

Utilisation de la radiographie à rayons X numérique pour la caractérisation des dégâts des insectes sur les graines de conifères

Marion Parizat¹, Alain Chalon¹

Résumé. La dynamique des écosystèmes forestiers et les services écosystémiques qu'ils peuvent rendre sont en grande partie dépendants de la qualité de la fructification des arbres. Les insectes spécialistes des graines peuvent conduire à des destructions massives de graines et à des épidémies de pathogènes dans les forêts naturelles et les plantations. La radiographie à rayons X numérique est un outil particulièrement pertinent pour la caractérisation de ces dégâts, invisibles à l'œil nu. Cette méthode non destructive permet d'explorer le contenu des graines, d'estimer leur potentiel germinatif, et de quantifier la pression parasitaire exercée sur un arbre, une plantation ou un peuplement. Dans cet article, nous présentons le principe de la radiographie à rayons X numérique appliquée à l'analyse de graines de trois espèces de conifères : le cèdre de l'Atlas, le sapin pectiné et le pin de Salzmann. Nous soulignons comment cet outil est également un atout pour l'étude de l'évolution spatio-temporelle des populations d'insectes ravageurs des graines et particulièrement les espèces envahissantes.

Mots clés : radiographie à rayons X, conifères, graine, insectes forestiers, invasion biologique, *Megastigmus*, *Leptoglossus*

Introduction

La production annuelle de graines est un moteur déterminant de la dynamique de régénération des peuplements de conifères naturels, elle est porteuse d'intérêts socio-économiques tels que les programmes de reforestation, de conservation, de préservation des sols, le tourisme « vert » et le commerce des graines. Elle dépend en premier lieu de la qualité de la fructification, c'est-à-dire la production de cônes, qui dépend elle-même de divers facteurs tels que l'âge du peuplement, sa densité, sa composition génétique, du sol et des conditions climatiques. Cependant, une bonne fructification ne garantit pas une bonne production de graines viables parce que les cônes matures peuvent contenir trois types de graines impropres à la germination : (1) des graines de petite taille qui ont avorté très tôt dans la phase de développement, (2) des graines vides de taille identique aux graines viables mais qui ne renferment ni endosperme ni embryon, et (3) des graines endommagées ou consommées par des insectes. Les insectes sont effectivement reconnus pour être la cause principale des dégâts sur graines de conifères avant leur dispersion.

Les insectes séminiphages, qui se nourrissent exclusivement du contenu des graines, sont indétectables par un simple examen visuel d'un cône ou d'une graine car, soit ces insectes se développent exclusivement à l'intérieur de la graine (hyménoptères), soit ils s'en nourrissent directement depuis la surface du cône (hémiptères). Dans un lot de graines collectées, il est donc impossible de discerner celles qui sont viables de celles qui sont consommées ou endommagées. En conséquence, l'évaluation précise des dégâts liés aux insectes séminiphages et leurs possibles impacts écologiques et économiques dans les peuplements de conifères requièrent la mise en œuvre de techniques non-destructives pour les graines, qui permettent d'en caractériser le contenu (viable, parasitée ou vide).

Depuis les années 80, la radiographie à rayons X s'est montrée indispensable à la sélection de graines viables dans le cadre des programmes d'amélioration variétale, de plantation et de reboisement des conifères, reposant sur l'utilisation de collections de graines certifiées et de vergers à graines. La radiographie à rayons X est une technique d'imagerie de transmission qui permet d'obtenir un cliché des différences de densité d'un objet, dont le contraste dépend à la fois de l'épaisseur et du coefficient d'atténuation des structures traversées. Dans le cas d'une graine, les rayons X sont plus ou moins absorbés par les différents tissus qui la composent, ce qui permet

¹ Ecologie des Forêts méditerranéennes, INRA, 84914 Avignon, France
marion.parizat@inra.fr

de visualiser ce qu'elle contient : un embryon et des tissus réserves, une larve d'insecte ou du vide. Progressivement, la radiographie analogique, qui nécessite un processus de révélation chimique de l'image fixée par irradiation sur un filtre photosensible, a été remplacée par des systèmes de détection numérique post-irradiation, qui fournissent rapidement une bonne qualité d'image et permettent de réduire les doses de rayonnement appliquées aux échantillons. Cet article présente la radiographie à rayons X numérique et son application au diagnostic de dégâts sur graines de trois espèces de conifères, le cèdre de l'Atlas *Cedrus atlantica*, le sapin pectiné *Abies alba* et le pin de Salzman *Pinus nigra salzmanni*, et au suivi de la dynamique des populations des insectes séminiphages qui leur sont inféodés.

