



HAL
open science

**Effet du stress hydrique sur la croissance de la tomate :
une étude multi-échelle : de la cellule à la plante entière
pour une meilleure compréhension des interactions entre
les différentes échelles**

Garance Koch

► **To cite this version:**

Garance Koch. Effet du stress hydrique sur la croissance de la tomate : une étude multi-échelle : de la cellule à la plante entière pour une meilleure compréhension des interactions entre les différentes échelles. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2018. Français. NNT : 2018AVIG0347 . tel-02074410

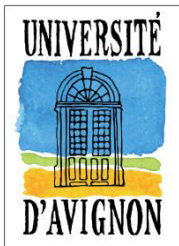
HAL Id: tel-02074410

<https://theses.hal.science/tel-02074410>

Submitted on 20 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ D'AVIGNON
ET DES PAYS DE VAUCLUSE

Académie d'Aix-Marseille
Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse
École Doctorale 536 : Sciences et Agrosociétés



THÈSE

Présentée dans le cadre d'un doctorat en sciences
Spécialité : Biologie

Effet du stress hydrique sur la croissance de la tomate :
Une étude multi-échelle, de la cellule à la plante entière
pour une meilleure compréhension des interactions entre les échelles

Par **Garance Koch**

Soutenue le 14 décembre 2018 devant un jury composé de :

Nathalie Gonzalez	Chargée de Recherche, INRA Bordeaux	Rapporteur
Nicolas Langlade	Directeur de Recherche, INRA Toulouse	Rapporteur
Delphine Luquet	Chercheur, CIRAD Montpellier	Examineur
Laurent Urban	Professeur, Université d'Avignon	Examineur
Nadia Bertin	Directeur de Recherche, INRA Avignon	Directeur de thèse
Christine Granier	Directeur de Recherche, INRA Montpellier	Co-encadrant



INRA : UR1115 'Plantes et Systèmes de culture Horticole



RÉSUMÉ

Comme pour les autres organes multicellulaires, la croissance et le développement de la feuille et du fruit sont caractérisés par la coordination de la division et de l'expansion des cellules qui sont des processus majeurs de la croissance. Les cellules du péricarpe du fruit charnu connaissent également des endocycles successifs entraînant ainsi une augmentation importante de la ploïdie des cellules. Il existe un lien évident entre la croissance cellulaire et l'endoréduplication, cependant, celui-ci est encore mal connu du point de vue fonctionnel. Les processus cellulaires interagissent fortement durant le développement de l'organe et sont liés aux flux de carbone et d'eau dans la plante. L'objectif de ce travail de thèse est de mieux comprendre le contrôle multi-échelles de la croissance des feuilles et des fruits chez la tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) et de la plasticité de leur croissance en réponse à des stress hydriques du sol.

L'étude a essentiellement porté sur le génotype de tomate cerise *Solanum lycopersicum*, cv. West Virginia 106 (WVa 106) qui a été cultivé dans différentes conditions d'irrigation grâce à des systèmes automatisés développés pour cette étude. La réponse au déficit hydrique du sol a été étudiée à différentes échelles d'observation, (tissu, organe, plante entière) et à différents stades de croissance de la plante en adaptant des protocoles utilisés jusque-là pour des plantes à croissance déterminée et des feuilles simples. Deux génotypes transgéniques modifiés sur un gène de régulation du cycle cellulaire ont aussi été cultivés afin de faire varier les traits liés à la croissance cellulaire et mieux comprendre leurs liens. Les cinétiques de croissance des organes source et puits que sont la feuille et le fruit aux échelles cellulaire et tissulaire ont aussi été décrites. Les résultats ont apporté des éléments nouveaux sur les coordinations entre les différents processus étudiés et conforté des hypothèses déjà présentes dans la littérature. Ces travaux ont permis de fournir un jeu de données original sur les effets du stress hydrique sur les processus cellulaires (division, expansion, endoréduplication) impliqués dans la croissance de la feuille et du fruit chez la tomate et, de mieux comprendre leur interactions à plus large échelle, la plante dans sa globalité. En perspectives, ce jeu de données pourra permettre de faire évoluer un modèle de développement du fruit charnu en condition optimale et tester sa généralité sur un autre organe, la feuille. Il ouvre des pistes sur la réflexion autour de la modélisation de la plasticité de la plante en réponse au stress hydrique.

ABSTRACT

As for other multicellular organs, growth and development of leaves and fruits are characterized by cell division and expansion. Cell division and expansion are two main growth processes. Fleshy fruit pericarp cells also include successive endocycles that provide an important increase in cell ploidy. There is a clear link between cell growth and endoreduplication. However, this link is still unclear from a functional point of view. Cellular processes interact during organ development and are related to plant water and carbon flows. The objective of this thesis is to give insights into the multi-scale control of leaves and fruits growth in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) and the plasticity of growth-related traits in response to soil water stresses.

This study mainly focused on cherry tomato *Solanum lycopersicum*, cv. West Virginia 106 (WVa 106). This genotype was cultivated in different conditions of watering regimes with automated systems developed for this study. Soil water deficit response was studied at different observation scales (tissue, organ, whole plant) and at different plant growth stages thanks to protocols that were used until now on plants with determinate growth and simple leaves that were modified for this study. Two transgenic genotypes modified on a cell cycle regulation gene were also cultivated to create variations on growth related traits for a better understanding of their relationships. Multi-scale growth kinetics of source and sink organs (leaf and fruit) were also analyzed. Results have brought new elements about growth-related traits coordination and have reinforced a few hypotheses already presented in scientific papers. This work has supplied an original dataset on water stress effects on cellular processes (division, expansion, endoreduplication) related to leaf and fruit growth in tomato in the context of the plant as a whole. In perspectives, this dataset may allow to further develop an existing model of fleshy fruit development which was first developed for fruits of plants growing optimal condition. Genericity of this model will be tested on another organ, the leaf. This work also opens some tracks about how the model could be modified when growth is limited by water stress.

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIÈRES

PARTIE I : INTRODUCTION-CONTEXTE.....	1
I-1 Contexte général de la thèse.....	2
I-2 La plante face au déficit hydrique du sol.....	4
I.2.1 Variabilité des protocoles expérimentaux utilisés pour piloter des déficits hydriques.....	7
I.2.2 Plasticité des plantes en réponse au déficit hydrique du sol.....	11
I-3 La tomate : Un modèle de plante cultivée pour l'étude des réponses au déficit hydrique.....	20
I-4 Objectifs de la thèse et cadre des expérimentations menées pour y répondre....	24
PARTIE II : ANALYSE DE L'EFFET DE DIFFÉRENTS SCÉNARIOS DE STRESS HYDRIQUES SUR LE DÉVELOPPEMENT ET LA CROISSANCE DE LA PLANTE CHEZ LA TOMATE.....	30
II-1 Introduction de la PARTIE II.....	31
II-2 Matériel et méthode de la PARTIE II.....	35
II.2.1 Matériel végétal et semis.....	35
II.2.2 Conditions de culture de plantules et des plantes.....	36
II.2.3 Notation des stades de développement des plantes.....	42
II.2.4 Analyse de croissance des différents organes.....	44
II.2.4.1 Expérimentation A.....	44
II.2.4.2 Expérimentation B.....	45
II.2.5 Analyse statistiques des données.....	45
II-3 Résultats de la PARTIE II.....	47
II.3.1 Effet de déficits hydriques du sol sur les développements végétatifs et reproducteurs des plantes.....	47
II.3.1.1 Le nombre de feuilles est peu affecté par des contraintes hydriques du sol quelle que soit leur intensité et leur position dans le cycle de la plante.....	47
II.3.1.2 Des stress hydriques d'intensités variables ont réduit le nombre de boutons floraux et la vitesse de floraison au sein de l'inflorescence, tout en retardant la date de floraison. Ces effets dépendaient toutefois du stade de développement de la plante.....	49
II.3.2 Effet de déficits hydriques de différentes intensités sur les biomasses aériennes et racinaires à des stades précoces de développement de la plante.....	54
II.3.2.1 Les réductions de masse sèche aérienne et souterraine sont proportionnelles à l'intensité du stress hydrique.....	54
II.3.2.2 Suivant le « type » de stress hydrique et le stade de développement de la plante, la surface et la masse sèche des feuilles peuvent être affectés différemment.....	56
II.3.2.3 Le déficit hydrique ne modifie pas les proportions de biomasse allouée aux différents compartiments aériens, tige, feuille, et fruit.....	59
II.3.3 Effet du déficit hydrique imposé en serre sur les fruits.....	62

II-4 Discussion de la PARTIE II.....	66
II.4.1 Nous avons pu cultiver des plantes de tomate dans des conditions d'état hydrique du sol stables au cours du temps et établir des courbes de réponse de différents traits à la teneur en eau du sol moyenne.....	66
II.4.2 Un stress hydrique du sol modéré et constant au cours du cycle de la plante se traduit par des effets comparables sur le début et la fin du cycle pour des variables liées au développement mais également à la croissance des feuilles et fruits.....	67
II.4.3 Un contrôle précis de l'environnement ne suffit pas à maintenir des conditions « identiques » au cours du développement de la plante : les modifications des forces de puits.	70
II.4.4 Les déficits hydriques imposés ont plus affecté la croissance végétative que le rendement en fruit.....	71
II-5 Conclusions de la PARTIE II.....	73
PARTIE III : ANALYSE MULTI-ÉCHELLE DE LA PLASTICITE DES FEUILLES CHEZ LA TOMATE.....	75
III-1. Introduction de la PARTIE III.....	76
III-2. Matériel et méthode de la PARTIE III.....	80
III.2.1 Matériel végétal, semis et pré-culture des plantules.....	80
III.2.2 Conditions de croissance.....	81
III.2.3 Mesure des traits phénotypiques.....	82
III.2.3.1 Mesure des traits relatifs à la taille des feuilles.....	84
III.2.3.2 Mesure des traits relatifs à l'anatomie de la face adaxiale de l'épiderme.....	85
III.2.3.3 Niveaux de ploïdie dans les feuilles et les folioles.....	88
III.2.4 Extraction des tendances pour les différentes variables morphologiques.....	90
III.2.5 Ajustement des cinétiques obtenues pour les différents traits relatifs à la cinétique de croissance d'une foliole.....	90
III-3 Résultats de la PARTIE III.....	92
III.3.1 Variation de surface finale des folioles et des traits cellulaires relatifs à la taille de la foliole le long du rachis de la feuille composée de tomate.....	92
III.3.2 Variations de la surface foliaire et des traits cellulaires associés le long de la première unité sympodiale.....	94
III.3.3 Variations de la surface foliaire finale et traits cellulaires associés de la feuille composée de tomate chez la lignée Pro35S: <i>Slccs52A</i> ^{AS}	98
III.3.4 Effet dose du déficit hydrique du sol sur la surface finale des feuilles et les traits cellulaires associés dans la feuille composée de tomate.....	102
III.3.5 Effet d'un déficit hydrique constant sur la dynamique de croissance d'une foliole.....	106
III-4 Discussion de la PARTIE III.....	112
III.4.1 Les variations de surface des feuilles, des folioles, et des traits relatifs à la taille des cellules supportent l'hypothèse que les folioles partagent des propriétés	

cellulaires communes.....	112
III.4.2 Contributions du nombre et de la taille de cellules de l'épiderme à la plasticité de surface de la feuille composée de la tomate : qu'en est-il des mécanismes de compensation décrits sur les feuilles simples ?.....	113
III.4.3 Une preuve supplémentaire d'absence de lien direct entre l'augmentation du niveau de ploïdie dépendant de l'endoréduplication et l'augmentation de l'expansion cellulaire.....	116
III.4.4 Découplage de l'expansion foliaire et des divisions cellulaires dans la réponse de la croissance de la foliole à une contrainte hydrique du sol.....	117
III.4.5 Les cinétiques de croissance des traits cellulaires relatifs à la croissance d'une foliole de tomate sont comparables aux cinétiques de croissance de la feuille d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	118
III-5 Conclusions de la PARTIE III.....	120
PARTIE IV : ANALYSE MULTI-ÉCHELLE DE LA DYNAMIQUE DE CROISSANCE DU FRUIT ET DE SA PLASTICITÉ CHEZ LA TOMATE.....	122
IV-1 Introduction de la PARTIE IV.....	123
IV-2 Matériel et méthode de la PARTIE IV.....	128
IV.2.1 Matériel végétal.....	128
IV.2.2 Semis et pré-culture des plantules.....	130
IV.2.3 Conditions de croissance.....	130
IV.2.4 Mesures des traits phénotypiques.....	131
IV-3 Résultats de la PARTIE IV.....	140
IV.3.1 Un déficit hydrique du sol modéré constant affecte la dynamique de croissance en masse fraîche du fruit.....	140
IV.3.2 Un déficit hydrique du sol modéré constant affecte les traits cellulaires dans le fruit pendant la phase précoce de la croissance du fruit.....	142
IV.3.3 Un déficit hydrique du sol modéré constant affecte les traits cellulaires dans le fruit pendant la phase rapide de la croissance du fruit.....	144
IV.3.4 Les deux méthodes utilisées pour mesurer les volumes cellulaires dans le péricarpe présentent des différences dans les valeurs absolues des nombres de cellules mesurés.....	145
IV.3.5 Un déficit hydrique du sol modéré constant n'affecte pas la dynamique du processus d'endoréduplication dans le fruit.....	146
IV.3.6 La dynamique de croissance en masse fraîche du fruit et des traits cellulaires associés dans le péricarpe de tomate n'est pas affectée chez la lignée transgénique SICCS52A ^{OE}	148
IV-4 Discussion de la PARTIE IV.....	152
IV.4.1 La plasticité du volume du fruit de la tomate est liée à une plus faible teneur en eau mais également moins de cellules et des cellules de volume réduit.....	152
IV.4.2 Un découplage des processus de division, expansion et endoréduplication a lieu au cours du développement du fruit chez la tomate et en réponse au déficit hydrique du sol.....	154

IV.4.3 Nous avons mis en évidence des disparités méthodologiques lorsque deux protocoles différents sont utilisés pour analyser les nombres de cellules dans les phases précoces puis tardives du développement du fruit.....	156
IV-5 Conclusion de la PARTIE IV.....	157
PARTIE V : CONCLUSIONS-DISCUSSION-PERSPECTIVES.....	158
BIBLIOGRAPHIE.....	169
ANNEXES.....	184
Annexe 1 : Koch et al., 2018 : Are compound leaves more complex than simple ones ? A multi-scale analysis.....	
Annexe 2 : Dauszat et al., 2016 : PHENOPSIS Quelles évolutions technologiques du premier automate de phénotypage des plantes ?.....	
Annexe 3 : Koch et al., 2017 : A multi-scale pipeline for a reproducible analyses of tomato leaf expansion and its plasticity.....	
Annexe 4 : Composition du substrat Klamann	
Annexe 5 : Construction des plasmides utilisés pour les transformations à l'origine des lignées transgéniques Pro35S : CCS52A ^{AS} et ProPEPc2 :: CCS52A ^{OE}	

PARTIE I : INTRODUCTION-CONTEXTE

I-1 CONTEXTE GÉNÉRAL DE LA THÈSE

Cette thèse a été effectuée dans le cadre d'une collaboration entre les unités de recherche PSH (Plantes et Systèmes de culture Horticoles) et LEPSE (Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux). Ces deux laboratoires, à sensibilité agronomique, s'intéressent à l'effet de l'interaction génotype x environnement x pratique sur le développement et la croissance des plantes. Leurs études ont conduit à la mise au point d'approches innovantes combinant (1) des descriptions quantitatives de l'environnement tel qu'il est ressenti par les plantes, (2) des décompositions de variables caractérisant le développement et la croissance des plantes en processus élémentaires sous-jacents, (3) des modèles prédictifs basés sur les processus sous-jacents impliqués dans le développement et la croissance des organes et leur plasticité. Les deux laboratoires travaillent sur des plantes cultivées, à savoir les plantes à fruits charnus, telles la pêche et la tomate, à PSH; le maïs, le blé et la vigne au LEPSE mais également des plantes modèles telles *Arabidopsis thaliana* au LEPSE.

Un axe de recherche commun aux deux laboratoires consiste à analyser les rôles respectifs des processus cellulaires i.e., le cycle cellulaire, l'endoreduplication (pour certaines espèces) et l'expansion cellulaire, dans le développement et le grandissement des organes végétaux. Une priorité est d'analyser la plasticité de ces processus en réponse au déficit hydrique du sol. Des approches de phénotypage haut-débit combinées à des analyses de génétique quantitative et de la modélisation statistique ont été menées dans ce sens au LEPSE (Tardieu *et al.*, 2000; Reymond *et al.*, 2003 dans les feuilles chez le maïs; Tisné *et al.*, 2008 dans les feuilles chez *Arabidopsis thaliana*); des modèles mécanistes ont été établis à PSH et utilisés pour analyser les interactions entre processus de croissance de manière quantitative (Bertin *et al.*, 2007; Baldazzi *et al.*, 2013, 2017 dans les fruits chez la tomate).

Mon travail de thèse rentre dans le cadre des recherches menées à PSH et au LEPSE et porte sur l'analyse :

- du développement et de la croissance des organes végétatifs et reproducteurs en réponse à une contrainte hydrique du sol;
- de la contribution des processus cellulaires sous-jacents à la croissance de ces organes et à leur plasticité en réponse au stress hydrique;
- des interactions entre les processus cellulaires.

Le travail a été mené sur la tomate qui est une plante modèle pour les fruits charnus pour laquelle un premier modèle de croissance du fruit intégrant les processus de division et d'expansion cellulaires a été développé à PSH (Baldazzi *et al.*, 2017). Ce modèle inclut également un effet de l'endoréduplication de l'ADN sur le potentiel d'expansion cellulaire. Il permet de prédire des interactions entre les processus de croissance aux échelles cellulaire et tissulaire au cours du développement du fruit de tomate en conditions optimales, i.e. sans contrainte.

