans son utilisation générale ainsi que son

application à l'étude d'un œil de fourmi.

Le premier but du présent travail était de voir à un grossissement suffisant, donc sous microscope, la surface externe de la structure à étudier (à savoir, l'œil d'une fourmi du genre *Myrmica*) afin d'en connaître la forme. Le second but était de stocker sous forme informatique, les observations réalisées au microscope. Le troisième but était de mettre au point un outil informatique permettant de visualiser en 3D la surface externe de la structure et d'en extraire diverses données telles que l'aire, le nombre d'éléments etc. ce qui se scinda en trois étapes : obtenir une vue d'ensemble de la structure non plus en une suite d'images mais en une seule image nette en tous points, ce qui permet déjà d'en appréhender valablement la morphologie ; construire un modèle 3D de la structure ; quantifier divers paramètres de la structure : l'aire de sa surface externe, son nombre d'éléments, l'aire moyenne d'un élément.

Matériel et Méthodes

Les fourmis utilisées dans le présent travail étaient des *Myrmica ruginodis* récoltées en juin 2006 dans la vallée de l'Aise (Belgique : 49°49'39"N, 5°15'26"E), dans une carrière abandonnée en reboisement spontané. Elles furent maintenues au laboratoire dans des nids artificiels faits de tubes en verre à moitié remplis d'eau, un bouchon d'ouate séparant l'eau des fourmis. Ces tubes étaient placés dans des bacs en polyéthylène (7 x 23 x 47 cm) aux bords talqués. Les fourmis recevaient en permanence de l'eau sucrée dans de petits tubes en verre bouchés d'ouate et deux fois par semaine, un morceau de blatte tuée par congélation.

Les ouvrières prélevées en vue d'une étude morphologique de leurs yeux étaient des exploratrices circulant sur l'aire de récolte. Celles appelées 'scout' dans ce travail atteignaient un morceau de blatte dans les secondes qui suivaient son dépôt sur l'aire de récolte. Les 'recrutées' atteignaient la nourriture dans les minutes suivantes. Enfin, les 'inactives' n'y parvenaient pas en moins de 15 minutes. Dans la section 'Discussion', nous commentons cette manière de procéder pour classer les ouvrières d'après leur plus ou moins bonne perception visuelle.

La présente étude ne nécessita que l'emploi de matériel de laboratoire aisément disponible (loupe binoculaire, cristalliseur, très fines pinces brucelles, vernis à ongles transparent ou laque, etc.) Le matériel photographique peut être n'importe quel appareil photo numérique ou caméra numérique adaptable au microscope.

Résultats

1. Obtention de moulages

La structure à étudier est éventuellement prélevée de l'insecte et préparée en vue de son étude morphologique. Dans notre cas, une tête d'ouvrière est isolée et débarrassée de ses antennes. La structure est alors immergée dans une solution acétonique de vernis à ongles transparent (acétone et vernis en

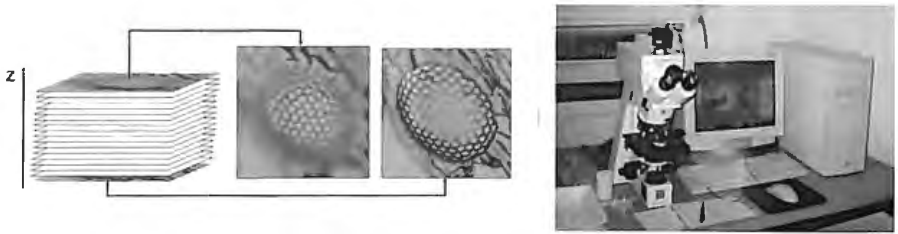


Figure 1. Des observations optiques aux données numériques. Les moulages transparents obtenus des structures à étudier s'observent au microscope mais ne se voient nettement, à chaque position de la vis micrométrique que dans la zone correspondant à la profondeur de champ de l'appareil. Ils sont donc photographiés, tous les $2\ \mu\text{m}$ par exemple, depuis leur zone supérieure jusqu'à leur zone inférieure, et la pile d'images est sauvegardée sur support numérique.