Matériel et méthodes

Chez les conifères, l'étude de la production de graines et des dégâts causés par les insectes qui s'en nourrissent procède généralement de quatre étapes : la récolte des cônes sur les arbres, l'extraction des graines des cônes, la séparation manuelle des graines à potentiel germinatif (grandes graines) de celles qui ont avorté précocement (petites graines), et la radiographie à rayons X des grandes graines dont on cherche à savoir si elles sont saines, vides ou parasitées (Owens et Blake, 1985 ; Chalon, 2006).

Préparation des lots de graines pour la radiographie à rayons X numérique

La période de récolte des cônes dans les peuplements forestiers varie selon les espèces, qui peuvent présenter des cycles de reproduction différents (**Tableau 1**). Mais, quelle que soit l'espèce, la récolte s'effectue toujours peu de temps avant la libération des graines et leur dispersion pour s'assurer de leur âge et de la localisation précise de leur arbre mère. Dans le cadre de l'estimation de la qualité sanitaire des graines dans les cônes, seuls les cônes qui ne présentent pas de traces d'attaques d'insectes externes sont récoltés. Pour procéder à l'extraction puis au tri manuel des graines, les cônes récoltés sont ensuite désarticulés ou mis à sécher au laboratoire car, là aussi, le mode d'extraction dépend du mode de libération des graines de l'espèce considérée (**Tableau 1**). Après l'extraction, les graines de petite taille sont séparées manuellement des graines de grande taille car seules ces dernières vont être mises en lot (Chalon, 2006 ; **Figures 1a et 1b**). Celles-ci sont ensuite disposées sur un film plastique transparent et adhésif qui est préalablement fixé sur un châssis en carton ou en bois d'une dimension de 29 cm × 26 cm (**Figure 1c**). Ce sont ces plaques de graines qui seront passées en radiographie à rayons X numérique, car il est important pour une lecture précise de la radiographie que les graines ne se chevauchent pas. Chez les conifères dont les graines sont dispersées par le vent, comme c'est le cas du cèdre de l'Atlas, du sapin pectiné et du pin de Salzman, il est utile de les désailer (retirer leur aile) avant de les coller sur plaque pour faciliter la lecture de la radiographie et augmenter le nombre de graines analysées simultanément.

Tableau 1. Traitement des cônes du cèdre de l'Atlas, du sapin pectiné et du pin de Salzman

Espèce	Période de récolte des cônes	Mode de libération des graines par l'arbre	Mode d'extraction des graines
Cèdre de l'Atlas	octobre à décembre	Les écailles portant les graines se détachent et tombent au sol.	Désarticulation des cônes et séparation manuelle des graines et des écailles.
Sapin pectiné	août/septembre		
Pin de Salzman	janvier à février	Les écailles portant les graines s'ouvrent et les libèrent.	Cônes mis à sécher pour l'ouverture des écailles puis tapés pour récupérer les graines.