Le défi de mon travail de thèse était d'analyser la contribution des processus cellulaires, i.e., endoréduplication, division cellulaire et expansion cellulaire, à la croissance des feuilles et fruits de tomates et leur plasticité en réponse au stress hydrique. Ce travail est une sous-partie d'un projet plus ambitieux financé par Agropolis Fondation et devrait aller à termes jusqu'à la calibration et la validation du modèle de prédiction de la croissance des organes sous contrainte hydrique établi par V. Baldazzi à PSH, partie qui n'est pas traitée dans le cadre de ma thèse.

I-2 LA PLANTE FACE AUX DÉFICITS HYDRIQUES DU SOL

La sécheresse affecte considérablement la croissance des plantes : c'est, sans doute (avec les fortes températures), l'un des facteurs majeurs qui limite la production végétale en conditions naturelles (Boyer, 1982; Ciais *et al.*, 2005; Webber *et al.*, 2018). De nombreux travaux s'intéressent à l'impact de déficits hydriques subis ou contrôlés sur le fonctionnement des cultures. Le déficit hydrique peut être défini comme un déséquilibre entre la quantité d'eau disponible dans le sol et la demande en évaporation due aux conditions environnementales (Tardieu *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2013). La plasticité des plantes permet le développement de réponses adaptatives à l'état hydrique du sol qui fluctue régulièrement et de manière peu prédictible suivant les cycles circadien et saisonnier. Chaque déviation de l'état hydrique de son optimum ne résulte pas nécessairement en un stress. Le stress est l'altération de la condition physiologique causée par des facteurs qui tendent à modifier son équilibre (Gaspar *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006). Ainsi, les écosystèmes naturels et les cultures peuvent être affectés par le déficit hydrique, qui peut avoir un impact important sur la croissance et la reproduction en fonction de son intensité (Bray, 2002). C'est alors, qu'on parle de stress hydrique. Kramer (1963) décrit clairement la situation : La croissance de la plante est contrôlée directement par le stress hydrique de la plante et seulement indirectement par le stress hydrique du sol. Le stress hydrique de la plante dépend des taux relatifs d'absorption d'eau et de perte en eau plutôt que de l'approvisionnement en eau uniquement. Par conséquent, il n'est pas prudent de considérer qu'un degré de stress hydrique du sol est toujours accompagné par un degré de stress hydrique de la plante équivalent.

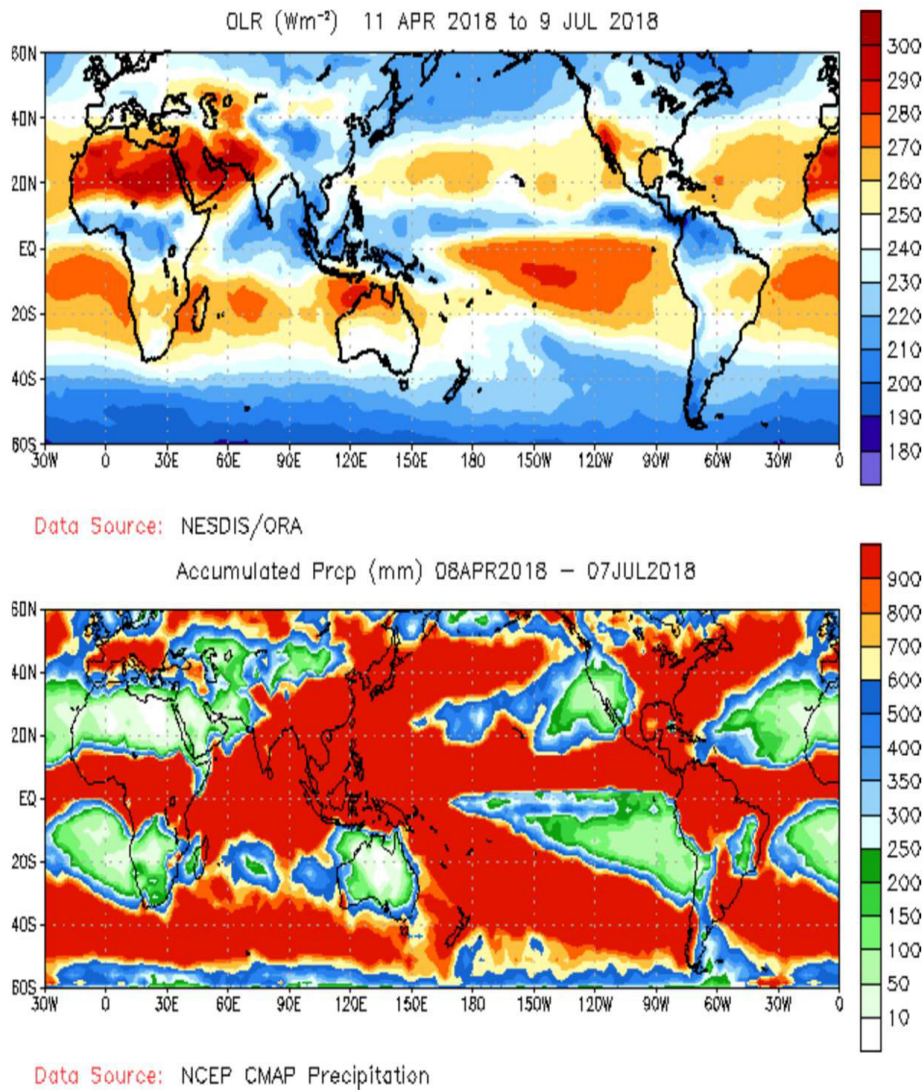


Figure I-1. Carte du monde présentant le rayonnement électromagnétique émis par la Terre dans le domaine infrarouge (Outgoing long wave radiation, OLR en $W m^{-2}$) pour la période du 11 avril au 9 juillet 2018 (dessus) et le cumul des précipitations (en mm) sur une période équivalente, du 8 avril au 7 juillet 2018 (dessous). Les zones avec de faibles précipitations sont clairement celles où la température a été la plus élevée. Ces cartes ont été éditées par le « Climate Prediction Center » de la « National Oceanic and Atmospheric Administration ».

De nombreuses réponses au déficit hydrique sont décrites dans la littérature à différentes échelles d'organisation, phénologiques, morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires. Cependant, même si des tendances générales sont observées, les réponses sont très variables en fonction de la durée et la sévérité du déficit, mais également du stade de la plante lors de l'occurrence de la contrainte (Tardieu, 2012). Les réponses sont également différentes suivant les variétés étudiées et elles sont génotype-dépendantes (Casadebaig *et al.*, 2008; Rauf et Sadaqat, 2008). Par ailleurs, d'autres contraintes environnementales accompagnent souvent un déficit hydrique et les interactions entre contraintes sont peu prises en compte (Dreesen *et al.*, 2012). Par exemple, le déficit hydrique est souvent associé à de fortes températures (Figure I.1) et une intensité lumineuse élevée (Machado et Paulsen, 2001; Paredes et Quiles, 2013; Mazdiyasi et AghaKouchak, 2015). Dans la plupart des études, les effets du stress hydrique sont considérés seuls alors que ce stress est souvent combiné avec d'autres stress environnementaux (au moins au champ et en serre). Des études des effets du stress hydrique combiné à un autre stress abiotique, comme une température élevée, chez *Arabidopsis thaliana*, le maïs ou le tournesol (Vile *et al.*, 2012; Yordanov *et al.*, 1997), ou des rayons UV-B sur l'orge (Bandurska et Cieslak, 2013) ont permis de montrer que l'analyse des interactions entre stress était complexe et dépendait des traits mesurés. Il est donc clairement établi qu'il n'y a pas une réponse au déficit hydrique mais plusieurs types de réponses qui dépendent des plantes et des scénarios.

De nombreuses études portant sur la réponse des plantes au déficit hydrique présentent des résultats obtenus avec une condition bien irriguée et une condition dite 'en déficit' et la généralisation des résultats obtenus est ainsi limitée (Baerenfaller *et al.*, 2012 chez *Arabidopsis thaliana*). D'autres études présentent des courbes de réponses de traits de la plante à l'humidité du sol, à la fraction d'eau transpirable dans le sol ou au potentiel hydrique

du sol ou de la plante, i.e. des variables permettant de caractériser l'intensité du stress (Granier *et al.*, 2006 chez *Arabidopsis thaliana*).

I.2.1 Variabilité des protocoles expérimentaux utilisés pour piloter des déficits hydriques

Différents protocoles expérimentaux sont utilisés pour piloter l'état hydrique du sol et/ou de la plante afin d'analyser la réponse des plantes face à des déficits hydriques. Le choix de la méthodologie adoptée est souvent lié à l'expérience du chercheur et aux capacités technologiques de l'unité de recherche.

Des protocoles de culture des plantes hors-sol.

Une première classe de protocoles repose sur des dispositifs dans lesquels les plantes sont cultivées sans sol (sur milieu gélosé, en hydroponie, sur laine de roche, ...). Dans certaines études, il s'agit de traiter des graines ou plantules avec des osmolites tels que le mannitol ou le sel pour appliquer un stress osmotique (Kilian *et al.*, 2007; Skirycz *et al.*, 2011). D'autres impliquent l'application de sel ou d'acide abscissique dans un milieu de culture hydroponique sur lequel la plante se développe (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1994; Seki *et al.*, 2002). Le séchage de l'air autour de feuilles excisées est un modèle expérimental également utilisé et qui a fourni des informations sur la réponse de la partie aérienne à la déshydratation, en particulier sur les mouvements stomatiques et la réponse en terme de transpiration (Bouchabke *et al.*, 2008; Huh *et al.*, 2010). Cependant, certains travaux ont montré que tous ces modèles expérimentaux ne sont pas directement comparables entre eux et à un déficit hydrique du sol. Même s'ils ont permis d'identifier des voies importantes impliquées dans la réponse des plantes au stress, certaines études ont mis en évidence de fortes différences de réponses (en terme d'expression de gènes, de signalétique hormonale et/ou de fonctionnement

de la plante) entre le stress subi par les plantes en cas de choc osmotique, de déshydratation sévère et/ou les dessèchements graduels qui se développent généralement en pot ou au champ (Seki *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2002; Székely *et al.*, 2007; Skirycz *et al.*, 2011).

Des protocoles de culture en sol, pour des plantes en pot ou au champ.

Les expérimentations réalisées sur des plantes cultivées en pot sont souvent citées comme plus représentatives des conditions de cultures en plein champs. Dans certaines études, des expérimentations au champ sont couplées à des expérimentations en pot, en environnement contrôlé afin de comparer les réponses de certains traits au déficit hydrique (Tardieu et Tuberosa, 2010; Tuberosa, 2012). Il a ainsi été montré chez le maïs que la réponse de la croissance foliaire au stress hydrique pour des plantes cultivées en pot dans une plateforme de phénotypage en serre était semblable à celle observée en plein champ pour une série de génotypes (Chapuis *et al.*, 2012). Toutefois des travaux récents sur le colza ont mis en évidence une forte interaction entre la taille du pot et le déficit hydrique du sol sur la réponse du développement de la plante (Dambreville *et al.*, 2013).

Les scénarios de déficits hydriques imposés en pot peuvent être très variés mais on retrouve deux types principaux : i) établissement d'un déficit hydrique progressif d'intensité croissante sur une période donnée et ii) établissement d'un déficit hydrique constant dont l'intensité est maintenue à une valeur donnée pendant une durée donnée. Techniquement, les maîtrises de chacun de ces protocoles expérimentaux ont leurs propres avantages et inconvénients et, ils sont représentatifs de situations différentes en conditions de culture. Un déficit hydrique progressif est imposé en supprimant totalement l'irrigation des plantes, ou, par une réduction graduelle, mais contrôlée, du contenu en eau du sol. Ce type de déficit hydrique est utilisé plutôt pour étudier la réponse des plantes à un stress hydrique sévère, mais aussi, pour

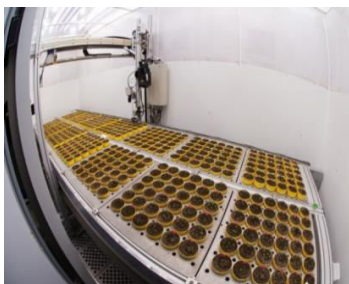
analyser la reprise de croissance des plantes ou parfois même leur « résurrection » si l'irrigation est rétablie à un moment donné (Lechner *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010; Bresson *et al.*, 2015; Szalonek *et al.*, 2015). Les déficits hydriques progressifs sont souvent difficiles à analyser et ceci est lié à la difficulté de synchronisation du stade de croissance avec le contenu en eau du sol, associé à une courte fenêtre de mesure. Par contre, un déficit hydrique constant, appliqué en réduisant le contenu en eau du sol à un niveau cible atteint à un stade de croissance défini, suivi et maintenu durant l'expérimentation, nécessite un travail de maintenance plus important mais l'analyse de la réponse de la plante est plus simple car le déficit peut être caractérisé par une valeur moyenne d'intensité (Granier *et al.*, 2006; Clauw *et al.*, 2015).

Des protocoles haut-débit par le développement de plateformes de phénotypage contrôlant automatiquement l'état hydrique du sol.

Ces quinze dernières années, de nombreux laboratoires se sont équipés de plateforme de phénotypage en chambre de culture ou en serre. La plupart de ces plateformes sont équipées d'une station de pesée et d'irrigation permettant de suivre et ajuster précisément les teneurs en eau du sol pot à pot de façon automatisée. Ceci a permis une meilleure reproductibilité des expérimentations et la mesure de multiples traits sur de nombreuses plantes par différents capteurs embarqués. Les plateformes établies en serre permettent de cultiver de grandes plantes jusqu'à des stades tardifs de leur cycle de développement (Coupel-Ledru *et al.*, 2014 sur la vigne; Cabrera-Bosquet *et al.*, 2016 sur le maïs). Elles permettent d'effectuer des mesures des dynamiques de croissance aérienne et, pour certaines, sous-terrainne (SCREEN House, Juelich; PHENODYN, Montpellier, 4PMI Dijon) ou de l'architecture des plantes (PHENOARCH, Montpellier; WIWAM CONVEYOR, Gent) avec une capacité de culture de la centaine au millier de plantes (Cabrera-Bosquet *et al.*, 2016; Nakhforoosh *et al.*, 2016).

Les plateformes de phénotypage établies en chambre de culture sont généralement adaptées pour l'analyse de petites plantes ou de grandes plantes à des stades précoces de leur développement, et permettent un meilleur niveau de contrôle des conditions environnementales. Les plateformes comme PHENOPSIS, PHENOSCOPE et WIWAM-XY ont été particulièrement utiles pour l'étude de la réponse de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* au déficit hydrique du sol (Figure I.2; Granier *et al.*, 2006; Skirycz *et al.*, 2011; Tisné *et al.*, 2013).

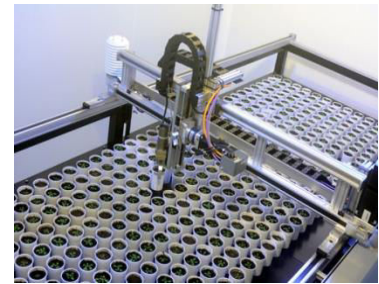
Des plateformes de phénotypage au champ ont également été développées, comme par exemple SCREENField (Royaume-Uni), HyPlant (Allemagne), DIAPHEN (France). Elles ne permettent pas de contrôler finement le scénario de stress hydrique du sol mais certaines utilisent des abris roulants dont le déplacement est automatisé pour éviter la pluie. Elles sont équipés de tracteurs, et/ou véhicules aériens avec ou sans conducteur embarqué afin de faire de l'imagerie de la canopée des cultures.



PHENOPSIS



PHENOSCOPE



WIWAM XY

Figure I-2. Photographies de 3 plateformes de phénotypage européennes utilisées pour analyser les réponses au déficit hydrique de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. PHENOPSIS est en place au Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux depuis 2004 pour des analyses multi-échelles de la réponse au stress hydrique (Granier *et al.*, 2006). PHENOSCOPE est largement utilisé depuis 2009 à l'Institut Jean Pierre Bourgin à Versailles pour analyser la variabilité génétique des réponses au stress hydrique (Tisné *et al.*, 2013). WIWAM a été développée en 2010 à Gent au Laboratoire Plant System Biology pour des approches de génomique fonctionnelle (Skirycz *et al.*, 2011).

I.2.2 Plasticité des plantes en réponse au déficit hydrique du sol

Réponse globale du fonctionnement de la plante au déficit hydrique

En l'absence d'une ressource en eau suffisante et accessible au niveau racinaire, la plante perd une partie de son eau et le potentiel hydrique des cellules diminue. Les conséquences sont multiples et se produisent à différentes échelles dans la plante et sur différents pas de temps (Figure I.3; Chaves *et al.*, 2003). Les principales réponses sont une réduction de la pression de turgescence, moteur de la croissance cellulaire et de la croissance des organes de la plante et, une fermeture des stomates ce qui limite la transpiration et diminue l'activité photosynthétique (Figure I.3). Ces réponses ont lieu à l'échelle de la feuille en réponse à des stimuli générés par la feuille elle-même ou ailleurs dans la plante. Une diminution de la transpiration de la plante suite à la fermeture de ses stomates en réponse au déficit hydrique peut être vue comme une réponse positive, permettant ainsi une économie de l'eau. Mais, la diminution de la photosynthèse qui l'accompagne et la réduction de croissance foliaire ont un effet négatif sur l'assimilation du carbone. Les plantes terrestres sont donc confrontées à une sorte de compromis lors de la réponse au stress hydrique: maintenir un équilibre hydrique tout en assurant une croissance suffisante. Il en résulte que tous les compartiments de la plante incluant les racines, les parties végétatives et, les parties reproductrices, peuvent être impactés par le déficit hydrique suivant son intensité.

Traditionnellement, les stratégies des plantes pour faire face au déficit hydrique sont divisées en trois catégories : i) éviter la déshydratation en prévenant les pertes d'eau excessives; ii) limiter la déshydratation en ajustant le métabolisme pour maintenir les flux d'eau; iii) échapper à la sécheresse en achevant le cycle de vie avant la période de sécheresse (Ludlow, 1989). Cependant ces stratégies ne sont pas exclusives, et, en pratique, les plantes combinent plusieurs types de réponse (Ludlow, 1989). Ces stratégies entraînent chacune, la mise en place de différents ajustements développementaux, morphologiques et physiologiques (Figure I.3).