proportions environ égales), puis posée sur sa face ventrale dans un cristalliseur placé sous binoculaire. Après un temps variable (dans notre cas, de dix à vingt minutes), la pellicule de vernis couvrant la structure et ses environs est devenue suffisamment sèche, sans l'être trop, pour être décollée, intacte, de la cuticule de l'insecte. En déchirant judicieusement le moulage, la portion de pellicule couvrant la structure à étudier est séparée du reste de la couverture de vernis et posée sur sa face inférieure, le plus horizontalement possible, sur une lame en verre creuse (ou une lame en verre garnie d'un cadre en papier fort de $33 \times 25\text{mm}$), elle-même ensuite recouverte d'une lamelle en verre (de $32 \times 24\text{mm}$). Ce travail s'effectue sous binoculaire. La préparation microscopique est luttée avec de la paraffine, à l'exclusion d'autres substances dont les solvants dissolvent la pellicule de vernis. Elle ne se détériore pas au cours du temps. Pour effectuer la suite du travail, la préparation est placée sous microscope (Fig. 1). Le moulage transparent s'y voit parfaitement bien, mais au grossissement requis par une étude morphologique détaillée, il ne se voit jamais en entier. Il ne se voit nettement que dans la zone correspondant à la profondeur de champ de l'appareil dûment réglé (Fig. 1). Il y a donc lieu de réaliser le travail décrit ci-après afin de déterminer la forme exacte de la structure à étudier.

2. Transformations des observations optiques en données informatiques

Un appareil photo numérique mis en mode manuel de fonctionnement ou une caméra, est fixé à l'oculaire du microscope. Une série continue de photos est prise, la mise au point étant faite à l'aide de la vis micrométrique du microscope, d'abord sur la zone supérieure du moulage de la structure, puis successivement sur chacune des zones situées en dessous, pour finir par la zone inférieure. Le pas entre chaque photo est, si possible, toujours le même ($2\ \mu\text{m}$) (Fig. 1). Une échelle micrométrique est photographiée dans les mêmes conditions.

3. Traitement des données informatiques

Il existe bon nombre de méthodes et de programmes de traitement d'images sériées. Nous avons choisi comme méthode, celle dite de la recherche en

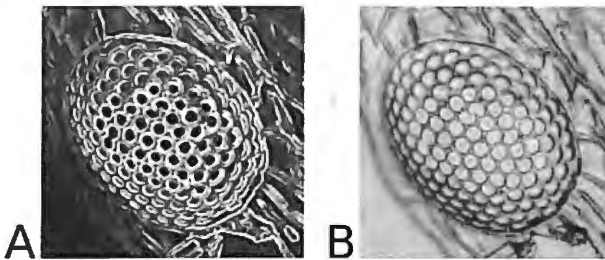


Figure 2. Obtention d'une image de la totalité de la surface externe d'une structure, ici, d'un œil de *Myrmica ruginodis*. La zone antérieure de l'œil est en bas à droite, la zone postérieure en haut à gauche ; le bord ventral est en haut à droite, le bord dorsal en bas à gauche. L'image s'obtient en utilisant soit A : la projection selon l'axe vertical, soit B : la transformée en ondelettes.

parallèle de l'image topologique et de l'image à profondeur de champ étendue (image nette) de la série d'images, et comme outil, l'un des plus utilisés car très pratique, ImageJ (National Institute of Health).

3.1. Obtention d'une image de la totalité de la surface externe de l'œil

Obtenir une image comprenant toutes les parties des images de la série où les éléments sont vus nettement peut se solutionner par : a) la projection selon l'axe vertical ; b) l'utilisation de la transformée en ondelettes.

La méthode de la projection selon l'axe vertical, dont il existe plusieurs variantes, est interne au logiciel ImageJ. En appliquant directement ces variantes à la série d'images recueillies, le résultat obtenu est une image complète mais un peu floue. Il faut donc transformer de manière adéquate la série d'images avant d'y appliquer une quelconque des variantes de cette méthode. Une première transformation en une série d'images de type « 8 bits » permet d'obtenir une image 'totale' assez nette. Un traitement suivant – l'utilisation d'un filtre de variance, consistant à remplacer, pour chaque image, chaque pixel par la variance de tous les pixels du voisinage – procure une image 'globale' aux contours bien plus nets. Ensuite, parmi les différentes variantes de la méthode, celle dite « de la somme » donne le meilleur résultat.