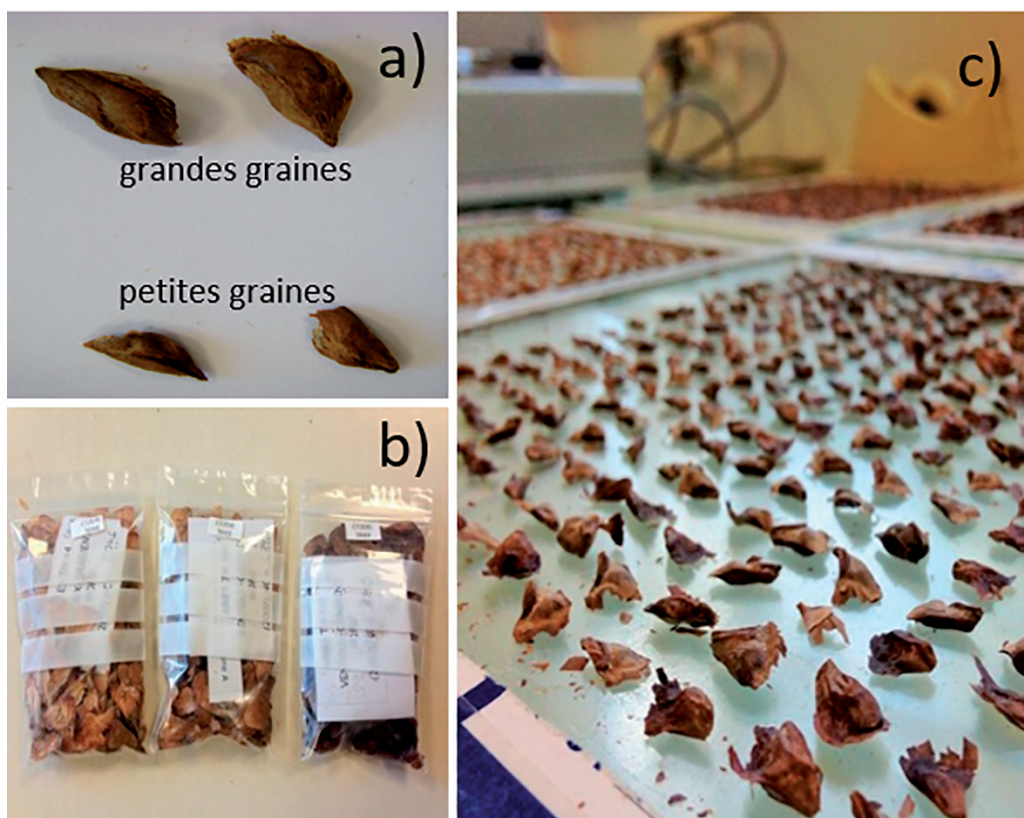


Figure 1. Préparation des lots de graines pour la radiographie à rayons X numérique. Suite à leur extraction des cônes, les graines sont triées manuellement en fonction de leur taille et seules les grandes graines seront désaillées (a, cèdre de l'Atlas) et mises en lots (b, sapin pectiné), puis collées sur des plaques adhésives pour la radiographie (c, sapin pectiné) (photo : C. Martinez).

Radiographie à rayons X numérique

Principe général et précautions

Un appareil à radiographie à rayons X numérique comprend deux éléments principaux : une source de rayons X et un scanner numérique permettant l'acquisition et le traitement des images obtenues via un ou plusieurs logiciels associés. Dans cet article, nous décrivons l'utilisation d'un appareil Faxitron®, modèle « Faxitron EZ240 », qui intègre le logiciel iX-Pect (**Figure 2**). Ce logiciel offre de nombreuses fonctionnalités telles que le scan des objets, l'enregistrement, la récupération et la sauvegarde des images scannées, l'ouverture, la visualisation et le traitement des images préalablement sauveées, et l'exportation des images en format TIFF. Par rapport à la radiographie analogique sur film photosensible, la radiographie numérique permet de réduire le temps de traitement d'un échantillon car la création et le transfert des informations, via un support numérique, se fait dans un temps relativement court. De plus, elle évite la manipulation de produits chimiques. En analogique, les images produites par l'irradiation subissent un processus multi-étapes plus long car elles doivent être révélées, puis fixées sur le film par une succession de bains basiques et acides, impliquant ensuite un lavage et un rinçage pour éliminer les réactifs puis un séchage.

Cependant, il faut rappeler que l'utilisation d'une source de rayons X doit se faire dans des conditions de sécurité bien spécifiques. La pièce doit être équipée d'un voyant indiquant que l'appareil est en cours d'utilisation. L'appareil lui-même est pourvu d'une porte étanche aux rayons et d'un voyant qui, lorsqu'il est allumé, signale que la radiographie est en cours. Un badge permettant de détecter le rayonnement doit être porté par le ou les utilisateurs. Le bon fonctionnement et le niveau de sécurité de l'appareil font aussi l'objet de visites de maintenance annuelles obligatoires par la société commercialisant l'appareil.

Figure 2. Scanner à rayons X Faxitron avec une plaque en position basse. La source de rayons X et le scanner se trouvent respectivement sur le haut et sur le bas de l'appareil. Il existe plusieurs niveaux de positionnement de la plaque, qui sera alors plus ou moins proche de la source des rayonnements. Cela conditionne la surface radiographiée : un rapprochement vers la source produit un effet de zoom qui réduit la taille de la surface radiographiée mais qui est adapté à de petits échantillons (photo : M. Parizat).