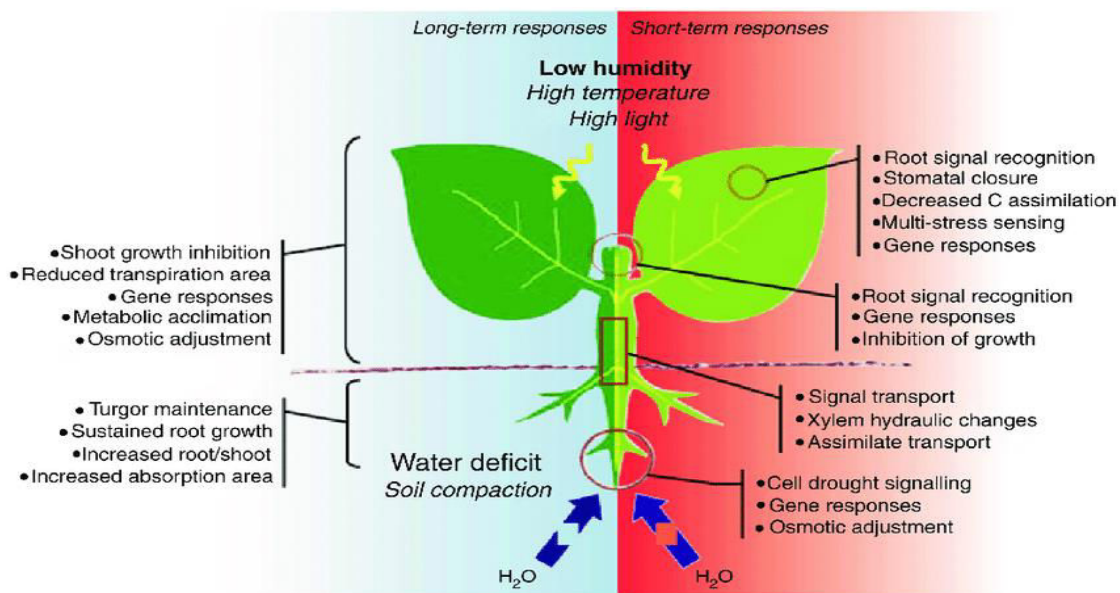


Figure I-3. Réponses au déficit hydrique du sol sur les différentes fonctions de la plante. A gauche; réponses à long terme et à droite, réponses à plus court terme. D'après Chaves et al., 2003.

Plasticité du développement et de la croissance des organes végétatifs en réponse au déficit hydrique

Le développement et la croissance foliaire résultent de la combinaison de plusieurs processus élémentaires, à différents niveaux d'organisation, tels que la formation de nouvelles feuilles, la vitesse et la durée d'expansion de chacune des feuilles, l'intensité de production des cellules dans les feuilles ainsi que leur expansion individuelle (Lecoeur *et al.*, 1995). Les feuilles successives sont initiées au niveau du méristème à des positions précises et à un rythme dépendant fortement de la température (Granier *et al.*, 2002). La transition florale est induite par la transmission d'un signal systémique provenant des feuilles, historiquement appelé florigène, qui provoque un changement dans le comportement du méristème apical : les gènes de floraison sont activés et le méristème apical produit alors des organes floraux (Lohmann et Weigel, 2002). La transition florale est régulée par les signaux environnementaux marquant les changements de saison, comme la température, la photopériode ou les contraintes hydrominérales.

Pour de nombreuses espèces, les dates d'initiation et d'apparition des organes ne sont pas affectées en réponse au déficit hydrique sauf en cas de stress extrêmement sévères (Baker *et al.*, 1986; Bauer *et al.*, 1984). Mais, la durée de développement des organes est réduite ou rallongée suivant l'intensité du stress, sa position dans le cycle et/ou l'espèce considérée. De nombreuses études rapportent un raccourcissement du cycle de la plante et ce type de réponse est interprété comme une stratégie d'évitement de la contrainte (Pigliucci et Schlichting, 1995; Dorn *et al.*, 2000). Si le nombre de feuilles est peu ou pas affecté, l'expansion foliaire quant à elle, est communément réduite par un déficit hydrique, ce qui est associé à une stratégie de conservation de l'eau, la transpiration de la plante étant liée à la surface foliaire (Casadebaig *et al.*, 2008). Chez la tomate, les différences de surface foliaire totale par plante entre différents génotypes ou pour un même génotype cultivé dans différentes conditions

environnementales sont essentiellement dues à une diminution de la surface des feuilles individuelles (Ripoll *et al.*, 2016b). L'effet du déficit hydrique sur le développement foliaire de la tomate n'a pas été étudié à notre connaissance.

L'expansion foliaire chez les dicotylédones, dont la tomate fait partie, connaît différentes phases au cours du temps : une première phase durant laquelle il y a à la fois de la prolifération cellulaire et de l'expansion cellulaire, puis une phase d'expansion cellulaire qui précède une phase de maturation quand la feuille a atteint sa taille définitive (Granier et Tardieu, 1998 chez le tournesol; Baerenfaller *et al.*, 2012 chez *Arabidopsis thaliana*; Gonzalez *et al.*, 2012). La première phase s'accompagne d'une expansion exponentielle de la feuille (Poethig et Sussex, 1985; Nelissen *et al.*, 2016; Figure I.4). Dans la deuxième phase, la prolifération cellulaire cesse selon un gradient temporel et spatial de la pointe de la feuille vers la base, alors que l'expansion foliaire se poursuit avec l'expansion cellulaire (Donnelly *et al.*, 1999; Nelissen *et al.*, 2016; Figure I.4). Enfin, l'expansion cellulaire s'arrête selon le même gradient que la division cellulaire, de la pointe vers la base de la feuille, et la feuille atteint sa taille finale. Cette organisation spatiale et temporelle des processus cellulaires au cours du développement de la feuille est très semblable entre les feuilles de monocotylédones et dicotylédones (Figure I.4, Nelissen *et al.*, 2016).

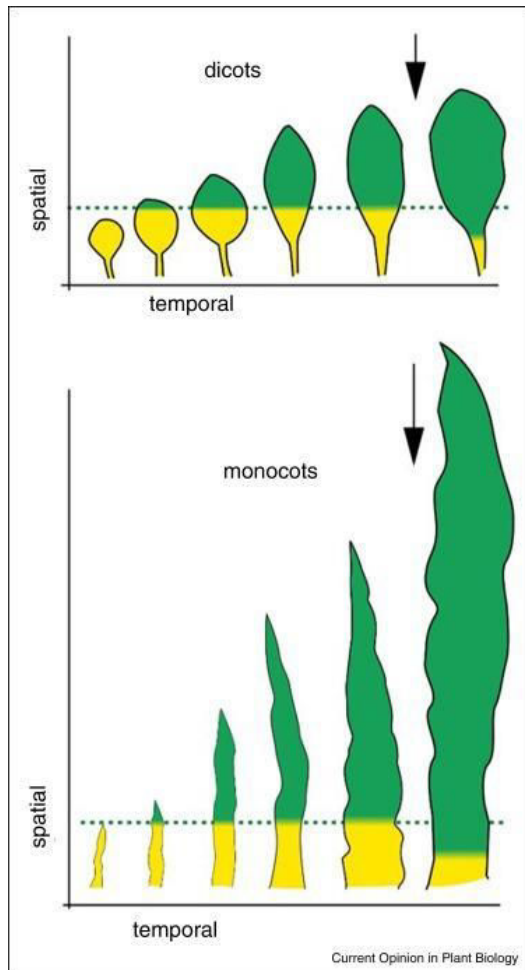


Figure I-4. Représentation schématique de l'organisation spatiale et temporelle des divisions cellulaires lors de l'expansion d'une feuille de dicotylédone (partie haute) et d'une monocotylédone (partie basse). La couleur jaune indique la proportion du limbe avec des cellules en division cellulaire). La flèche verticale indique l'arrêt de l'expansion exponentielle de la feuille. D'après Nelissen *et al.*, 2016.

Le nombre et la taille des cellules peuvent être tous les deux affectés par les contraintes environnementales suivant le moment où la contrainte est appliquée dans le développement de la feuille et suivant son intensité. Ainsi, une contrainte hydrique du sol peut entraîner une réduction (1) du nombre de cellules si elle intervient de façon précoce dans le développement de la feuille; (2) de la taille de cellules si elle intervient de façon tardive; (3) à la fois du nombre de cellules et de la surface des cellules si la période de contrainte hydrique du sol couvre les deux périodes de développement de la feuille (Lecoeur *et al.*, 1995 chez le pois; Granier et Tardieu, 1999b chez le tournesol; Baerenfaller *et al.*, 2012 chez *Arabidopsis thaliana*). En réponse à certaines contraintes environnementales, comme un ombrage, la surface et le nombre de cellules dans une feuille peuvent varier avec des réponses opposées et des compensations entre ces deux variables peuvent entraîner un maintien de la surface des

feuilles (Cookson *et al.*, 2005). Un troisième processus peut interagir avec la division cellulaire et l'expansion des cellules. En effet, les cellules peuvent entrer dans un cycle d'endoréduplication (endocycle) durant lequel l'ADN est répliqué sans qu'il y ait de division cellulaire (Figure I.5). Une relation positive entre la taille des cellules et leur niveau d'endoréduplication a souvent été montrée dans la littérature (Melaragno *et al.*, 1993; Boudolf *et al.*, 2004; Figure I. 6). Un déficit hydrique prolongé entraîne une réduction du nombre d'endocycles dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Baerenfaller *et al.*, 2012).

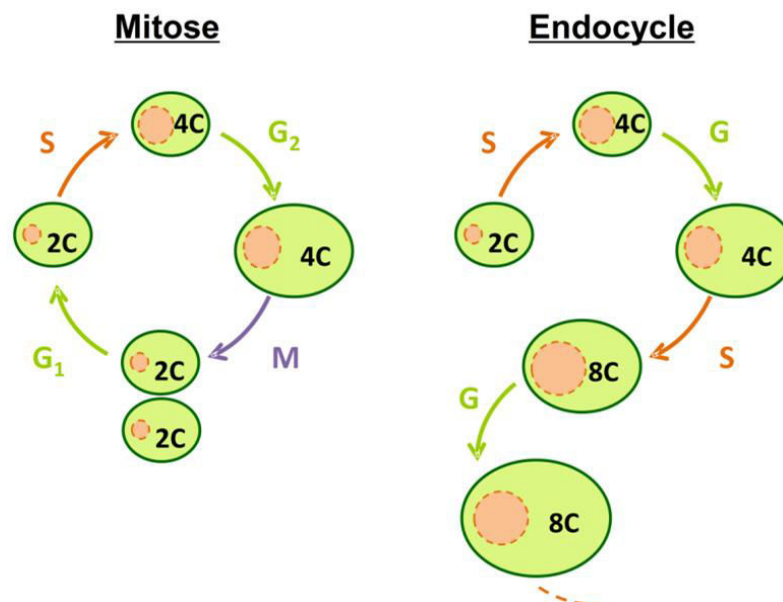


Figure I-5. L'endocycle est une modification du cycle mitotique qui résulte en une augmentation du niveau de ploïdie de la cellule. Le niveau de ploïdie (kN , nombre de copies de l'ADN du noyau cellulaire) est indiqué dans la cellule. G₁, Gap 1 (Phase de croissance cellulaire). S, Synthèse (Phase de répllication de l'ADN). G₂, Gap 2 (Phase de croissance cellulaire). M, Mitose (Phase de division cellulaire). G, Gap (Phase de croissance cellulaire).

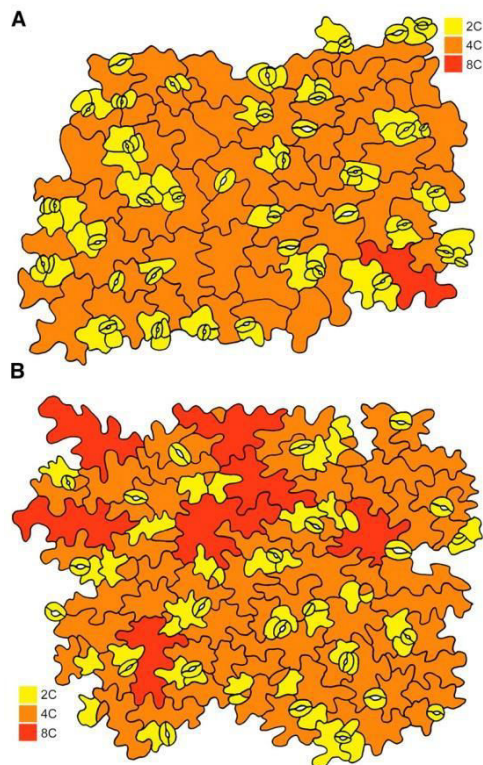


Figure I-6. Epidermes de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* 14 jours après germination pour : **(A)** une plante sauvage, Col-0. **(B)** une plante avec un niveau d'endocycle plus élevé (surexprimant *CDKB1;1.N161*). Le niveau de ploïdie de chaque cellule observée au microscope après coloration du noyau est indiqué par une couleur : jaune (2C), orange (4C) et rouge (8C). D'après Boudolf *et al.*, 2004)

Plasticité du développement racinaire en réponse au déficit hydrique

La plasticité du développement et de la croissance des racines en réponse aux conditions d'eau-limitées exige un compromis entre conserver les ressources métaboliques et augmenter le secteur du sol exploré pour conserver un accès à l'eau disponible. La croissance racinaire est diminuée ou augmentée en réponse au stress hydrique (Rauf et Sadaqat, 2008). En général, elle est moins affectée que la surface foliaire et, ceci est présenté comme une réponse stratégique pour explorer de nouvelles zones du sol (Rauf et Sadaqat, 2008). Dans des conditions modérées de déficit hydrique, une augmentation du taux de croissance des racines de maïs est observée comparé à des maïs bien irrigués, alors que la croissance aérienne est fortement diminuée (Sharp et Davies, 1979; Eghball et Maranville, 1993). En réponse à un déficit hydrique plus sévère, cependant, les racines de maïs présentent une réduction de croissance (Eghball et Maranville, 1993).

Plasticité du développement des fruits en réponse au déficit hydrique

Chez la plupart des fruits charnus, le développement des fruits est généralement divisé en 3 phases distinctes (Gillaspy *et al.*, 1993, Figure I.7). Dans la phase I, l'ovaire se différencie à partir du méristème floral et se développe jusqu'à un point où il est prêt pour la pollinisation et la fécondation. Dans la phase II, l'ovaire est fécondé et entre dans une phase de division cellulaire. Ensuite, une phase de division cellulaire intense commence et dure de 10 à 25 jours chez la tomate selon les génotypes (Bertin *et al.*, 2007). Après cette phase, les divisions cellulaires déclinent graduellement en même temps que les premières cellules entrent dans une phase d'expansion rapide (Gillaspy *et al.*, 1993; Bertin *et al.*, 2003a). L'expansion des cellules accompagne alors principalement la croissance du fruit, et le fruit atteint sa taille finale peu avant le début de la maturation (Giovannoni, 2004; Figure I.7).

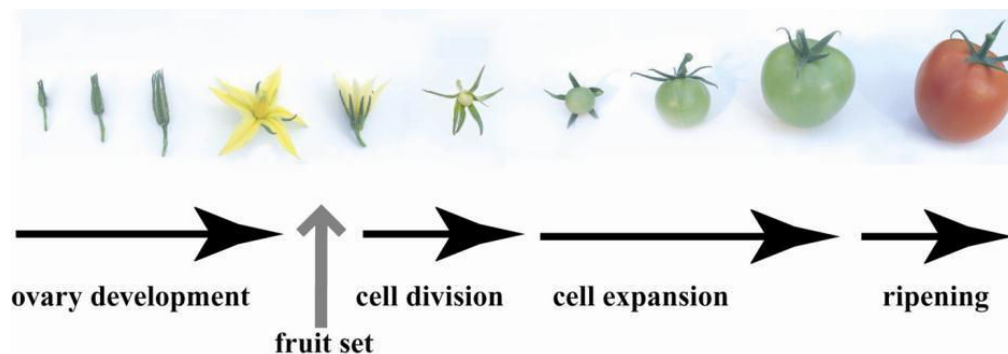


Figure I-7. Représentation schématique des phases successives dans le développement du fruit de tomate. (D'après Ariizumi *et al.*, 2013).

Pendant ces phases du développement du fruit, le carpelle se différencie en péricarpe et le placenta développe un nouveau tissu : le tissu loculaire ou gel. Le volume des cellules du péricarpe de fruits rouges est entre 2.000 et 220.000 fois plus grand que celui des cellules au stade pré-anthèse (Cheniclet *et al.*, 2005), indiquant que le volume du péricarpe est un déterminant fort de la taille du fruit. Ainsi, la taille du fruit est fortement associée à l'épaisseur du péricarpe, elle-même déterminée par le nombre d'assises cellulaires et l'expansion des

cellules (Cheniclet *et al.*, 2005). L'augmentation spectaculaire du volume du fruit au cours de sa croissance résulte d'une forte expansion cellulaire (Ho, 1996; Figure I.7) bien que la taille finale du fruit soit fortement corrélée au nombre de cellules du péricarpe (Bertin *et al.*, 2002 ; 2003a). Chez de nombreux fruits charnus, la croissance cellulaire est accompagnée d'endoréduplication. Une corrélation positive forte entre la surface cellulaire et le niveau de ploïdie a d'ailleurs été observée dans le fruit chez la tomate (Cheniclet *et al.*, 2005; Bourdon *et al.*, 2011). La division cellulaire, la croissance cellulaire et l'endoréduplication sont contrôlées par un réseau de gènes dont l'expression est sensible à l'environnement (Baldet *et al.*, 2006; Chevalier, 2007 ; Prudent *et al.*, 2009).