La méthode de la transformée en ondelettes (= Wavelet Transform, WT) se base sur l'existence d'ondes de plus hautes fréquences dans les zones les plus nettes (FORSTER et al., 2004a). L'image obtenue est de meilleure qualité mais son exactitude diminue avec chaque erreur d'alignement d'images de la série (ce qui arrive lorsqu'on recharge l'appareil photo en cours d'opération ou lorsque le moulage oscille un tant soit peu parce que subissant trop longtemps la chaleur dégagée par la lampe du microscope). Divers algorithmes permettent de palier ce problème (BRADLEY & BAMFORD, 2004). Néanmoins, la simple méthode de WT (utilisée dans le *plugin* pour ImageJ développé par FORSTER et al. (2004b)) permet d'obtenir rapidement une image rendant au mieux l'apparence originale de la structure (*de l'œil*) et restant exploitable pour d'autres opérations (calcul d'aires ou de distances, par exemple).

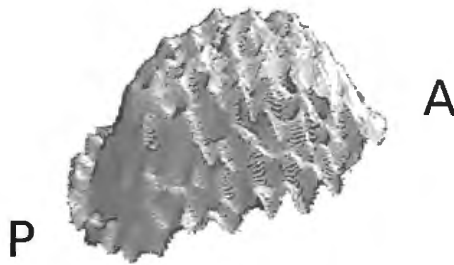


Figure 3. Modèle tridimensionnel d'un œil d'une ouvrière de *Myrmica ruginodis*. a, p : zones respectivement antérieure et postérieure de l'œil.

Les images obtenues de la totalité de la surface externe de l'œil (Fig. 2) montrent que cet organe n'est ni une demi-sphère, ni un demi-ellipsoïde. Son pourtour n'est ni circulaire ni elliptique. De plus, sa base n'est pas plane mais convexe, ce qui se verra mieux sur un modèle 3D. Le versant dorsal est plus étendu que le ventral. La crête allant de l'arrière à l'avant de l'œil est donc ventrale et non située au milieu de l'œil. Le versant antérieur est plus pentu que celui postérieur. La crête allant du bord dorsal au bord ventral de l'œil est donc située dans la zone antérieure et non au milieu de l'œil. Il en résulte que le sommet de l'œil est dans sa zone ventrale et antérieure. Par ailleurs, l'œil est positionné obliquement sur la tête de la fourmi : son pourtour antérieur est plus ventral que son pourtour postérieur. L'avant se reconnaît aux stries très serrées et fines de la cuticule qui jouxte l'œil et elles sont présentes dès le bord de l'œil. L'arrière se caractérise par des stries plus épaisses et espacées de la cuticule et elles sont présentes à partir d'une petite distance du bord de l'œil.

3.2. Construction d'un modèle 3D

Pour construire un modèle tridimensionnel d'une structure – ou plus exactement de son moulage – à partir d'une série d'images sériées de ce moulage, nous avons procédé en deux temps. Nous avons d'abord créé une image topologique, c'est-à-dire une image 2D qui renseigne sur le relief de la zone étudiée, en utilisant le même *plugin* que celui cité en section 3.1. Chaque image de la série est nette en une petite zone qui résulte de la mise au point et de la profondeur de champ du microscope. Sur une image topologique, les couleurs que prend chaque zone indiquent où ces zones sont les plus nettes dans la série d'images, donc leur 'hauteur' dans la structure, depuis le sommet (couleurs proches du noir) jusqu'à la base (couleurs proches du blanc) du moulage (FORSTER *et al.*, 2004b). Cette image topologique peut être affichée en trois dimensions. On peut ensuite lui appliquer l'image à profondeur de champ étendue précédemment acquise, comme on applique une texture à un objet.