Le scanner à rayons X

En radiographie à rayons X numérique, la production d'une image nécessite la gestion de trois paramètres essentiels, déterminant le comportement du scanner durant la phase d'irradiation et de scan de la plaque de graines, ainsi que la qualité de l'image produite :

✓ l'intensité des rayons X

ce paramètre s'exprime en kilovolts (kV). Il détermine l'intensité des rayons X auxquels sont soumises les graines, c'est-à-dire que l'augmentation du nombre de kV se traduit par une augmentation de l'énergie transmise par la source de rayons X et par conséquent de la définition de l'image ;

✓ le temps d'intégration

l'image est générée en scannant la graine progressivement par lignes. Le temps d'intégration est exprimé en millisecondes (ms) et il détermine la durée d'exposition aux rayons X de chaque ligne. Une diminution du temps d'intégration se traduit par un scan plus rapide des graines mais par une image de moindre définition ;

✓ le « pixelbinning »

ce paramètre détermine la résolution du scanner, c'est-à-dire le nombre de pixels utilisés par point d'image radiographique. La valeur du pixelbinning indique le nombre de pixels voisins qui seront additionnés par le scanner pour constituer chaque point de l'image. En conséquence, l'augmentation du pixelbinning permet de réduire la durée du scan mais l'image aura une moins bonne résolution, et donc sera de moindre qualité. Par exemple, avec l'appareil Faxitron que nous utilisons, la définition d'image maximale est obtenue avec un pixelbinning de 1 (12 pixels par mm de lecture linéaire) et la définition minimale avec un pixelbinning de 6 (2 pixels par mm). La lecture et l'interprétation des radiographies de graines nécessite une bonne qualité d'image, nous utilisons donc ici un pixelbinning de 2 (6 pixels par mm).



Les variations de taille, de forme et de densité dans les graines de conifères requièrent un calibrage de l'intensité, du temps d'intégration et du pixelbinning propre à chaque espèce d'arbre analysée. D'autre part, il est nécessaire d'adapter la surface d'image à scanner en fonction de la taille de la graine pour parvenir à une radiographie interprétable. Pour les arbres produisant des graines de taille modeste, il faut donc réduire la taille de la surface scannée (effet de zoom) en rapprochant la plaque de graines de la source de rayons X, grâce à des positionnements de plaques modulables à l'intérieur de l'appareil (**Figure 2**).

Au cours de la phase de calibrage de l'appareil pour une espèce donnée, on recherche un compromis optimal entre l'intensité, le temps d'intégration, la qualité d'image radiographique attendue et la durée de chaque radiographie. Si on augmente l'intensité, alors le temps d'intégration peut être réduit, mais si on choisit de produire des rayons X de faible intensité, alors le temps d'intégration devra être plus élevé pour obtenir une image de qualité suffisante au diagnostic de la qualité de la graine (cas du pin de Salzmann). Dans nos analyses, nous avons donc calibré le Faxitron espèce par espèce, de façon à obtenir une image radiographique de qualité, tout en minimisant l'exposition des organismes (embryon de la plante et larve) aux rayonnements. Avec notre calibrage, nous n'avons pas observé d'effets négatifs des rayonnements sur le développement des insectes et sur les capacités de germination des graines saines, en comparaison de témoins non traités aux rayons X. Le gain de temps sur la radiographie analogique est indéniable, puisque la durée moyenne d'une radiographie numérique des graines de conifères est de 2 min 30. Le réglage de l'intensité des rayons X se fait directement sur le module générateur de rayons X du Faxitron, tandis que le réglage du temps d'intégration et du « pixelbinning » est réalisé via le logiciel iX-Pect, qui gère le scanner.

Tableau 2. Calibrage du scanner à rayons X Faxitron pour l'analyse de la qualité des graines de conifères

Espèce	Intensité (kV)	Temps d'intégration (ms)	« Pixelbinning »	Hauteur de plaque
Cèdre de l'Atlas	20	70	2	Basse
Sapin pectiné	20-22	100	2	Basse
Pin de Salzmann	25	100	2	Haute

Le traitement des images radiographiques

Après l'exposition des graines aux rayons X, l'image produite par le scanner est gérée par le logiciel iX-pect. C'est une image en noir et blanc, dont il est possible d'affiner la qualité de lecture en modulant les niveaux de gris, et qui est ensuite sauvegardée au format TIFF.