Le stress hydrique réduit généralement le nombre et la masse des fruits récoltés par plante chez la tomate (Pervez *et al.*, 2009). En général, le nombre de fleurs initiées par plante est dépendant de la taille de la plante. Par exemple, dans le cas du coton il existe une corrélation linéaire entre le nombre de fleurs formées et la hauteur de la plante (Jordan, 1982). Chez les plantes à croissance indéterminée comme certaines variétés de tomate, le nombre de fleurs est associé au nombre d'inflorescences le long de la tige et au nombre de boutons floraux par inflorescence. Le déficit hydrique réduit souvent la taille de la plante et le nombre de fleurs par plante. Lorsque le stress hydrique est sévère au moment de la pollinisation, la fécondation et la nouaison sont susceptibles d'être inhibées en raison d'une réduction des flux d'eau et de carbone vers le fruit (Hsiao, 1993; Westgate et Boyer, 1986). La diminution du nombre de fruits noués, donc de fruits en compétition pour les assimilats carbonés, peut à l'inverse favoriser la croissance des fruits restants (Ripoll *et al.*, 2016b). Chez la tomate, la contrainte hydrique conduit de façon concomitante à une diminution du potentiel osmotique du fruit (Mitchell *et al.*, 1991a; Ripoll *et al.*, 2016b) et à une diminution de la pression de turgescence (Spollen et Sharp, 1991). Le potentiel hydrique du fruit peut aussi diminuer en fonction de l'intensité du stress (Ehret et Ho, 1986; Lee, 1989; Johnson *et al.*, 1992) mais dans une

gamme bien inférieure à celui de la tige (Guichard *et al.*, 2005). Par ailleurs, Mingo *et al.* (2003) ont montré que la croissance du fruit est affectée par le stress hydrique indépendamment de la turgescence et propose une régulation par le pH des cellules du sous épiderme. Des modifications des propriétés des parois cellulaires par le stress hydrique ont également été suggérées (Boyer, 1988).

Globalement en fonction du stade de la plante et du fruit, un déficit d'irrigation modéré constitue un levier potentiel à explorer pour améliorer la qualité du fruit sans réduction forte de sa taille (Ripoll *et al.*, 2014).

I-3 LA TOMATE : UN MODÈLE DE PLANTE CULTIVÉE POUR L'ÉTUDE DES RÉPONSES AU DÉFICIT HYDRIQUE

La tomate est le second légume le plus consommé au monde (FAO 2017 <http://faostat.fao.org>). Une grande partie de la production de tomate provient du bassin méditerranéen où la rareté de l'eau et la salinité sont de plus en plus importantes. Les espèces de tomates sauvages sont natives de l'Amérique du Sud, le long de la côte et des hautes Andes, du centre de l'équateur, en passant par le Pérou, vers le nord du Chili et des îles Galápagos. En conséquence, les espèces sauvages de tomate sont adaptées à une gamme d'habitats variés, du niveau marin de la côte Pacifique à une altitude de 3300 m sur les hauts plateaux des Andes, et du climat aride au climat pluvieux (Bergougnoux, 2014). Les tomates cultivées pour la transformation sont essentiellement cultivées en plein champs et ce sont des variétés à croissance déterminée, tandis que les tomates cultivées pour la consommation sont essentiellement cultivées sous abris et souvent à croissance indéterminée (Figure I.8). Ainsi, la partie aérienne de la tomate indéterminée est composée d'unités sympodiales successives. Une unité sympodiale est formée par un entre-noeud, des feuilles composées successives et,

une inflorescence. Des tiges secondaires peuvent se développer à la base de l'implantation des feuilles sur la tige principale.

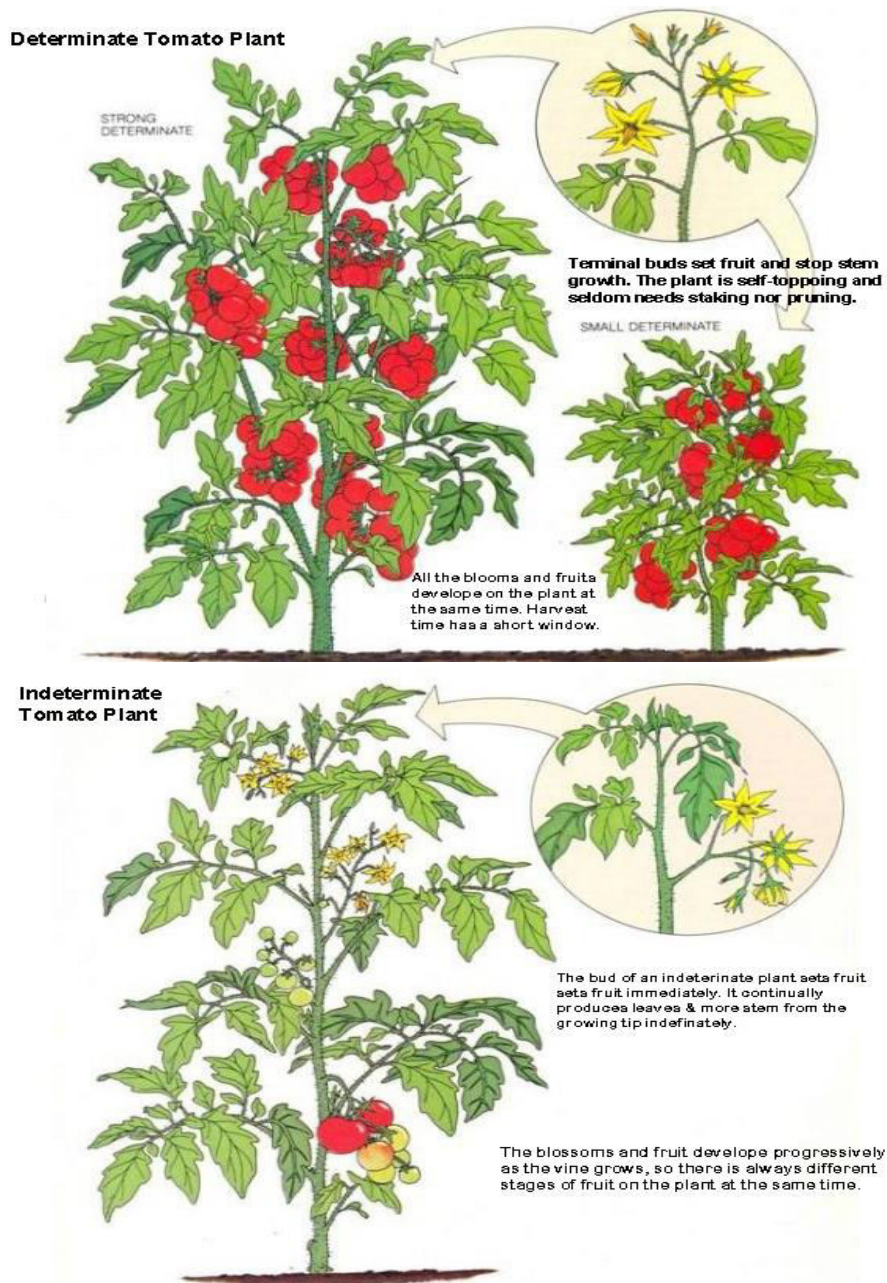


Figure I-8. Représentations schématiques des deux principaux type de tomates suivant si leur croissance est déterminée (figure du haut) ou indéterminée (figure du bas).

(D'après S. Stone-Schmidt, 2015).

<https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=16937>

De plus le fruit de la tomate est considéré comme un modèle biologique pour l'étude des fruits charnus. D'autres plantes sont des organismes modèles pour les scientifiques telles qu'*Arabidopsis thaliana*, le maïs, le riz ou le peuplier. Mais, la tomate est phyllogénétiquement distante de ces plantes et possède des traits morphologiques qui ne sont pas partagés avec les autres modèles de plante. Ceci est probablement dû i) aux possibilités de croissance de la tomate dans différentes conditions, permettant une meilleure compréhension de l'adaptation de la tomate à différents stress abiotiques (froid, sécheresse, etc.), ii) à son cycle de vie relativement court, iii) à l'insensibilité de sa photopériode, i.e. la possibilité de fleurir et, en conséquence produire des fruits dans n'importe quelle condition de durée de jour, iv) à son auto-fertilité et son homozygotie, v) au contrôle facile de la pollinisation et de l'hybridation, vi) à la simplicité de sa génétique avec son génome relativement petit (estimé à approximativement 900 Mb pour le cultivar « Heinz 1706 », utilisé pour le récent séquençage du génome de la tomate, The Tomato genome consortium 2012) et la faible proportion de gènes dupliqués et, vii) sa capacité à se propager de manière asexuée par greffe, ou en régénérant une plante entière à partir de morceaux de différentes parties de la plante.

Chez la tomate cerise (*Solanum lycopersicum*), lignée West Virginia 106 (WVa 106), étudiée au cours de la thèse, le nombre de feuilles composées varie d'une unité sympodiale à une autre (Figure I.9A). La première unité sympodiale comporte jusqu'à 13 feuilles composées. Les unités sympodiales suivantes sont composées de 2 à 3 feuilles. Chaque feuille composée est attachée à la tige principale par un pétiole et est composée d'un rachis avec une foliole terminale (numéroté 1) et 6 autres folioles (folioles latérales) positionnées par paires sur la gauche et la droite du rachis respectivement (Figure I.9B). Les folioles sont attachées au rachis par un pétiolule (Figure I.9B). Les inter-folioles sont plus petites que les folioles principales et sont situés entre les paires successives de folioles (attachées au rachis), tandis que les intra-folioles, de petite taille sont attachées aux pétiolules des folioles.

Les fleurs sont regroupées en inflorescences (Figure I.9A). Chez la tomate cerise, le méristème de l'inflorescence apparaît sous la forme d'une inflorescence monochasiale, ce qui signifie que le bourgeon terminal va arrêter sa croissance et fleurir. C'est une cyme de type scorpioïde unipare de six à dix fleurs. La fleur est constituée de cinq sépales qui s'alternent avec cinq pétales, cinq étamines soudées formant un cône autour du pistil (c'est-à-dire l'ovaire, le style et le stigmate). L'ovaire est formé de deux carpelles (parfois plus). Le fruit de la tomate est une baie (fruit à péricarpe entièrement charnu, contenant des graines appelées pépins). La pulpe charnue est divisée en loges contenant les graines dans un mucilage.

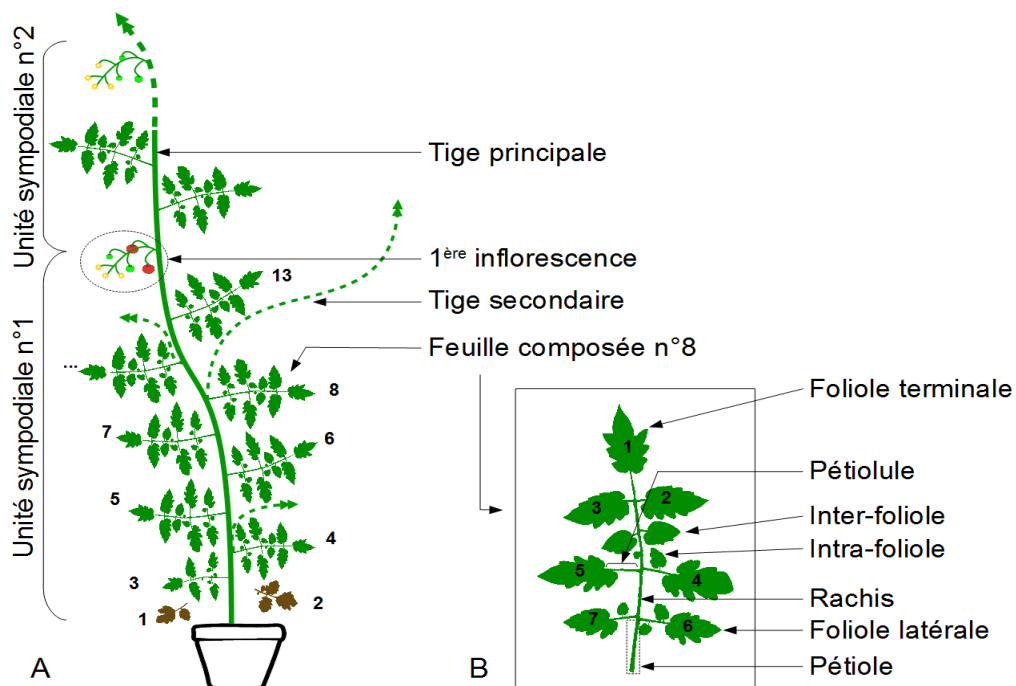


Figure I-9. Représentation schématique de l'architecture aérienne de la tomate cerise avec les unités sympodiales successives (A) et un zoom sur l'organisation spatiale d'une feuille composée (B).

importante pour les sélectionneurs et scientifiques pour isoler et comprendre les fonctions des gènes qui régulent le développement de la tomate (Lozano *et al.*, 2009). Les objectifs principaux des sélectionneurs sont l'adaptation à l'environnement, la résistance aux maladies, la qualité du fruit et, le rendement. Dans l'histoire de la sélection, quatre phases se distinguent : la sélection pour le rendement dans les années 1970, la durée de conservation dans les années 1980, pour le goût dans les années 1990 et, pour la valeur nutritionnelle depuis lors (Bai et Lindhout, 2007; Bauchet et Causse, 2012; Causse *et al.*, 2007; Foolad, 2007). Plus récemment les généticiens se sont intéressés au gènes et QTLs de réponse au déficit hydrique chez la tomate (Albert *et al.*, 2016). La base moléculaire du syndrome de domestication a été étudiée pour les habitudes de culture (taille, hauteur des plantes, précocité) et les traits du fruit (position, taille, forme, couleur, morphologie).

I-4 OBJECTIFS DE LA THÈSE ET CADRE DES EXPÉRIMENTATIONS MENÉES POUR Y RÉPONDRE

L'objectif de mon travail de thèse était d'analyser chez la tomate la réponse de la croissance des feuilles et des fruits à des déficits hydriques du sol avec une analyse multi-échelles dans le but de répondre aux questions suivantes :

- **Quels sont les effets de différents scénarios de déficits hydriques du sol sur la croissance de la feuille et du fruit chez la tomate ?**
- **Quels sont les effets de déficits hydriques du sol sur les traits cellulaires, i.e, la division cellulaire, l'expansion cellulaire et l'endoréduplication, susceptibles de contrôler la taille de la feuille et /ou du fruit ?**
- **Quelles sont les relations entre ces différents traits au cours du temps pendant la croissance de l'organe et lors d'une plasticité causée par la contrainte hydrique du sol ou un effet génétique?**

L'étude a essentiellement porté sur le génotype de tomate cerise *Solanum lycopersicum*, cv. West Virginia 106 (WVa 106) qui a été cultivé dans 3 expérimentations menées à Avignon et Montpellier (expérimentations A, B et C, Tableau I.1). Les tomates cerise (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme) sont considérées comme les plus proches de la forme ancestrale de tomate cultivée (Ranc *et al.*, 2008). La variété WVa 106 est une variété de tomate cerise très utilisée en biologie végétale. Les travaux préliminaires établis à PSH sur cette variété ont permis de caractériser de façon précise la croissance du fruit de l'ovaire à sa maturité et, de nombreuses lignées transgéniques ont été développées par d'autres laboratoires (dont l'UMR BFP de Bordeaux, avec qui j'ai pu collaborer). Dans le cadre de cette thèse, nous avons également analysé la croissance des feuilles et des fruits de deux lignées transgéniques affectées dans des processus cellulaires pouvant affecter la croissance, Pro 35S :Slccs52A^{AS} et ProPEPc2 :SICCS52A^{OE} au cours des expérimentations A et B dans le but de tester des hypothèses sur les relations entre les différents traits mesurés (Mathieu-Rivet *et al.*, 2010).

Dans toutes les expérimentations, **nous avons appliqué des déficits hydriques en sol, sur des plantes de tomates cultivées dans des pots. Les expérimentations ont été menées dans deux types d'environnements : en serre et en chambre de culture.** Lors de l'expérimentation A, en chambre de culture, le pilotage du déficit hydrique a été facilité par l'utilisation d'une plateforme automatisée, PHENOPSIS, qui a permis d'établir des contraintes hydriques du sol stables, reproductibles, de différentes intensités. Lors de l'expérimentation B, un système d'irrigation automatique a également été utilisé en serre. Lors de l'expérimentation C, les plantes ont été cultivées dans un premier temps en chambre de culture puis transférées en serre sur la fin de l'expérimentation pour des raisons d'encombrement des plantes, mais toujours avec un système d'irrigation automatisé

(PHENOPSIS dans la chambre de culture puis PHENODYN en serre). Dans l'expérimentation A, six teneurs en eau du sol ont été testées de façon à établir des courbes de réponse de différents traits mesurés à l'échelle de la plante, des feuilles successives, des folioles successives, des cellules des folioles et des fruits. **Cette première expérimentation a permis d'analyser la réponse de la plante au déficit hydrique du sol pour différents scénarios de stress (Partie II). Ceci était nécessaire pour établir les bases expérimentales et conceptuelles de la suite de la thèse. Elle a permis d'identifier des teneurs en eau du sol (1) optimales pour la croissance de la plante et (2) équivalentes à un stress hydrique modéré pour la suite des analyses (expérimentations B et C, en 2016). L'analyse multi-échelle de l'effet de ces 6 déficits hydriques sur la surface finale des feuilles, des folioles et des variables cellulaires sous-jacentes a permis de tirer des conclusions nouvelles sur les liens entre les différentes variables étudiées et sur la structure de la feuille composée (Partie III, Koch *et al.*, 2018). Par ailleurs, l'analyse d'une lignée transgénique affectée sur le cycle cellulaire cultivée dans cette même expérimentation a permis d'aller plus loin dans ces conclusions (Partie III, Koch *et al.*, 2018).** Ainsi, dans l'expérimentation C, en 2016, les plantes ont été cultivées en conditions optimales d'irrigation et en déficit hydrique modéré. Le but de l'expérimentation était d'établir une analyse multi-échelle dynamique de l'effet d'un déficit hydrique modéré sur l'expansion de la feuille (Partie III). Le cadre d'analyse d'expansion des feuilles a pu largement être simplifié grâce aux résultats acquis dans l'expérimentation A. **Les données obtenues ont permis d'établir des cinétiques de nombre de cellules, surface de cellules et d'endoréduplication pendant l'expansion de la feuille et de montrer que tous ces traits étaient affectés par la contrainte hydrique du sol.** Dans l'expérimentation B, en 2016, les plantes ont également été cultivées en conditions optimales d'irrigation et en déficit hydrique modéré. Le but de l'expérimentation était d'établir une analyse multi-échelle dynamique de l'effet du déficit hydrique sur la croissance

du fruit (Partie IV). **L'analyse en dynamique des différentes variables cellulaires dans le fruit a mis en évidence des découplages entre certaines variables au cours du temps et en réponse au stress hydrique (Partie IV). Dans cette expérimentation en serre, des données sur la plante entière ont également été acquises et ont permis de montrer que les effets du stress hydrique modéré établi dans des conditions de serre étaient proches de ceux obtenus en chambre de culture (Expérimentation A) sur des variables intégrées (Partie II).**

Tableau I-1. Tableau récapitulatif des expérimentations effectuées pendant la thèse, leur localisation, les conditions de culture et leur finalité ainsi que le chapitre dans lesquels elles sont présentées.