Nous avons créé une image topologique de l'œil et l'avons affichée en trois dimensions (Fig. 3). On voit nettement sur un tel modèle que la base de l'œil

n'est pas plane mais courbe, comme la zone de la cuticule sur laquelle elle s'étend. Sa forme est plus complexe que celle d'un demi-ellipsoïde et son sommet n'est pas au centre de sa surface. En fait, on pourrait l'assimiler à quatre secteurs morphologiques jointifs : un antéro-ventral, le plus petit, un antéro-dorsal, un postéro-ventral et un postéro-dorsal, le plus étendu. A cette première observation, s'ajoute celle, à encore vérifier, d'ommatidies différentes, sans doute réparties en des champs physiologiques précis. Dès lors, un second travail plus précis, portant sur 33 individus, a été entrepris. Il vise à préciser la forme exacte de l'œil de trois espèces de *Myrmica*.

3.3. Quantification de divers paramètres

3.3.1. Aire de la surface externe

Calculer cette aire de manière rigoureuse est assez difficile car a) la base de la structure n'est pas toujours située dans un seul plan mais dans deux, voire trois ou quatre, b) nous partons d'un moulage en vernis de cette surface, donc de données sans doute quelque peu faussées concernant son relief. Mais on peut approcher l'aire de la surface externe d'une structure que l'on a pu voir complètement en 3D en assimilant cette structure à une ou plusieurs formes géométriques bien appropriées dont le calcul des aires est connu.

Pour calculer l'aire de la surface de l'œil de manière parfaite, il faudrait préciser la forme et les dimensions des quatre secteurs morphologiques jointifs décrits ci-dessus, en calculer les aires respectives qu'il suffirait ensuite d'additionner. Ces calculs seront effectués à partir d'acquisitions en cours des vues des yeux de trois espèces de *Myrmica*. Néanmoins, dans le présent travail, nous avons voulu approcher l'aire de la partie externe de l'œil de *M. ruginodis* en assimilant la forme de cette partie à celle d'un demi-ellipsoïde. La valeur approchée de la surface d'un tel ellipsoïde est :

$$S \sim 2 \pi a x b (1 - 1/3 P_1 - 1/15 P_2 - 1/35 P_3)$$

où a et b valent la moitié respectivement du grand axe et du petit axe de la base elliptique du demi-ellipsoïde, et où P représente les termes de la série de Legendre utilisée (nous nous sommes arrêtés au troisième ordre de la série). Nous avons calculé de cette manière l'aire de la surface externe de l'œil de onze ouvrières de *M. ruginodis* (Tab. 1). Cette aire varie de $49.660 \mu\text{m}^2$ à $67.149 \mu\text{m}^2$ et vaut donc approximativement $1/20 \text{ mm}^2$.

3.3.2. Nombre d'éléments que comporte la structure

Il est évidemment possible de dénombrer manuellement les éléments (les ommatidies d'un œil) en travaillant sur une image suffisamment nette et agrandie de la totalité de sa surface (image obtenue comme expliqué au point 1). Nous voulions néanmoins mettre au point un outil informatique réalisant (quasi) automatiquement ce dénombrement.

Hormis le fait qu'ils ne sont pas nécessairement tous identiques (cas probable pour les ommatidies de l'œil), les éléments ne sont pas tous orientés, donc visibles, de la même façon. Pour donner une approximation de leur

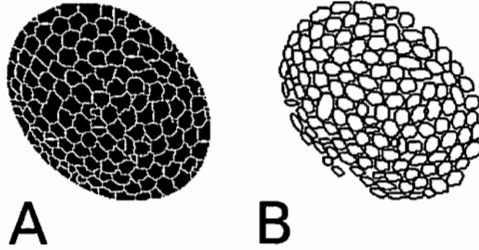


Figure 4. Deux étapes du dénombrement des ommatidies d'un œil de fourmi. L'œil ayant été détourné manuellement et les bords sombres ayant été élargis, on détecte les zones où l'intensité est maximale (image A), sur base de quoi on dénombre ensuite les ommatidies (image B). L'œil montré ici comporte 136 ommatidies.

nombre, nous avons utilisé la méthode dite « de la détection de maxima », ce qui requiert les étapes suivantes.

- Nous avons d'abord détourné l'image de la structure. Les outils informatiques existant pour détourner un objet ne sont pas tous utilisables car la surface entourant la structure présente des détails gênants. Nous avons donc réalisé un détourage manuel, à l'aide d'une forme polygonale, qui fut ensuite remplacée automatiquement par une ellipse.

- Nous avons ensuite augmenté la taille des bords en élargissant les zones sombres afin d'éliminer des résidus blancs qui auraient pu être confondus avec des ommatidies lors du comptage.