Dans les cas où l'analyse porte sur un grand nombre de graines et/ou l'on souhaite pouvoir récupérer les graines parasitées pour effectuer d'autres mesures, ou réaliser des élevages, les radiographies en format TIFF sont traitées grâce au logiciel Mesurim Pro. Il permet d'appliquer des pastilles de couleur sur les graines radiographiées afin d'en faciliter le tri, et d'estimer plus rapidement les proportions respectives de chaque catégorie de graines (**Figure 3a**). Les pastilles de couleur verte, rouge et bleue sont dédiées respectivement aux graines saines, parasitées et vides. La radiographie pointée par les pastilles est ensuite redimensionnée au format de la plaque de graines dans le logiciel Gimp. La plaque est alors superposée à cette nouvelle image sur un deuxième écran, ce qui permet par transparence de prélever aisément chaque catégorie de graines (**Figure 3b**).

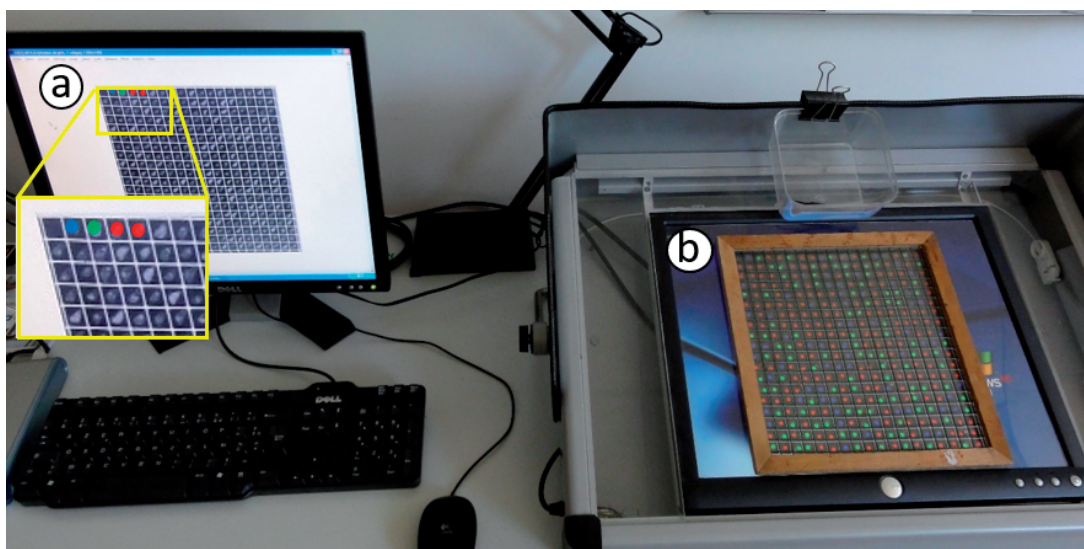


Figure 3. Préparation de l'image radiographique de graines de conifères (ici cèdre de l'Atlas) pour l'estimation des proportions respectives de graines saines, parasitées et vides et leur tri.
a) positionnement de pastilles de couleur sur l'image produite par le logiciel iX-Pect (vert : graine saine, rouge : graine parasitée, bleu : graine vide). **b)** tri des graines de chaque catégorie par superposition de la plaque à l'image redimensionnée avec pastilles (photo : M. Parizat).

Résultats-Discussion

Un outil de diagnostic de la qualité des graines de conifères

L'analyse des images produites par la radiographie à rayons X numérique permet un diagnostic non destructif, afin d'établir rapidement les proportions respectives de graines saines, parasitées ou vides dans un lot. En effet, les graines saines présentent un endosperme (tissus de réserves) et un embryon bien visibles par contraste, qui occupent la totalité de la cavité délimitée par l'enveloppe (**Figure 4**). *A contrario*, les graines vides ne montrent généralement que les restes d'un embryon dégénéré et desséché, et une absence totale d'endosperme (**Figure 4**).