<i>Exp.</i>	<i>Année</i>	<i>Condition de culture</i>	<i>Génotypes</i>	<i>Traitements</i>	<i>Finalité/Chapitre</i>
A	2015	Chambre de culture PHENOPSIS	WVa106	Différentes teneurs en eau du sol (gH ₂ O g ⁻¹ sol sec): 1.6 / 1.4 / 1.2 / 0.9 / 0.6 / sévère	Courbes de réponses plante entière à la teneur en eau du sol CHAP. II
A	2015	Chambre de culture PHENOPSIS	WVa106	Différentes teneurs en eau du sol (gH ₂ O g ⁻¹ sol sec): 1.6 / 1.4 / 1.2 / 0.9 / 0.6 / sévère	Courbes de réponses multi-échelles 'feuilles' à la teneur en eau du sol CHAP. III
A	2015	Chambre de culture PHENOPSIS	Pro 35S :Slccs52A ^{AS}	1.4	Effet de la mutation sur le développement des feuilles CHAP. III
B	2016	Serre	WVa106	Bien irriguée / Déficit hydrique modéré	Réponse à la teneur en eau du sol 'plante entière' CHAP. II
B	2016	Serre	WVa106	Bien irriguée / Déficit hydrique modéré	Cinétique multi-échelles fruit CHAP. IV
B	2016	Serre	ProPEPc2 :SIC CS52A ^{OE}	Bien irriguée	Effet de la surexpression sur les cinétiques multi-échelles fruit CHAP. IV
C	2016	PHENOPSIS (chambre de culture)/PHENO DYN (serre)	WVa106	Deux teneurs en eau du sol (gH ₂ O g ⁻¹ sol sec) : 1.4 / 0.8	Cinétiques multi-échelles feuille CHAP. III
C	2016	PHENOPSIS (chambre de culture)/PHENO DYN (serre)	WVa106	Différentes teneurs en eau du sol (gH ₂ O g ⁻¹ sol sec) : 1.4 / 0.8	Cinétiques multi-échelles fruit CHAP. III

Structure de la suite du document

Après cette présentation générale du contexte de mon travail, qui sert d'introduction aux chapitres qui vont suivre, la suite de ma thèse est présentée sous le format de 3 articles successifs (II, III et IV) et d'une discussion générale (V). Les chapitres II, III et IV sont donc organisés chacun avec leur propre introduction, leur matériel et méthodes, leur partie « résultats » suivie d'une discussion et d'une conclusion. Le tout est rédigé en français.

Une partie du chapitre III a été soumise dans une revue internationale à comité de lecture et est maintenant publiée dans *Annals of Botany* (Koch *et al.*, 2018). Cet article est présenté tel qu'il a été publié en annexe 1.

Les développements méthodologiques et les premiers tests d'hypothèses réalisés en tout début de thèse m'ont permis de contribuer à un article technique (Dauzat *et al.*, 2016) et de rédiger un article paru dans *Acta Horticulturae* (Koch *et al.*, 2017). Ces deux articles sont présentés tels qu'ils ont été publiés en annexe 2 et 3 respectivement.

**PARTIE II : ANALYSE DE L'EFFET DE DIFFÉRENTS
SCÉNARIOS DE STRESS HYDRIQUES SUR LE
DÉVELOPPEMENT ET LA CROISSANCE DE LA
PLANTE CHEZ LA TOMATE**

II-1 INTRODUCTION DE LA PARTIE II

Les végétaux s'adaptent à un milieu fluctuant et contraignant en modifiant leurs caractéristiques morphologiques, phénologiques et physiologiques. En réponse à des déficits hydriques du sol, suivant l'intensité de ce déficit, la plante met en place des mécanismes pour s'adapter et maintenir un statut hydrique favorable à son développement, i.e. la mise en place de ses organes et leur croissance. Une première stratégie est de favoriser le développement et l'activité du système racinaire pour prospecter des horizons de sol plus profonds et en extraire l'eau. La taille et l'architecture du système racinaire déterminent la capacité de la plante à accéder à l'eau et aux nutriments, facteurs limitants de la croissance et, donc, du rendement dans la plupart des écosystèmes agricoles (Lynch, 1995; Price *et al.*, 1997). Toutefois, malgré le maintien du développement racinaire en réponse au déficit hydrique chez le blé, une baisse de l'indice de récolte liée à une diminution des assimilats disponibles pour la croissance des graines a été observée (Passioura, 1983). Pour de nombreuses espèces et de nombreux scénarios de déficits hydriques du sol, même si la croissance racinaire n'est pas augmentée ou maintenue en réponse au déficit hydrique du sol, elle reste toutefois moins impactée que la croissance des parties aériennes et il en résulte une diminution du ratio masse aérienne/masse racinaire (Westgate et Boyer, 1985).

Une deuxième stratégie implique le développement et la croissance des organes végétatifs. Dans des situations de contraintes, qu'elles soient minérales, hydriques ou lumineuses, la surface foliaire de la plante est généralement réduite chez de nombreuses espèces telles que le soja, *Arabidopsis thaliana* et le tournesol (Granier et Tardieu, 1999a; Granier et Tardieu, 1999b; Cookson et Granier, 2006; Chiera *et al.*, 2002; Aguirrezabal *et al.*, 2006) alors que le nombre de feuilles est peu ou pas diminué chez le tournesol ou chez *Arabidopsis thaliana* (Yeggapan *et al.*, 1982; Granier *et al.*, 2006). Dans le cas d'une contrainte hydrique du sol, la

réduction de surface foliaire est souvent interprétée comme une stratégie d'économie en eau par la plante (Tardieu, 2003). La diminution de surface des feuilles individuelles est généralement liée à une diminution de la vitesse d'expansion des feuilles alors que leur durée d'expansion est peu modifiée ou parfois même rallongée (Lecoeur *et al.*, 1995; Granier et Tardieu, 1999b).

Une troisième stratégie implique le fonctionnement du système foliaire, la régulation stomatique et, surtout, l'efficacité de l'appareil photosynthétique (Urban *et al.*, 2017). Les feuilles sont les surfaces privilégiées d'échanges gazeux entre la plante et le milieu aérien. Suivant l'intensité de la contrainte hydrique, les échanges gazeux peuvent être affectés ou pas. Ainsi, dans de nombreuses situations de stress hydriques modérés, la surface foliaire est diminuée sans que la photosynthèse par unité de surface ne soit affectée. Il en résulte une concentration en sucres solubles plus élevée comme cela a été montré dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Wuyts *et al.*, 2012). Dans le cas de la tomate, à un stade de 5 feuilles totalement développées, l'activité photosynthétique commence à diminuer à partir d'une privation de 6 jours d'irrigation (Brix, 1962). Sur des plantes de tomate plus âgées au stade reproducteur, des épisodes successifs de déficit hydrique d'intensité croissante induisent d'importantes régulations osmotiques, une réduction de la croissance foliaire et une adaptation du système photosynthétique (Ripoll *et al.*, 2016a).

Au niveau du développement reproducteur, les effets du stress hydrique varient en fonction de la phase de développement de la plante affectée comme cela a été montré chez la tomate (Prieto *et al.*, 2000; Nuruddin *et al.*, 2003; Ripoll *et al.*, 2016b). Le rendement de la culture de tomate peut diminuer en raison d'une variation du poids moyen des fruits (Van Ieperen, 1996a; Cuartero et Fernandez-Munoz, 1998) et/ou du nombre de fruits noués par plante (Gormley et Maher, 1990; Hao *et al.*, 2000). Un stress hydrique tout au long de la saison de croissance réduit de manière significative le nombre et la taille des fruits comme chez le

piment (Cantore *et al.*, 2000). Des stress appliqués uniquement lors de la floraison des plantes de tomate produisent des fruits moins nombreux mais plus gros (Nuruddin *et al.*, 2003). Au cours du développement du fruit, la sensibilité de chaque phase (division, expansion, maturation) au déficit hydrique est génotype dépendante (Ripoll *al.*, 2016b). La réduction de la taille du fruit de tomate est associée à une diminution de l'accumulation d'eau dans le fruit, tandis que la quantité de masse sèche accumulée par le fruit n'est pas ou peu affectée (Ehret et Ho, 1986; Sonneveld et Welles, 1988; Van Ieperen, 1996b).

Comme cela a été mentionné dans l'introduction générale pour d'autres exemples, dans la plupart de ces études, les différents traits associés au développement et/ou à la croissance de la plante, sont mesurés dans deux conditions hydriques : l'une dite 'favorable' et l'autre dite 'de déficit' ou 'de stress'. Peu de travaux ont analysé des gammes de déficit hydrique de différentes intensités et/ou de durée ou position variables dans le cycle de la plante (Ripoll *et al.*, 2016b) même si il est clairement admis qu'il n'y a pas une réponse unique au déficit hydrique du sol mais presque autant de réponses que de scénarios (Tardieu, 2012). Des études permettant d'analyser la réponse de la plante en fonction de l'intensité du déficit hydrique du sol, de sa durée et/ou de sa position dans le cycle de la plante ont été menées au LEPSE, sur le pois, le maïs, le tournesol et *Arabidopsis thaliana* (Turc et Lecoœur, 1997; Reymond *et al.*, 2003; Granier *et al.*, 2006).

L'objectif de cette première partie de ma thèse était d'analyser l'effet de différents scénarios de contrainte hydrique du sol (différentes intensités et durées) sur les développements foliaires, racinaires et fructifères de la tomate. Une première expérimentation en chambre de culture (expérimentation A), avec un système d'irrigation automatisé, a permis de tester l'effet de différentes intensités de teneurs en eau du sol sur les variables liées au développement aérien (le développement végétatif et, le développement reproducteur qui

n'est pas présenté ici car les effectifs en grappes et fruits se sont avérés trop faibles étant donné le stade précoce de la récolte lié à un problème d'encombrement des plantes dans la chambre de culture), sur les biomasses souterraines et aériennes. La seconde expérimentation (B), en serre, a permis de tester l'effet d'un niveau de contrainte hydrique modéré stabilisé jusqu'à un stade plus tardif du cycle de la plante (jusqu'à 15 bouquets apparus). Les conditions environnementales en serre étant moins stables, il n'y avait aucune certitude que les effets observés sur les traits soient liés exclusivement au déficit hydrique du sol imposé. Cela a permis d'obtenir des effectifs en termes de fruits et de grappes plus nombreux et plus représentatifs d'une plante en production ainsi que des résultats sur le rendement global de la plante, étant donné la présence de nombreux bouquets.

Il s'agissait là d'établir les bases expérimentales permettant par la suite d'analyser l'effet de la contrainte hydrique du sol sur les croissances des feuilles et des fruits par une analyse multi-échelles sur des bases solides en ayant une bonne connaissance de l'effet de ces contraintes à l'échelle de la plante entière. Les questions étaient d'une part de savoir quel compartiment de la plante était affecté par quel type de déficit hydrique du sol (intensité, durée du déficit). Et, d'autre part de tester jusqu'à quel point les effets d'un déficit hydrique imposé en serre étaient semblables à ceux observés dans une chambre de culture.

II-2 MATÉRIEL ET MÉTHODES DE LA PARTIE II

Les données présentées dans cette partie ont été mesurées sur des plantes cultivées lors de deux expérimentations différentes, A et B (voir Tableau I.1). **Lors de l'expérimentation A**, les plantes ont été cultivées en chambre de culture avec l'automate de pesée et d'irrigation PHENOPSIS. Six régimes hydriques ont été imposés aux plantes durant leur croissance. Le déficit hydrique du sol a été mis en place dès le stade « cinquième feuille développée » et, les plantes ont été récoltées à la fin de la croissance des feuilles de la première unité sympodiale. **Lors de l'expérimentation B**, les plantes ont été cultivées en serre. Deux conditions d'irrigation ont été imposées, une condition bien irriguée et une condition de déficit hydrique du sol définie à partir de l'expérimentation A. Le déficit hydrique du sol a été mis en place après l'émergence des trois premières inflorescences. Les plantes ont été menées à des stades de croissance tardifs, jusqu'à l'apparition de quinze inflorescences.

II.2.1 Matériel végétal et semis

Avant le semis, les graines de plantes de tomate cerise (*Solanum lycopersicum*), lignée West Virginia 106 (WVa 106), ont été décontaminées. Elles ont été plongées dans une solution de Barychlore (0.5 g de Barychlore et 50 ml d'éthanol 50 %) durant 15 mn puis rincées trois fois dans l'éthanol absolu et, séchées sous hotte à flux laminaire pendant au moins 15 mn. Les graines ont été semées sur 1.5 cm d'épaisseur de milieu gélosé dans des boîtes de culture. Le milieu utilisé est un milieu Murashige et Skoog ¼ moyen (MS incluant des vitamines, Duchefa, MO 222) avec 7.5 g de sucrose L⁻¹ et 8 g de phyto-agar L⁻¹. Le pH de la solution a été ajusté entre 5.8 et 6 avec une solution de KOH 2M. Le milieu MS a ensuite été stérilisé. Les boîtes ont été posées dans une chambre de culture pendant 20 jours lors de l'expérimentation A (voir ci-dessous) ou 14 jours lors de l'expérimentation B (voir ci-dessous). Les consignes de température étaient 20°C la nuit et 25 °C le jour.

II.2.2 Conditions de culture des plantules et des plantes

L'expérimentation A a été menée dans une chambre de culture avec un système d'irrigation automatisé grâce à l'automate PHENOPSIS (Figure II-1A & B). L'automate PHENOPSIS qui équipait la chambre de culture était jusqu'ici utilisé pour accueillir et irriguer automatiquement 504 pots de 250 mL, en général pour cultiver des plantes d'*Arabidopsis thaliana* (Figure II.1A; Granier *et al.*, 2006). Il a été modifié pour accueillir et irriguer automatiquement 70 pots de 7L (Figure II.1B; Dauzat *et al.*, 2016). Cinquante-deux pots de 7 L ont été pesés avant et après remplissage avec le sol (Klasmann, Substrat SP 15 %, composition décrite dans l'annexe 4). Au fur et à mesure du remplissage des pots, des aliquots de sol ont été régulièrement prélevés et séchés à l'étuve pendant 6 jours à 60 °C pour estimer les quantités de sol sec et d'eau contenues dans chaque pot (Granier *et al.*, 2006). Trois plantules de tomate ont ensuite été prélevées des milieux gélosés, plantées au centre de chaque pot et immédiatement irriguées avec 30 mL de solution nutritive (Liquoplant rose, Plantin, dilution 4 pour 1000). Les pots ont été déposés dans une chambre de culture qui abrite l'automate PHENOPSIS (Figure II.1B). Les plantules ont été irriguées manuellement avec 30 mL de solution nutritive deux fois par jour pendant une semaine. Ensuite, les plantes ont été éclaircies, pour ne laisser qu'une plante dans chaque pot. Les tiges axillaires ont été ébourgeonnées et les fleurs ont été vibrées trois fois par semaine durant toute l'expérimentation. Ces pratiques permettent d'une part de garder des plantes à architecture homogène et non buissonnante, d'autre part d'assurer une bonne pollinisation des fleurs. La lumière de la chambre de culture était émise par des tubes fluorescents blancs froids et des lampes à décharge d'iodure pendant 16h j⁻¹ avec une densité de flux de photons photosynthétiques de 200 μmol m⁻² s⁻¹ à la surface des pots.



Remarque : J'ai participé à la mise en place des adaptations de la plateforme PHENOPSIS effectuées pour pouvoir accueillir des pots adaptés à la culture de la tomate et aux tests nécessaires à la validation de ces modifications. Cette adaptation a fait l'objet d'une publication technique à laquelle je suis associée dans les cahiers techniques de l'INRA (Annexe 2 ; Dauzat *et al.*, 2016).

La pression de vapeur de l'air a été maintenue autour de 0.8 kPa et la consigne de température a été fixée à 20°C la nuit et 23 °C le jour pendant toute la durée de l'expérimentation (Figure II.2A). Les 52 plantes se sont développées dans un sol dont le contenu en eau était constant, 1.4 g H₂O g⁻¹ de sol sec, jusqu'à ce que la cinquième feuille soit totalement émergée (toutes les folioles déployées; Figure II.3). À partir de ce stade, cinq régimes hydriques différents, mais stables au cours du temps, ont été imposés aux plantes jusqu'à la fin de l'expérimentation (7 plantes par condition) : les pots étaient pesés individuellement 1 fois par jour et irrigués de façon à atteindre une teneur en eau du sol égale à 0.6, 0.9, 1.2, 1.4 et 1.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec respectivement (Figure II.3). Au même stade, 14 plantes de WVa 106 ont été soumises à un dessèchement progressif du sol. Elles ont cessé d'être irriguées jusqu'à la fin de l'expérimentation mais les pots ont été tout de même pesés quotidiennement pour suivre la diminution de la teneur en eau du sol au cours du temps (Figure II.3). Six états hydriques différents sont donc comparés au cours de cette expérimentation.