- Nous avons alors utilisé l'outil de segmentation d'image « Watershed » (ou « ligne de partage des eaux ») qui permet de séparer très finement les objets en se basant sur les bords présents dans l'image. Sans entrer dans le détail de la technique, cette méthode a l'avantage de fournir une partition de l'image (la somme des objets correspondant à l'image totale), et donc de construire des contours fermés. Puis nous avons remplacé chaque zone claire (correspondant à un élément) par un contour elliptique.

- Enfin, nous avons procédé au dénombrement de ces contours.

De légères différences apparaissent entre les nombres obtenus et les nombres réels mais comme d'autres méthodes tentées donnaient des résultats qui variaient en fonction de la qualité des photos et de leur luminosité, nous avons finalement opté pour la méthode décrite ci-dessus afin d'obtenir une approximation valable du nombre d'éléments d'une structure sans devoir les compter manuellement sur une image à profondeur de champ étendue.

Le nombre d'ommatidies de l'œil a été calculé, en utilisant la méthode décrite ci-dessus (Fig. 4 A et B), pour onze ouvrières de *M. ruginodis*. Il varie de 116 à 149, valant donc 125, en moyenne.

Tableau 1. Surface externe, nombre d'ommatidies et surface moyenne d'une ommatidie de onze ouvrières de *Myrmica ruginodis*.

types de fourmis	surface externe de l'œil (μm^2)	nombre d'ommatidies	aire moyenne d'une ommatidie (μm^2)	moyenne des aires moyennes (μm^2)
scout	59.045	116	509	scout : 475
scout	54.185	116	467	
scout	53.112	118	450	
recrutée	52.377	132	397	recrutée : 445
recrutée	49.660	118	421	
recrutée	54.178	115	471	
recrutée	67.149	149	451	
recrutée	66.666	138	483	
inactive	65.412	136	481	inactive : 450
inactive	50.547	121	418	
inactive	53.455	118	453	

3.3.3. Aire moyenne d'un élément

Sur base de l'aire de la surface externe d'une structure (cf. 3.3.1) et du nombre d'éléments qu'elle contient (cf. 3.3.2), on peut calculer l'aire moyenne d'un élément par simple division arithmétique.

Nous avons ainsi calculé l'aire moyenne d'une ommatidie pour onze ouvrières de *M. ruginodis* (Tab. 1). Cette aire varie de $397 \mu\text{m}^2$ à $509 \mu\text{m}^2$, valant donc approximativement un peu moins de $1/2.000 \text{ mm}^2$. Sur base de nos résultats, on pourrait croire que cette aire moyenne est plus grande pour les ouvrières faisant preuve d'une meilleure vision et devançant par exemple leurs consoeurs lors d'une récolte de nourriture. Cependant, un examen attentif de nos acquisitions photographiques révèle l'existence de différentes sortes d'ommatidies. Leur forme diffère : elles ont 4, 5 ou 6 côtés, rarement 3. Leur taille diffère probablement. Elles sont peut-être localisées en des champs physiologiques précis de l'œil. C'est cette information, inconnue au départ, qu'il nous faut à présent préciser puis considérer pour comparer valablement les yeux d'ouvrières dotées de capacités visuelles différentes. Ce point est traité en discussion.

Tableau 2. Variabilité des mesures effectuées en utilisant les logiciels et méthodes proposées.

La valeur de quatre paramètres d'un même œil a été calculée 50 fois à l'aide des méthodes proposées. Un analyse statistique, résumée dans le tableau, montre le faible pourcentage d'erreur accompagnant chaque mesure

Paramètres	valeur moyenne	écart-type	erreur standard
grand axe	190,42 μm	1,295 μm	0,183 μm
petit axe	141,92 μm	1,397 μm	0,198 μm
aire	49.634,24 μm^2	297,240 μm^2	42,042 μm^2
nombre d'ommatidies	129,66	erreur moyenne : 0,66 son écart-type : 1,836	

4. Fiabilité de la méthode

Une variabilité existe au niveau de la réalisation des moulages qui peuvent être trop épais, trop minces, fendus, éméchés. Mais à partir d'un moulage parfait, la suite des opérations donne des résultats hautement reproductifs.