Ce type de radiographie permet aussi d'identifier les insectes impliqués dans les dégâts observés, en lien avec leur mode d'alimentation (**Figure 4a et 4b**). Il est ainsi possible de détecter la présence de la punaise *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera : Coreidae) dans les pinèdes, par un échantillonnage de graines et par la visualisation des dégâts liés à sa prise alimentaire (**Figure 4a**). Cette punaise étant polyphage, il est donc également possible de déceler sa présence dans des forêts de cèdre ou de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) par ce moyen. La radiographie à rayons X numérique permet aussi la détection de certaines espèces de *Megastigmus* (Hymenoptera : Torymidae) dans des lots de graines provenant de peuplements forestiers qui n'étaient pas infestés auparavant, mais également dans des lots de graines provenant de régions ou pays connus pour être déjà infestés qui peuvent par conséquent constituer des sources d'introduction non désirée de ces insectes. A ce jour, la radiographie à rayons X est la seule méthode de détection fiable de la présence d'insectes séminiphages endophytes dans des lots de graines en transit (Auger-Rozenberg et Roques, 2012). Il existe cependant une limite à l'utilisation de la radiographie, notamment lorsque la larve en développement à l'intérieur des graines ne consomme pas la totalité de son contenu. En effet, si la larve mature reste enveloppée d'endosperme, il n'est pas possible de la détecter par contraste avec celui-ci, car larve et endosperme absorbent les rayons X de la même manière. Nous avons rencontré cette difficulté lors de l'examen de glands consommés partiellement par des larves de coléoptères Curculionidés.



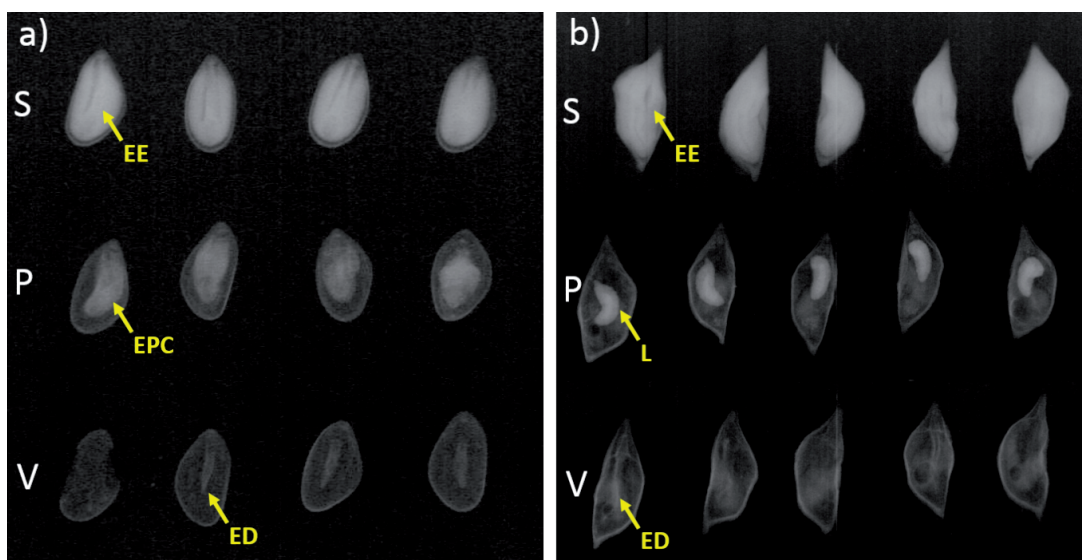


Figure 4. Les types de graines caractérisés par radiographie à rayons X numérique chez le pin de Salzmann (a) et le cèdre de l'Atlas (b) : graines saines (S), parasitées (P) et vides (V). Les graines saines comprennent un endosperme et un embryon visibles (EE), les graines parasitées montrent soit un endosperme partiellement consommé par *Leptoglossus occidentalis* (a, EPC) soit une larve de *Megastigmus* ayant consommé la totalité de l'endosperme et l'embryon (b, L), et les graines vides montrent un embryon dégénéré et une absence d'endosperme (ED) (photo : A. Chalon).