L'expérimentation B a été menée dans un compartiment de serre verre (Figure II.2B) avec un système d'irrigation automatisé. La température était consignée à 22°C de jour et 16°C la nuit (Figure II.2B). Les plantes de WVa106 étaient réparties sur 6 rangs de 15 plantes d'axe nord-sud et entourées de deux rangs de bordure disposés le long des parois est et ouest de la serre afin d'homogénéiser les conditions climatiques des plantes étudiées. Les plantules ont été transplantées des boîtes de gélose vers le sol dans 35 petits pots de terreau 14 jours après semis. Elles sont restées 14 jours en chambre de culture, dans les mêmes conditions d'éclairage et de températures jour/nuit (22°C/20°C 16 heures de lumière) que lorsqu'elles étaient en boîte de culture. Elles ont ensuite été placées 12 jours en serre, à partir du 26 avril, puis ont été repiquées dans des pots de 7l (avec le même protocole que celui décrit pour l'expérimentation A) le 3 mai.

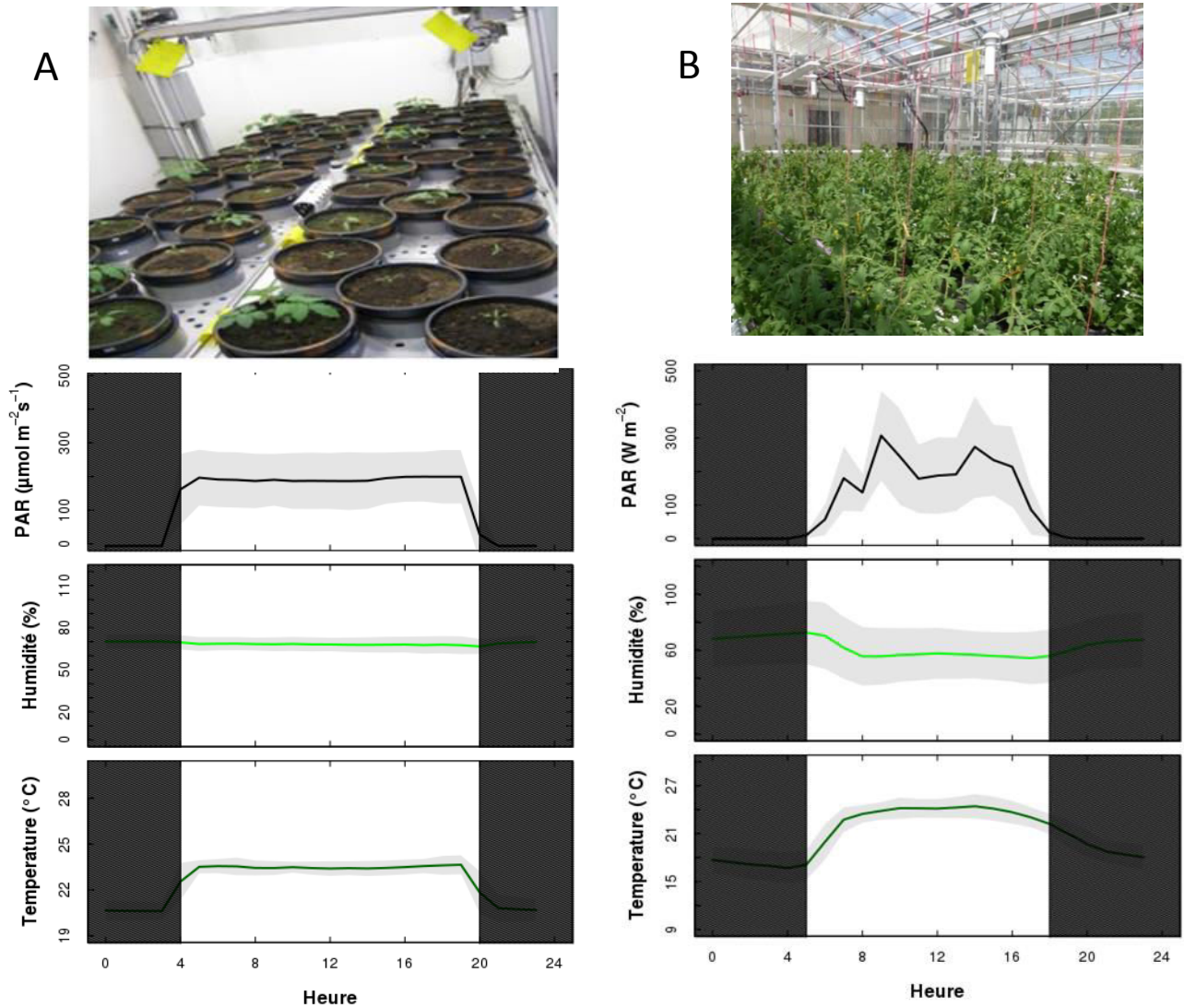


Figure II-2. Conditions micro-météorologiques moyennes journalières pendant les expérimentations A et B. Les moyennes du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR), de l'humidité de l'air et de la température de l'air calculées sur tous les jours de l'expérimentation sont montrées en lignes continues. Les surfaces grises autour de ces moyennes représentent l'erreur standard. Les périodes diurnes et nocturnes sont représentées par des rectangles blancs et gris foncés respectivement sur les graphiques.

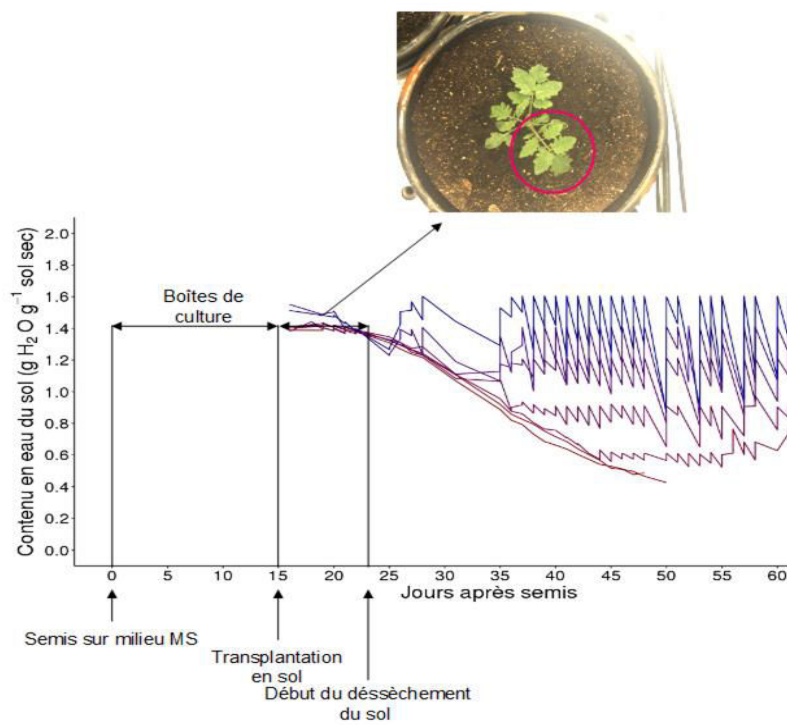


Figure II-3. Evolution de la teneur en eau du sol des pots au cours du temps pour les 6 traitements hydriques imposés lors de l'expérimentation A. Quelques dates clés de l'expérimentation sont identifiées par des flèches verticales noires. Une photo de la plante lorsque la feuille 5 est totalement émergée (toutes les folioles déployées) est montrée ci-dessus afin de visualiser le stade de la plante auquel débute le dessèchement du sol.

Pour la suite de l'expérimentation, elles ont toutes reçu 200 ml d'eau avant la mise en place du système d'irrigation automatique. Une fois le système d'irrigation automatique mis en place, deux conditions d'irrigation ont été appliquées aux plantes dix-sept jours après repiquage (20 mai) et jusqu'à la fin de l'expérimentation (28 juillet) : vingt plantes ont été placées en condition d'irrigation « bien irriguée » et vingt plantes ont été placées en condition de déficit hydrique. Les plantes étaient réparties par blocs de cinq plantes sur quatre rangs de culture pour le traitement témoin et sur deux rangs pour le déficit hydrique. Les consignes d'irrigation ont été fixées pour maintenir un poids cible correspondant à 1.5 g et 0.8 g $\text{H}_2\text{O g}^{-1}$ sol sec au début de l'expérimentation. Puis, les apports de solution nutritive ont ensuite été progressivement ajustés pour s'adapter aux variations de conditions climatiques et au stade de développement de la plante (Figure II.4A). Les plantes ont ensuite été irriguées en ajustant au cours du développement de la culture, les fréquences et quantités d'arrosage de manière à maintenir le poids cible dans chaque traitement. Pour les deux conditions « bien irriguée » et

« déficit hydrique » étudiées ici, une plante a été placée sur une balance afin de mesurer la quantité d'eau consommée (évaporation, transpiration, etc...) qui a servi de référence pour permettre de suivre la consommation d'eau de la plante et la teneur en eau des pots d'une même condition ainsi que la quantité d'eau apportée chaque jour.

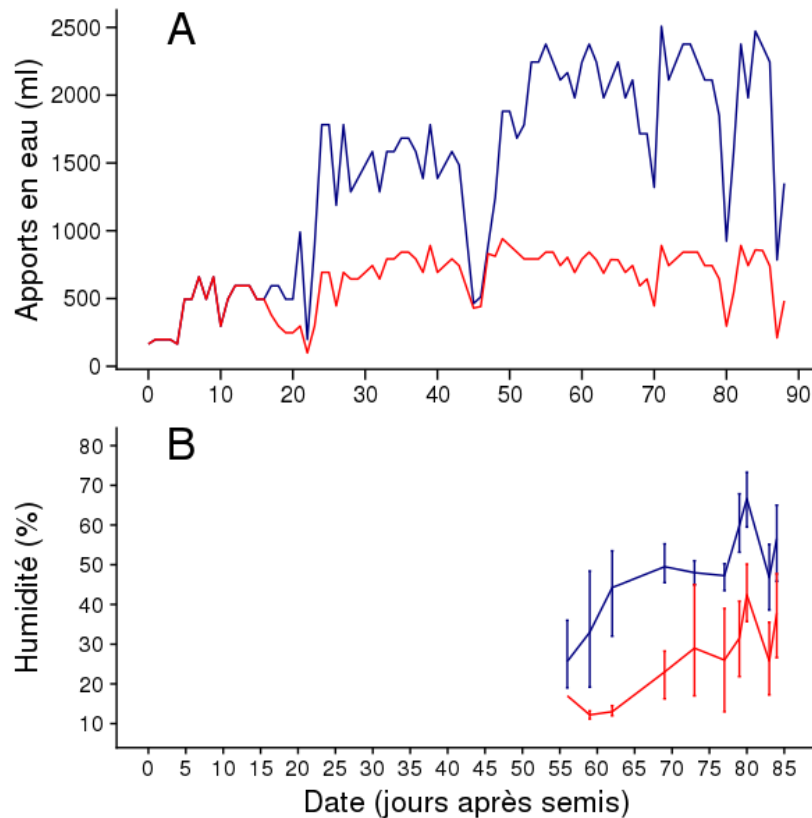


Figure II-4. Evolution au cours du temps, (A) des apports en eau pendant l'expérimentation B, pour les plantes dans chaque condition d'irrigation, bien irriguée (ligne bleue) et en déficit hydrique (ligne rouge) et (B) de la moyenne de l'humidité du sol mesurée avec une broche Grodan. Les moyennes sont représentées avec les intervalles de confiance pour l'ensemble des plantes dans chaque condition d'irrigation, bien irriguée (ligne bleue) et en déficit hydrique (ligne rouge)

Toutes les plantes (bien irriguée ou déficit hydrique) ont été irriguées avec la même fréquence d'apport calculée en fonction de l'évapotranspiration potentielle, ETP (1 irrigation déclenchée tous les 0.3 mm d'ETP) d'eau, mais la durée d'irrigation différait suivant le régime hydrique (Figure II.4A). L'ETP est une valeur d'évapotranspiration maximale de référence pouvant

représenter la demande climatique. On la définit comme l'évapotranspiration d'un couvert végétal bas, continu et homogène dont l'alimentation en eau n'est pas limitante et qui n'est soumis à aucune limitation d'ordre nutritionnel, physiologique ou pathologique. En parallèle l'humidité du sol dans les pots a été mesurée trois fois par semaine, à horaires réguliers (10h le matin) à l'aide d'un humidimètre (WCM-control, Grodan, Roermond, The Netherlands) pendant environ un mois après le début du dessèchement du sol pour suivre l'évolution de l'humidité du substrat dans chaque traitement (Figure II.4B). Les mesures n'ont pas été poursuivies au-delà de cette date car les racines des plantes ont envahi les pots et les mesures devenaient compliquées avec le risque de planter la broche dans les racines. Le potentiel hydrique de tige a été mesuré deux fois au midi solaire. Mi-juillet la valeur moyenne était de -0.3 et -1.25 MPa, respectivement pour les plantes témoin et stressées.

II.2.3 Notation des stades de développement des plantes.

Pendant l'expérimentation A, des notations du nombre de feuilles émergées ont eu lieu tous les deux jours. Chaque feuille de la première unité sympodiale a été notée au moment de son émergence (1cm de long), c'est-à-dire lorsqu'elle était visible dans sa totalité (tous ses folioles étaient identifiables à l'œil nu, Figure II.5A). Lors du développement des bouquets, le nombre de boutons floraux ainsi que le nombre de fleurs à l'anthèse a été compté sur chacun d'eux. La date d'anthèse a été définie comme le premier jour où les pétales de la fleur sont ouverts à plus de 45° (Figure II.5B). La vitesse de floraison a été calculée comme le rapport entre le nombre total de fleurs à l'anthèse et le temps de floraison (c'est-à-dire, le temps écoulé entre la date d'anthèse de la première fleur ouverte et celle de la dernière fleur).

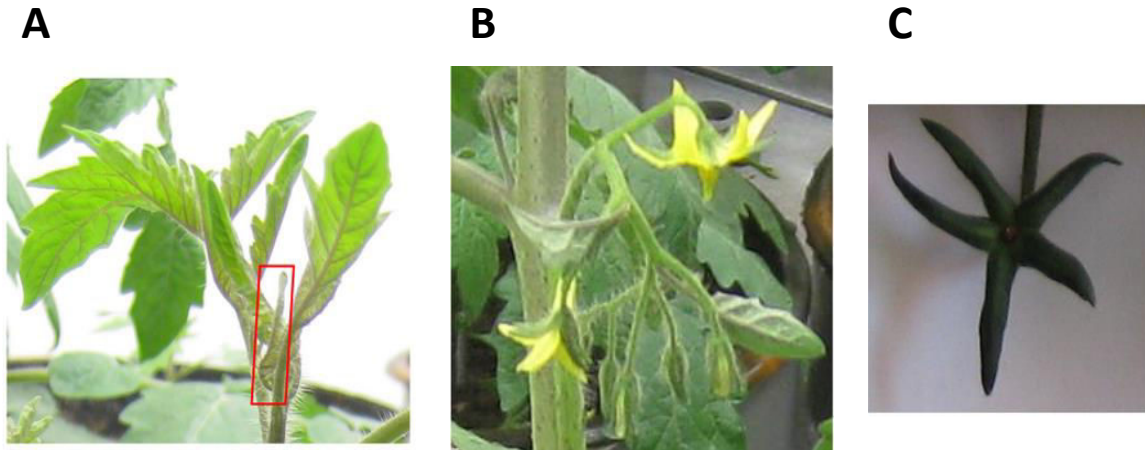


Figure II-5. Photos illustrant les stades de notations phénologiques des plantes notés pendant les expérimentations A et B. A, stade 'feuille émergente' (1cm de long). B, stade 'anthèse -1 jour' et 'anthèse +1' jour. Le stade anthèse est défini comme le premier jour où les pétales de la fleur sont ouverts à plus de 45°. C, photo représentant un fruit avorté.

Lors de l'expérimentation B, le nombre de feuilles et le nombre de bouquets floraux ont été notés le 30 mai, le 14 juin, le 24 juin et, lors de la récolte le 26 juillet sur 2 plantes bien irriguées et quatre plantes en déficit hydrique. Le développement des fleurs et les avortements de fruits ont été observés deux fois par semaine sur huit plantes de chaque traitement. Les inflorescences ont été taillées pour ne garder que les huit à dix premières fleurs de chaque bouquet. La vitesse de floraison (date d'anthèse déterminée de la même manière que lors de l'expérimentation A) a été calculée comme pour l'expérimentation A. Le nombre de fruits noués a été noté et comparé au nombre de fruits matures. Le taux d'avortement est défini comme le pourcentage de fruits avortés (Figure II.5C) par rapport au nombre total de fruit initiés.

II.2.4 Analyse de croissance des différents organes

II.2.4.1 Expérimentation A

Lors de l'expérimentation A, les plantes ont été récoltées pour l'analyse de croissance lorsque la dernière feuille sous la première inflorescence a atteint sa taille finale. Ceci a été vérifié par des mesures régulières de la longueur de la dernière foliole apparue.

Croissance des parties végétatives de la première unité sympodiale.

Les plantes ont chacune été coupées à la base de la tige. La tige de la première unité sympodiale, sous la première inflorescence, a été coupée et séchée dans une étuve à 60 °C pendant une semaine. Les feuilles de la première unité sympodiale ont aussi été coupées et séchées dans une étuve à 60 °C pendant une semaine. La masse sèche de la première unité sympodiale (mg) a été calculée comme la somme de la masse sèche de la tige et des feuilles situées sous la première inflorescence.

Masse sèche racinaire

Le système racinaire de chaque plante a été extrait du sol. La majorité du sol a été séparé du système racinaire à l'aide d'une tamiseuse électrique. Le reste a été rincé à l'eau et, les fibres restantes, intercalées entre les racines, retirées à l'aide d'une pince. La masse sèche du système racinaire comprend la masse de toutes les racines prélevées par cette méthode après passage dans une étuve à 60 °C pendant une semaine.