L'obtention d'une série d'images d'un moulage ne souffre d'aucune variabilité. Tout est mécanique et informatique. Deux études différentes, faites à la main, d'un même moulage ont conduit à la même forme au μm près et au même nombre d'ommatidies à l'unité près.

Nous avons traité une série d'images d'un moulage 50 fois à l'aide des méthodes proposées ici. Les valeurs obtenues pour quatre paramètres du moulage sont très semblables. Elles se distribuent normalement et ne diffèrent entre elles que de quelques unités. Une analyse statistique de ces résultats, résumée en Tab. 2, montre qu'*in fine*, une mesure ne risque d'être entichée que d'une erreur valant environ $1/100^{\text{ième}}$ de sa valeur.

Discussion

Dans l'introduction, nous montrons la nécessité de mettre au point la méthode proposée ici, simple et peu coûteuse, afin de déterminer la morphologie d'une structure microscopique, solide et opaque d'un insecte.

Précisons qu'avant d'être décollée de la structure à étudier, la pellicule de vernis ne doit être ni trop sèche, dure, afin de ne pas se briser lors de son décollement, ni trop molle afin de ne pas se déformer lors de son transfert sur la lame en verre. Le temps de séchage devra donc être adapté lors de chaque manipulation.

Par ailleurs, une série de photos d'un moulage doit être prise d'un seul tenant, sans hiatus, sans arrêt ni reprise, sans modifier quoique ce soit tant au niveau optique qu'au niveau informatique (luminosité, grossissement, réglages, options...), afin de ne pas compromettre certaines des analyses ultérieures.

En ce qui concerne nos résultats relatifs à l'œil de *M. ruginodis*, ils ne sont que préliminaires. Le but du présent travail était de mettre au point une méthode d'étude morphologique à priori sans effectuer de mesures. Nous en avons néanmoins réalisées pour savoir si notre méthode permettait d'atteindre ce niveau. Elle l'atteint effectivement, et de manière hautement reproductible. Deux études faites à la main d'un même moulage montre que l'obtention d'une série d'images ne souffre d'aucune imperfection. Cinquante traitements d'un même moulage montrent, étude statistique à l'appui, que chaque mesure n'est entichée que d'une erreur très faible, bien inférieure à celle accompagnant toute opération humaine. Soulignons, cependant, que cette fiabilité ne vaut que pour des moulages parfaitement bien réalisés.

Sur base de nos résultats préliminaires, il est tentant de croire que les « bonnes voyeuses » d'une société auraient des ommatidies plus grandes que celles de leurs consoeurs. Ce premier résultat n'a aucune valeur statistique. Il existe probablement des différences de capacité visuelle entre les divers membres de la société, comme l'ont souligné DEPICKÈRE et al. (2004), qui

posent la question de savoir si toutes les ouvrières d'une même société de fourmis ont la même sensibilité visuelle. Il serait donc intéressant de poursuivre notre étude comparative des yeux de diverses ouvrières d'un même nid. Mais il faudrait préalablement examiner si toutes les ommatidies d'un œil sont identiques en forme et / ou en taille, et identifier, le cas échéant, les différentes sortes d'ommatidies ainsi que leur nombre et leur répartition. Plusieurs auteurs ont remarqué l'existence de différents types d'ommatidies dans les yeux de certains insectes (QIU et al., 2002 ; STAVENGA 2002 ainsi que les travaux relatifs à ce sujet, cités par ces auteurs) et soulignent qu'aucune cartographie de ces différents types d'ommatidies n'a jamais été réalisée. C'est sur la base d'un tel travail qu'il conviendrait de reprendre l'étude comparative des yeux des ouvrières d'un même nid. D'autre part, pour séparer correctement les exploratrices d'une société d'après leur capacité visuelle, il faudrait se baser non plus sur leur comportement lors d'une récolte de nourriture – comme effectué ici – mais bien sur leur comportement suite à un conditionnement (opérant par exemple) différentiel à deux sigles distincts.