Dynamiques de fructification des conifères et des populations des insectes séminiphages

La radiographie à rayons X numérique et le mode de traitement des images, détaillés dans cet article, permettent l'analyse d'un nombre important de graines en comparaison de la radiographie analogique. La **Figure 5** montre qu'il est effectivement possible de qualifier et de quantifier rapidement (environ 2 min 30 par radio) les différentes qualités de graines d'un lot, et d'en estimer les fréquences respectives. On peut d'ailleurs noter que ces fréquences sont très variables d'une espèce à l'autre. La radiographie à rayons X numérique permet donc de traiter des lots de graines collectés de façon ponctuelle, pour effectuer un diagnostic de présence-absence d'insectes séminiphages, et/ou de qualité de production de semence. Elle permet également le traitement en routine de lots de graines issus de peuplements forestiers d'intérêts économiques et écologiques, pour assurer le suivi pluriannuel de leur potentiel de régénération naturelle et de production de graines commercialisables. Le **Tableau 3** illustre l'importante variation que l'on peut observer dans les proportions des différentes qualités de graines chez le cèdre de l'Atlas, le sapin pectiné et le pin de Salzmann. La possibilité de répéter les estimations de dégâts faits aux graines dans le temps et dans l'espace, est un atout indéniable pour le suivi des dynamiques de populations des insectes ravageurs de graines, en particulier lorsqu'il s'agit d'espèces envahissantes (Lander et al., 2014).