II.2.4.2 *Expérimentation B*

Croissance des fruits

Lors de l'expérimentation B, les grappes de fruits ont été taillées afin d'être toutes composées de huit à dix fruits maximum. Douze fruits matures, 6 sur des plantes bien irriguées et 6 sur des plantes en condition de déficit hydrique, ont été récoltés sur les bouquets 4 à 9 en évitant les positions distales dans l'inflorescence. Les fruits ont été pesés puis séchés individuellement à l'étuve à 65 °C pendant 8 jours et pesés sur une balance de précision 10^{-5} g. Le rendement (nombre total de fruits noués et masse fraîche totale) a été mesuré sur les bouquets 1 à 7 de 16 plantes (8 plantes bien irriguées et 8 plantes en condition de déficit hydrique).

II.2.5 *Analyse statistique des données*

Extraction des tendances des différentes variables

La méthode LOESS (Cleveland, 1979), méthode standard de régression non paramétrique, a été appliquée pour extraire les tendances (ex. surface foliaire en fonction du rang de feuille) des différentes variables morphologiques d'intérêt. La méthode LOESS dépend de deux paramètres : le lissage des paramètres ou span qui définit le voisinage pour intégrer les modèles de régression local linéaire et le degré du polynôme de ces modèles linéaires. Ici, des polynômes de premier degré ont été utilisés systématiquement, en partie en raison d'une gamme de données limitée d'exploration des variables (e.g. 11 rangs successifs pour les feuilles). Le span a été sélectionné à l'aide de l'AICc, un modèle usuel de sélection de critère qui trouve le meilleur compromis entre la parcimonie et l'aptitude de prédiction du modèle.

Comparaison de différentes variables sur deux échantillons

Le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney est utile pour comparer deux échantillons indépendants de petite taille. Il permet d'estimer si les variables de deux échantillons suivent la même loi de probabilité, et donc de déterminer si ces échantillons proviennent de la même population. La taille minimale de chaque échantillon est de quatre observations. Suivant le résultat, l'hypothèse nulle selon laquelle la distribution de la variable est la même dans les deux groupes, est rejetée ou non. Un niveau de signification noté α (ici α de 5%) doit être fixé. La p-value permet d'évaluer le niveau de risque du test. Si la p-value est supérieure à α , l'hypothèse nulle ne sera pas rejetée, les séries de données seront considérées comme identiques ou proches avec un risque de p-value % de se tromper. Si la p-value est inférieure à α , l'hypothèse nulle sera rejetée, les séries de données seront considérées comme significativement différentes avec un risque de p-value % de se tromper.

II-3 RÉSULTATS DE LA PARTIE II

II.3.1 Effet de déficits hydriques du sol sur les développements végétatifs et reproducteur des plantes

II.3.1.1 Le nombre de feuilles est peu affecté par des contraintes hydriques du sol quelles que soient leur intensité et leur position dans le cycle de la plante.

Lors de l'expérimentation A, le nombre de feuilles de la première unité sympodiale n'a pas été significativement réduit par les contraintes hydriques stables, de différentes intensités (Figure II.6A). Il a diminué de 13.5 % en moyenne entre les plantes les mieux irriguées et celles subissant le stress le plus sévère, i.e, pour lequel l'irrigation des plantes a été totalement stoppée (Figure II.6A). La vitesse d'émission des feuilles situées sous le premier bouquet a eu tendance à diminuer pour des humidités du sol inférieures à 0.9 gH₂O g⁻¹ de sol sec. Elle a été réduite de 15%, passant de 0.55 à 0.47 feuilles apparues par jour, lorsque le contenu en eau du sol était réduit de 1.6 à 0.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec. Elle a atteint une valeur moyenne de 0.43 feuilles émises par jour pour les plantes en condition de stress sévère, soit une réduction de 21.2% par rapport à la condition la mieux irriguée (Figure II.6B). La longueur de la tige de la première unité sympodiale, a été réduite de 10.2% en moyenne lorsque le contenu en eau du sol était réduit à 0.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec mais n'a pas été plus affectée par le stress hydrique le plus sévère (Figure II.6C).

Lors de l'expérimentation B, avec un déficit hydrique imposé sur une période plus longue de développement, le nombre de feuilles de la plante a été réduit de six feuilles par plante en moyenne, mais de manière non significative en réponse au déficit (p-value = 0.055 pour un risque α de 5%; Figure II.6D et Tableau II.1). De même, il n'y a pas eu de différence

significative de vitesse d'apparition des feuilles entre les plantes bien irriguées et les plantes en déficit d'irrigation (p -value = 0.187 pour une risque α de 5%; Figure II.6E et Tableau II.1).

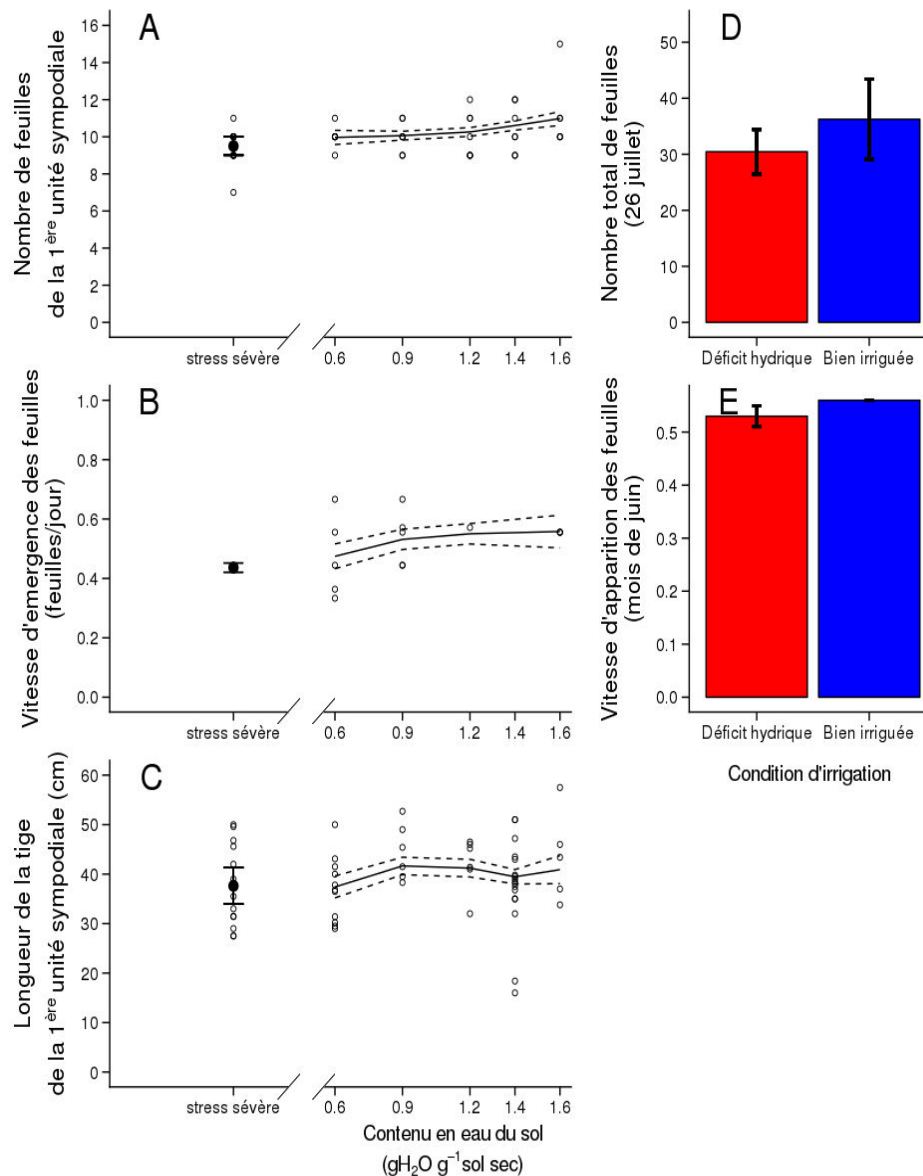


Figure II-6. Courbes moyennes de réponse à la teneur en eau du sol (A) du nombre de feuilles de la première unité sympodiale, (B) de la vitesse d'émergence des feuilles, (C) de la longueur de la tige de la première unité sympodiale, des plantes cultivées lors de l'expérimentation A. Chaque point représente la donnée mesurée sur une plante. Les courbes moyennes sont indiquées par des lignes continues ($1 < n < 7$) et sont entourées de l'intervalle de confiance à 95% (courbes en pointillés). Les diagrammes en barre représentent (D) le nombre de feuilles et (E) la vitesse d'apparition en conditions de déficit hydrique ($0.8 \text{ g d'eau g}^{-1} \text{ sol sec}$) et en condition témoin ($1.5 \text{ d'eau g}^{-1} \text{ sol sec}$) dans l'expérimentation B. Le nombre de feuilles a été mesuré au 26 juillet (89 jours après semis) et la vitesse d'apparition des feuilles a été calculée entre le 30 mai et le 24 juin. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard ($n = 6$).

II.3.1.2 *Des stress hydriques d'intensités variables ont réduit le nombre de boutons floraux et la vitesse de floraison au sein de l'inflorescence, tout en retardant la date de floraison. Ces effets dépendaient toutefois du stade de développement de la plante.*

Lors de l'expérimentation A, le nombre moyen de boutons floraux émis au sein de la première inflorescence a été réduit dès une faible diminution de l'humidité du sol de 1.6 à 1.4 gH₂O g⁻¹ de sol sec (de 12.3 à 10.8 boutons, Figure II.7A). Il était de 8.9 boutons floraux à 0.9 gH₂O g⁻¹ de sol sec et a été réduit à 8.4 boutons floraux à 0.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec pour atteindre une valeur moyenne de 7.8 boutons floraux chez les plantes en condition de stress sévère (Figure II.7A). La vitesse de floraison de la première inflorescence des plantes de l'expérimentation A a été réduite par le déficit hydrique. Elle était de 0.72 fleurs par jour en moyenne lorsque la plante était bien irriguée. Elle a été diminuée par les stress plus sévères et sa valeur s'est stabilisée autour de 0.6 fleurs par jour, entre 1.2 et 0.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec. L'absence totale d'irrigation dès l'apparition de la feuille 5 a diminué la vitesse de floraison à 0.5 fleurs par jour (Figure II.7B). La mise à fleur de la première inflorescence (date de première fleur au stade d'anthèse) des plantes de l'expérimentation A a été retardée par le déficit hydrique, de 1.3 jours en moyenne pour les plantes dont le contenu en eau du sol est situé entre 0.6 et 1.2 gH₂O g⁻¹ de sol sec par rapport aux plantes cultivées en condition bien irriguée (1.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec). Elle a été également retardée chez les plantes dont le stress hydrique est plus sévère, se produisant en moyenne 8 jours plus tard que les plantes à 1.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec (Figure II.7C).

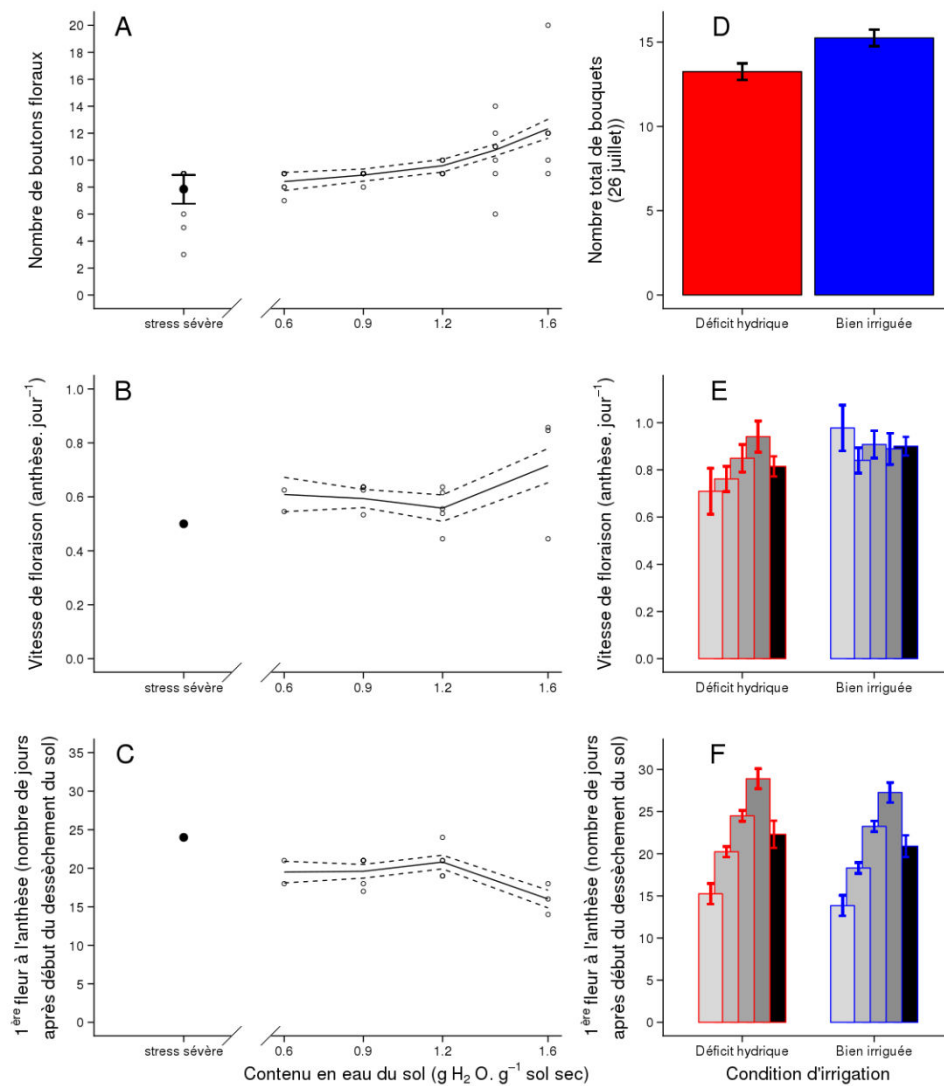


Figure II-7. Courbes moyennes de réponse à la teneur en eau du sol (A) du nombre de boutons floraux, (B) de la vitesse de floraison et, (C) de la date d'ouverture de la première fleur du bouquet 1 lors de l'expérimentation A. Chaque point représente la valeur du trait sur le bouquet 1 d'une plante. Les lignes continues passent par les valeurs moyennes ($1 < n < 7$) et sont entourées de l'intervalle de confiance à 95% (courbes en pointillés). Les diagrammes en barres représentent (D) le nombre total de bouquets, (E) la vitesse moyenne de floraison et (F) la date de la première anthèse des bouquets 4 à 7 (différents niveaux de gris, du gris clair au gris foncé) en condition de déficit hydrique (moyenne des bouquets en noir) et en condition bien irriguée (moyenne des bouquets en noir) lors de l'expérimentation B. Les intervalles de confiance à 95% sont représentés par des barres rouges pour les plantes en déficit hydrique et par des barres bleues pour les plantes en condition bien irriguée.

Lors de l'expérimentation B, le déficit d'irrigation a entraîné une réduction de nombre de bouquets émis par les plantes d'environ 15 % (p-value = 0.022 pour un risque α de 5%, Tableau II.1) sur la période observée. La vitesse de floraison des bouquets 4 et 5 des plantes en déficit hydrique est significativement plus faible que celle des plantes bien irriguées (bouquet 4 : p-value = 0.002; bouquet 5 : p-value = 0.024; pour un risque α de 5%). Par contre, au sein des inflorescences 6 et 7, la vitesse de floraison n'est pas significativement différente entre les plantes en condition de déficit d'irrigation et les plantes bien irriguées (Figure II.7D et Tableau II.1). En effet, la vitesse de floraison augmente du bouquet 4 au bouquet 7 sur les plantes cultivées en condition de déficit hydrique du sol. Il semble donc que la vitesse de floraison des inflorescences 4 à 7 n'ait pas été affectée par le déficit hydrique de la même manière que celle de la première unité sympodiale dans l'expérimentation A, ce qui suggère une réaction d'adaptation de la plante.

Le rythme d'émission des inflorescences est de 4.5 jours en moyenne entre les inflorescences successives et ce pour les deux traitements, au sein de chaque traitement. Un décalage de 1.6 jours en moyenne est cependant observé pour la mise à fleurs des bouquets des plantes en conditions de stress hydrique par rapport à la mise à fleur des bouquets des plantes en condition bien irriguée (Figure II.7F). Ce décalage dans le temps de la floraison des plantes en déficit hydrique peut être dû à la fois à un retard de l'émission de la première inflorescence ou, un retard de l'ouverture des fleurs. Les tests statistiques ont confirmé qu'il y a bien une différence de date de début de mise à fleur induite par le déficit d'irrigation des bouquets 5 à 7 (bouquet 5 : p-value < 0.001 est significative pour un risque α de 5% ; bouquet 6 : p-value = 0.004; bouquet 7 : p-value = 0.033; pour un risque α de 5%). Aucune différence significative n'est constatée concernant la mise à fleur du bouquet 4 (p-value = 0.065 pour un risque α de 5%). Il n'y a cependant pas de différence sur la moyenne globale de mise à fleur des bouquets

(4 à 7) entre les plantes en déficit hydrique et les plantes bien irriguées (p-value = 0.209 pour un risque α de 5 %, Tableau II.1).

Tableau II-1. Tableau résumant les résultats et tests statistiques appliqués aux différentes variables décrites sur les développements végétatifs et reproducteurs décrits dans le partie II.3.1 (reprenant des données des figures II-6 et II-7). Le test appliqué est le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney applicable à des échantillons indépendants.