Mais avant de procéder à une telle étude comparative de l'œil des ouvrières exploratrices d'une société de fourmis du genre *Myrmica*, nous devrions préciser les distances allant du sommet de l'œil jusqu'à son point le plus antérieur, postérieur, ventral et dorsal, et par la même occasion, évaluer l'aire de ses versants antéro-ventral, antéro-dorsal, postéro-ventral et postéro-dorsal. Il n'est pas impossible que les ouvrières « bonnes voyeuses » aient une forme d'œil optimale, ni trop longue, large ou haute, et convenant parfaitement bien au fonctionnement de cet organe. Nous envisagerions alors l'existence de différents types d'ommatidies, puis reprendrions l'étude comparative des yeux de congénères à l'appui de toutes les données acquises (distances, aires, types d'ommatidies). Pour parvenir à des observations si détaillées, il n'est pas sans intérêt de tenter d'obtenir une série d'images d'un moulage d'un œil non seulement depuis sa zone supérieure jusqu'à sa zone inférieure mais aussi depuis sa zone antérieure ainsi que postérieure, ventrale et dorsale jusqu'à sa zone de hauteur maximum, ce qui procurerait quatre vues latérales complémentaires de l'œil et pourrait conduire à une reconstruction de meilleure qualité de la forme de l'œil ainsi qu'à une analyse et un dénombrement nettement plus précis de ses ommatidies. L'emploi d'un microscope électronique à balayage est évidemment envisageable mais constituerait une toute autre méthode pour laquelle les avantages « emploi de matériel courant, insecte récupérable, conservation des moulages » seraient exclus. Ajoutons qu'en utilisant la méthode proposée, les moulages défectueux peuvent être refaits, tandis qu'avec un microscope électronique, les pièces mal préparées sont perdues.

Un travail parallèle consisterait à comparer les yeux de diverses espèces de *Myrmica*, leur forme exacte, leurs dimensions, leur nombre et types d'ommatidies. Ce travail se rapprocherait de celui effectué par MOSER et al. (2004) sur des fourmis du genre *Atta*. En effet, des observations préliminaires faites à la loupe binoculaire au grossissement 80 X ont révélé d'une part la nécessité de mettre au point une technique d'étude morphologique et d'autre

part une grande variabilité entre les ouvrières d'un même nid, entre celles de nids différents et entre espèces différentes. C'est cette dernière variabilité qu'il faudrait cerner en premier lieu. C'est pourquoi un second travail est en cours, visant à déterminer la forme exacte des yeux de trois espèces de *Myrmica* et abordant la variabilité entre ouvrières d'un même nid. Rappelons que cette variabilité de la forme et de la taille des yeux des ouvrières d'un nid est indépendante de la précision de la technique elle-même, qui elle, est excellente. La fluctuation des résultats est insignifiante, d'un tout autre ordre de grandeur que les différences existant, entre les ouvrières, au niveau de leurs yeux.

Par après, il conviendrait, pour une espèce donnée, de déterminer avec précision la position des deux yeux sur la tête de l'animal, et d'estimer le champ visuel de celui-ci. Ce travail n'a jamais été réalisé pour une fourmi alors qu'il l'a été pour l'abeille, par exemple par COLLINS (1997). En fait, la perception visuelle de l'abeille (la morphologie et l'ultrastructure de ses yeux, ses capacités visuelles etc...) a fait l'objet d'un bien plus grand nombre d'études que ce qui concerne la vision des Formicidae. Citons, entre autres, les travaux de GRIBAKIN (1975) et ceux particulièrement nombreux d'HORRIDGE (2005 par exemple et ceux qui y sont mentionnés).

Ces études devraient se compléter d'observations histologiques, cytologiques et histochimiques des yeux d'au moins une espèce de *Myrmica*.

Enfin, puisque tel était notre dessein, la méthode mise au point dans le présent travail devrait servir à l'étude d'autres structures encore non connues en détail, comme par exemple l'appareil cuticulaire permettant à certaines espèces de fourmis de striduler.

Remerciements

Nous tenons à remercier très chaleureusement le Prof. L. DE VOS, MM. D. CAMMAERTS, R. CAMMAERTS, G. HOUVENAGHEL et E. TERWINGHE pour leurs multiples aides techniques, conseils, encouragements et corrections de manuscrit. Nous resterons en dette envers le Prof. N. WARZEE qui nous a ouvert les portes de son laboratoire. Enfin, nous remercions sincèrement le referee anonyme qui nous a permis d'améliorer une première version du présent travail et d'effectuer entre autre une analyse statistique de nos résultats.