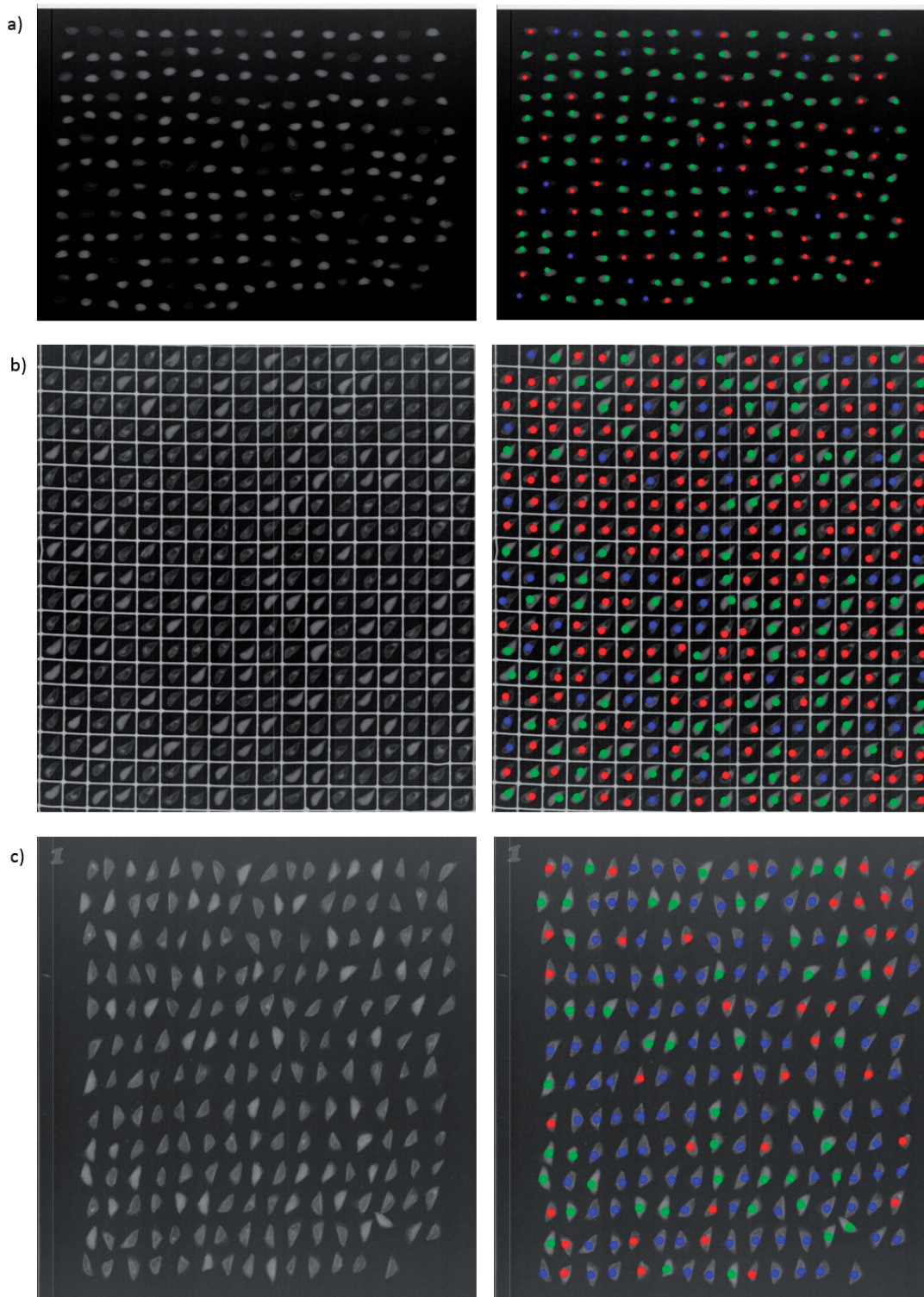


Figure 5. Radiographie à rayons X numérique de plaques de graines de pin de Salzmann (a), de cèdre de l'Atlas (b) et de sapin (c), avec à gauche l'image radiographique des graines générée (logiciel iX-Pect) et à droite la même image sur laquelle ont été appliquées des pastilles dont la couleur caractérise le type de graine observé (logiciel MESURIM PRO, vert : graine saine, rouge : graine parasitée, et bleu : graine vide) (photo : A. Chalon).



Tableau 3. Exemples de proportions respectives de graines saines, vides et parasitées dans des lots de graines de cèdre de l'Atlas, de sapin pectiné et de pin de Salzmann, collectés au cours de différentes années sur différents sites. Cèdre et sapin sont attaqués par *Megastigmus* et le pin de Salzmann par *L. occidentalis*

Plante hôte	Site	Année	Nombre total de graines radiographiées	Graines saines (%)	Graines vides (%)	Graines parasitées (%)
Cèdre de l'Atlas	F.D. Luberon	2010	13 654	80,5	8,5	10,9
		2011	3 411	31,2	23,4	45,4
	Lamalou les Bains	2010	4 474	78,3	17,7	4,0
		2011	2 337	59,5	20,0	20,5
Sapin pectiné	F.D. Lure	2010	5 102	10,7	70,9	18,4
		2011	6 160	17,5	75,7	6,8
	F.D. Espinouse	2006	5 899	53,6	38,5	8,0
		2008	4 067	9,6	43,8	46,6
Pin de Salzmann	St Guilhem-le-Désert	2012	2 244	39,2	28,1	32,7
	Tarn	2012	1 564	29,4	56,8	13,8

Conclusion

Le diagnostic par rayons X des dégâts occasionnés aux graines par les insectes forestiers spécialistes (*Leptoglossus*, *Megastigmus*) revêt des intérêts écologiques et économiques importants. En effet les graines sont par définition un élément crucial du potentiel de régénération naturelle des peuplements forestiers et elles sont recherchées par les structures et entreprises à l'œuvre dans des programmes de reboisement et d'ornementation. Enfin, le caractère non destructif pour les graines et pour les insectes de la radiographie à rayons X permet d'isoler simplement les graines contenant des insectes et de conserver ceux-ci pour des expérimentations ultérieures.

Remerciements

Une partie des résultats présentés ici a été obtenue dans le cadre de programmes de recherche financés par l'ANR et le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. Nous remercions également Thomas Boivin pour son aide lors de la rédaction de cet article.

Références bibliographiques

- Auger-Rozenberg MA, Roques A (2012) Seed wasp invasions promoted by unregulated seed trade affect vegetal and animal biodiversity. *Int Zool* 7: 228-246.
- Chalon (2006) Méthodes d'estimation des dégâts causés par les insectes ravageurs des graines de conifères. *Le Cahier des Techniques de l'Inra, N° spécial*, 129-134.
- Lander TA, Klein EK, Oddou-Muratorio S, Candau J-N, Gidoïn C, Chalon A, Roig A, Fallour D, Auger-Rozenberg M-A, Boivin T (2014) Reconstruction of a windborne insect invasion using a particle dispersal model, historical wind data, and Bayesian analysis of genetic data. *Ecol Evol* 4: 4609-4625.
- Owens JN, Blake MD (1985) Forest tree seed production : A review of literature and recommendations for future research. Petawawa National Forestry Institute, Chalk River.