Références

- BRADLEY A.P. & BAMFORD P.C., 2004. - A One-Pass Extended Depth of field Algorithm Based on the Over-Complete Discrete Wavelet Transform. *Image and Vision Computing '04 New Zealand (IVCNZ'04)*, 279-284.
- CAMMAERTS M.-C., 2004. - Some characteristics of the visual perception of the ant *Myrmica sabuleti*. *Physiological Entomology*, 29 : 472-482.
- CAMMAERTS M.-C., 2005. - Sensitivity and adaptation of *Myrmica sabuleti* workers (Hymenoptera : Formicidae) to light. *Myrmecologische Nachrichten*, 7 : 77-86.
- CAMMAERTS M.-C., 2006. - Discrimination visuelle de formes, de contours, de nombres d'éléments et de l'orientation d'un élément par la fourmi *Myrmica sabuleti*. *Belgian Journal of Entomology*, 8 : 43-54.
- CAMMAERTS M.-C., 2007a. - Perspective vision in workers of *Myrmica sabuleti* MEINERT,

- 1861 (*Hymenoptera* : *Formicidae*). *Myrmecological News*, 10 : 21-26.
- CAMMAERTS M.-C., 2007b. - Colour vision in the ant *Myrmica sabuleti* MEINERT, 1861 (*Hymenoptera* : *Formicidae*). *Myrmecological News*, 10 : 41-50.
- CAMMAERTS M.-C. & CAMMAERTS D., 2008. - Light threshold for colour vision in the ant *Myrmica sabuleti* (*Hymenoptera* : *Formicidae*). *Belgian Journal of Zoology*, in press.
- COLLINS S., 1997. - Reconstructing the Visual Field of Compound Eyes. *Proceedings of the Eurographics Workshop on Rendering Techniques*, 81-92.
- DEPICKERE S., FRESNEAU D. & DENEUBOURG J.-L., 2004. - The influence of red light on the aggregation of two castes of the ant, *Lasius niger*. *Journal of Insect Physiology*, 50 : 629-635.
- FORSTER B., VAN DE VILLE D., BERENT J., SAGE D. & UNSER M., 2004a. - Complex wavelets for Extended Depth-of-Field : A New Method for the Fusion of Multichannel Microscopy Images. *Microscopy Research and Technique*, 65 : 33-42.
- FORSTER B., VAN DE VILLE D., BERENT J., QUACK N., SAGE D. & UNSER M., 2004b. - Extended Depth-of-Field for Color Images in Light Microscopy : Image Fusion and 3D Visualization. *Annual Meeting of the Swiss Society of Biomedical Engineering (SSBE'04)*. sept. 2-3.
- GRIBAKIN F.G., 1975. - Functional morphology of the compound eye of the bee. In : *The Compound Eye and Vision of Insects*, ed : HORRIDGE, G.A., Clarendon Press, Oxford, 154-176 pp.
- HORRIDGE G.A., 2005. - What the honeybee sees ; a review of the recognition system of *Apis mellifera*. *Physiological Entomology*, 30 : 2-13.
- MOSER J.C., REEVE J.D., BENTO J.M.S., DELLA LUCIA T.M.C., CAMERON R.S. & HECK N.M., 2004. - Eye size and behaviour of day- and night- flying leaf cutting ant alates. *Journal of Zoology, London*, 264 : 69-75.
- QIU X., VANHOUTTE K.J.A., STAVENGA D.G. & ARIKAWA K., 2002. - Ommatidial heterogeneity in the compound eye of the male small white, *Pieris rapae crucivora*. *Cell and Tissue Research*, 307 : 371-379.
- RIBI W.A., 1978. - A unique hymenopteran compound eyes. The retina fine structure of the digger wasp *Sphex cognatus* SMITH (*Hymenoptera*, *Sphécidae*). *Zoologisches Jahrbuch für Anatomie*, 100 : 299 - 342.
- STAVENGA D.G., 2002. - Colour in the eyes of insects. *Journal of Comparative Physiology A*, 188 : 337-348.

Received 02 November 2007, accepted 21 May 2008