Effet du déficit hydrique (0,6 gH ₂ O g ⁻¹ de sol sec) précoce appliqué lors de l'expérimentation A	Sur le développement foliaire		
		Nombre de feuilles de la première unité sympodiale	- 9,3 ± 3,6 %
		Vitesse d'émergence des feuilles (feuilles jour ⁻¹)	- 15 ± 7,8 %
		Longueur de la tige (cm)	- 10,2 ± 5,5 %
		Nombre de boutons floraux	- 31,7 ± 5,7 %
	Sur le développement floral (bouquet 1)	Vitesse de floraison (anthèse jour ⁻¹)	- 22,1 ± 7,1 %
		Mise à fleur (nombre de jours après début du dessèchement du sol)	+ 21,9 ± 9,1 %
	Sur le développement foliaire	Nombre de feuilles 67 jours après début du dessèchement du sol	Pas de différence significative
		Vitesse d'apparition des feuilles (période comprise entre 10 et 35 jours après début du dessèchement du sol)	Pas de différence significative
	Sur le développement floral (bouquets 4 à 7)	Nombre total de bouquets 67 jours après début du dessèchement du sol	Réduction significative (p-value = 0,028) - 15 %
		Vitesse de floraison moyenne (anthèse jour ⁻¹)	Réduction significative (p-value = 0,002) - 9,2 %
		Date moyenne de mise à fleur des bouquets (nombre de jours après début du dessèchement du sol)	Pas de différence significative

Résumé des principaux résultats de la partie II.3.1

Les variables associées au développement foliaire sont peu affectées par le déficit hydrique.

Le nombre de feuilles de la première unité sympodiale n'a quasiment pas été affecté par la gamme de déficits hydriques appliqués lors de l'expérimentation A; la vitesse d'apparition des feuilles n'a été réduite qu'à partir d'un stress hydrique important ($0.6 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ de sol sec) et jusqu'à 21.2 % chez les plantes en stress sévère. Les variables présentées sur l'expérimentation B, à des stades plus avancés de développement de la plante et pour des unités sympodiales de rangs plus élevés montrent des résultats comparables. Le nombre de feuilles total de la plante et la vitesse moyenne d'apparition des feuilles des bouquets 4 et 7 n'ont pas été significativement réduits par le déficit d'irrigation appliqué.

Les variables associées au développement floral de la première inflorescence lors de l'expérimentation A ont par contre été affectées en réponse aux déficits hydriques appliqués.

Le nombre de boutons floraux a été réduit dès la plus faible diminution du contenu en eau du sol. La vitesse de floraison a également été réduite mais variait ensuite très peu entre les plus faibles taux d'irrigation. La date de début de floraison a fortement été retardée pour les plantes les moins bien irriguées. Lors de l'expérimentation B, les réponses ont été comparables avec toutefois des différences moins grandes entre plantes bien irriguées et celles en déficit hydrique concernant à la fois la vitesse de floraison et la date de première anthèse des inflorescences 4 à 7 observées. Sur ces plantes les effets variaient en fonction du bouquet avec des effets plus marqués sur les premiers bouquets apparus.

En conclusion le développement reproducteur a été plus affecté et de façon plus précoce que le développement végétatif en réponse aux déficits hydriques. Ces effets sur le développement reproducteur étaient variables suivant le stade de développement de la plante suggérant une adaptation progressive de la plante.

II.3.2 Effet de déficits hydriques de différentes intensités sur les biomasses aériennes et racinaires à des stades précoces de développement de la plante

II.3.2.1 Les réductions de masse sèche aérienne et souterraine sont proportionnelles à l'intensité du stress hydrique.

Lors de l'expérimentation **A**, la masse sèche des parties végétatives de la première unité sympodiale des plantes (somme des feuilles et de la tige sous le premier bouquet) a diminué en réponse à la réduction de teneur en eau du sol et ce, dès le passage de 1.6 à 1.4 gH₂O g⁻¹ de sol sec. Pour les plantes les mieux irriguées la masse sèche de la première unité sympodiale a atteint en moyenne 17187 mg. Elle a été réduite de 66.3 % (5796 mg) pour les plantes dont le contenu en eau du sol était ajusté à 0.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec (Tableau II.3). La masse sèche moyenne des parties aériennes des plantes en condition de stress très sévère a été réduite de 79.1 % (3596 mg, Figure II.8A). La masse sèche des feuilles (moyenne des feuilles 7 à 10 de la première unité sympodiale; feuilles entières comprenant folioles et rachis) a été réduite par le déficit hydrique entre 1.6 à 1.4 gH₂O g⁻¹ de sol sec. Elle a été réduite de 2694.2 à 616.4 mg, soit de 77.2 %, lorsque le contenu en eau du sol était réduit de 1.6 à 0.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec (Tableau II.3). Sa valeur était encore réduite (de 84.2 % par rapport à la condition la mieux irriguée) lorsque les plantes étaient cultivées en condition de stress sévère, atteignant alors 424.7 mg (Figure II.9A). La surface spécifique des feuilles (rapport entre la surface et la masse moyenne des feuilles 7 à 10) de la première unité sympodiale était au contraire légèrement augmentée par le déficit hydrique. Elle est passée de 20.3 mm²mg⁻¹ en moyenne en condition bien irriguée, (1.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec) à 22.3 mm²mg⁻¹ en moyenne dans les conditions de stress hydrique les plus avancées (0.6 gH₂O g⁻¹ de sol sec) (Tableau II.3) et stress sévère (Figure II.9B). La surface foliaire, comme la masse sèche des feuilles, est en revanche considérablement réduite par le déficit hydrique.

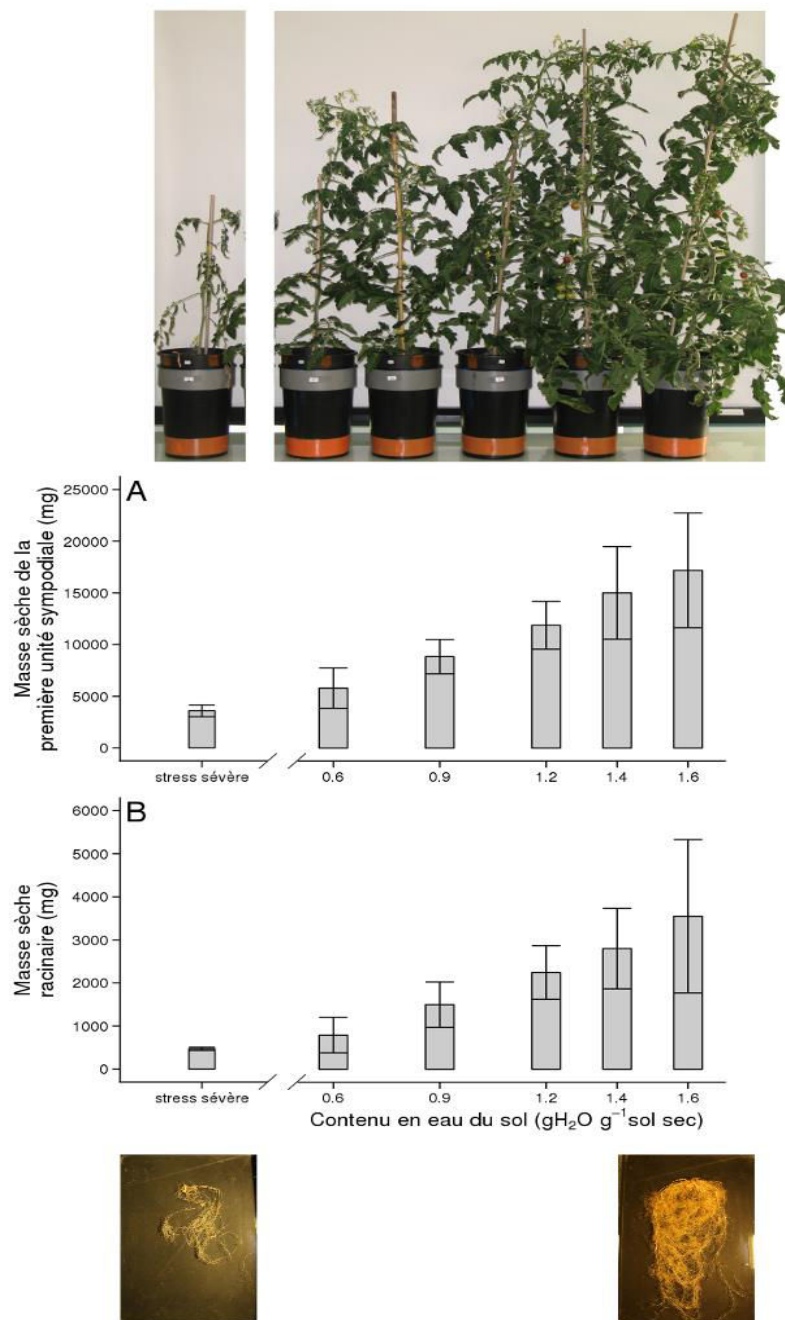


Figure II-8. Diagrammes en barre représentant (A) la masse sèche aérienne moyenne de la première unité sympodiale (somme des feuilles, des pétioles et de la tige coupée au premier bouquet); et (B) la masse sèche racinaire moyenne, en fonction de dose d'eau contenue dans le sol lors de la croissance des plantes ($5 < n < 13$). Les barres d'erreurs qui encadrent chaque moyenne représentent l'erreur standard. Ces mesures ont été effectuées sur les plantes de l'expérimentation A. Des photos illustrant les parties aériennes des plantes cultivées dans différents conditions d'irrigation sont montrées au-dessus des graphes. Des photos illustrant les parties racinaires des plantes cultivées en condition de stress sévère et en condition bien irriguée sont montrées en dessous des graphes.

Lorsque les plantes étaient bien irriguées ($1.6 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ de sol sec), la surface moyenne d'une feuille a atteint 464.2 cm^2 . Elle était quasiment divisée par 4 (à 122.5 cm^2 en moyenne) pour les plantes dont l'irrigation était fixée à $0.6 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ de sol sec (Tableau II.3). Et, elle a atteint son minimum pour les plantes cultivées en condition de stress sévère, 98.9 cm^2 en moyenne, soit quasiment divisée par 5 par rapport à la condition la mieux irriguée (Figure II.9C).

De même que la masse sèche des parties végétatives de la première unité sympodiale, la masse sèche des racines a été réduite par les déficits hydriques imposés. La masse sèche racinaire moyenne était de 3552 mg chez les plantes bien irriguées ($1.6 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ de sol sec). Elle a été réduite de 77.7% (à 792.8 mg) en moyenne pour les plantes irriguées à $0.6 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ de sol sec (Tableau II.3). Elle a atteint un minimum de 473 mg , soit une réduction de 86.7% , pour les plantes cultivées en condition de stress sévère, i.e, arrêt de l'apport de solution nutritive sans ré-irrigation (Figure II.8B).

II.3.2.2 *Suivant le « type » de stress hydrique et le stade de développement de la plante, la surface et la masse sèche des feuilles peuvent être affectés différemment.*

Lors de l'expérimentation B, comme dans l'expérimentation A, la masse sèche moyenne des feuilles a été réduite par la condition de stress hydrique appliquée aux plantes. La masse sèche moyenne de la dernière feuille sous le septième bouquet a été diminuée de moitié par le stress hydrique (3033 mg en condition bien irriguée pour 1433 mg en condition de stress hydrique; différence significative entre les deux conditions, $p\text{-value} = 0.004$; Figure II.9D et Tableau II.3). En revanche, contrairement à ce qui a été observé lors de l'expérimentation A, la surface spécifique moyenne des feuilles a été réduite par le déficit hydrique de l'expérimentation B.

Tableau II-2. Tableau décrivant les proportions moyennes de masse sèche allouées aux différents compartiments des parties aériennes des plantes cultivées en conditions bien irriguée et de déficit hydrique du sol lors de l'expérimentation B.

	Masse sèche totale (g)	Masse sèche fruits / Masse sèche totale (%)	Masse sèches limbes / masse sèche totale (%)	Masse sèche tige et pétioles / Masse sèche totale (%)
Bien irriguée	282.22	12.04	29.40	58.56
Déficit hydrique	190.87	14.04	29.08	56.88

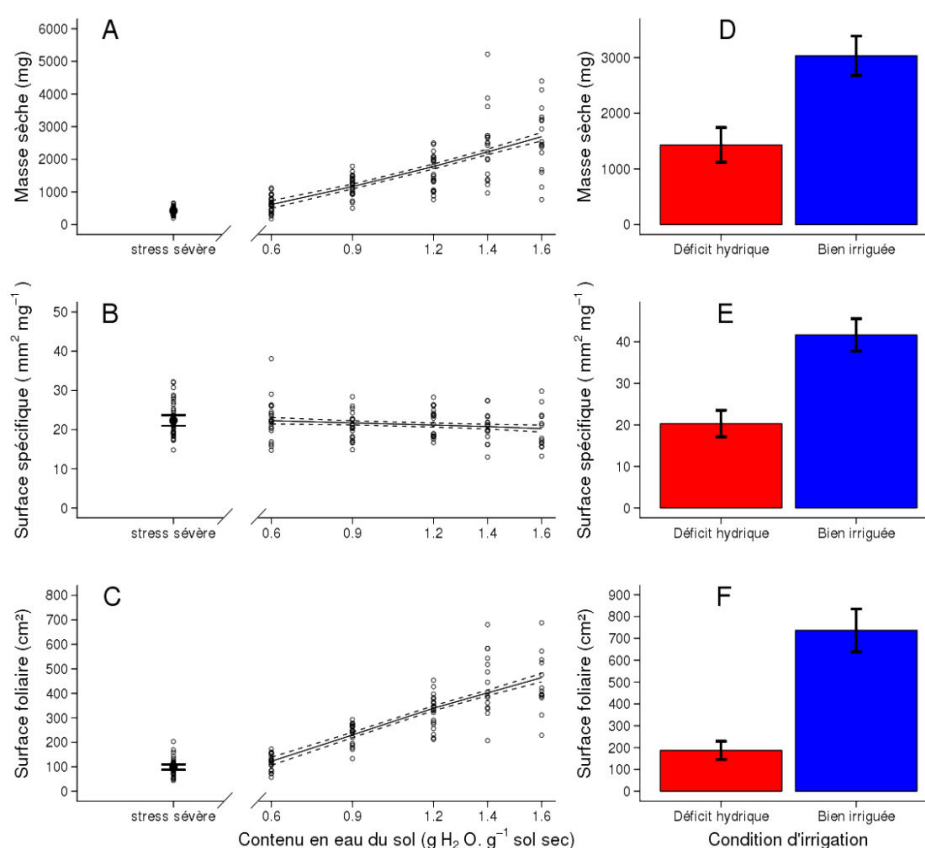


Figure II-9. Courbes moyennes de réponse à la teneur en eau du sol de (A) la masse sèche foliaire, (B) la surface spécifique foliaire et (C) la surface foliaire des feuilles 7 à 10 de la première unité sympodiale des plantes cultivées lors de l'expérimentation A. Les moyennes (lignes continues, 16 < n < 39) sont entourées de l'intervalle de confiance à 95% (courbes en pointillés). Ces mêmes variables sont présentées sous forme de diagrammes en barre pour la dernière feuille de la septième unité sympodiale des plantes cultivées lors de l'expérimentation B, en D, E et F, respectivement. Les moyennes sont accompagnées de barres d'erreurs représentant les intervalles de confiance à 95% (n=6).

Comme pour la masse sèche moyenne, la surface spécifique moyenne est diminuée de moitié par la condition de stress appliquée ($41. \text{ mm}^2\text{mg}^{-1}$ en condition bien irriguée et $20.3 \text{ mm}^2\text{mg}^{-1}$ en condition de stress hydrique, différence significative entre les deux conditions, $p\text{-value} = 0.004$; Figure II.9E et Tableau II.3). La surface de la feuille sous le bouquet 7 a été fortement réduite par le déficit hydrique. Elle est de 737 cm^2 en condition témoin et divisée par quatre (187 cm^2) en condition de stress (différence significative entre les deux conditions, $p\text{-value} = 0.004$; Figure II.9F et Tableau II.3). Les résultats concernant la masse sèche des feuilles et la surface des feuilles sont comparables dans les deux expérimentations. La masse sèche moyenne des feuilles (7 à 10) de la première unité sympodiale de l'expérimentation A et de la dernière feuille de la septième unité sympodiale de l'expérimentation B a été réduite par le déficit hydrique, de 77.2 % pour les plantes cultivées dans l'expérimentation A et, de 53 % pour les plantes de l'expérimentation B (Figure II.9A et B). La surface moyenne des feuilles de la première unité sympodiale de l'expérimentation A et de la septième unité sympodiale de l'expérimentation B a été réduite par le déficit hydrique : de 77.7 % pour les plantes cultivées dans l'expérimentation A et, de 75 % pour les plantes de l'expérimentation B.

II.3.2.3 *Le déficit hydrique ne modifie pas les proportions de biomasse allouée aux différents compartiments aériens, tige, feuille, et fruit.*

Lors de l'expérimentation B, chez les plantes cultivées en condition bien irriguée, la proportion en masse sèche de tige et pétioles est deux fois plus grande que la proportion de limbe dans la plante. Et, la proportion de masse sèche attribuée aux limbes est elle-même deux fois plus grande que la proportion de la masse sèche attribuée aux fruits (Figure II.10 et Tableau II.2). Le déficit hydrique du sol imposé entraîne une réduction de moitié de la masse sèche totale de la plante en fin d'expérimentation (Figure II.10). En revanche, les proportions de masse sèche attribuée aux différents compartiments tige et pétioles, limbes et fruits, n'est pas altérée par le déficit hydrique du sol imposé durant l'expérimentation (Figure II.10).



Figure II-10. Photographie représentant une plante en condition de déficit (à gauche) et une plante en condition bien irriguée (à droite) au moment de la récolte lors de l'expérimentation B.

Résumé des principaux résultats de la partie II.3.2

La masse sèche des parties végétatives et des parties racinaires de l'expérimentation A varient proportionnellement à la dose d'eau contenue dans le sol. Contrairement à ce qui était attendu, le rapport des parties aériennes sur les parties racinaires augmente lorsque le contenu en eau du sol est réduit dans les conditions de l'expérimentation A.

La masse sèche et la surface des feuilles de la première unité sympodiale de l'expérimentation A et de la septième unité sympodiale de l'expérimentation B sont réduites par les différents types de déficit hydrique appliqués. En revanche, la surface spécifique des feuilles de la première unité sympodiale de l'expérimentation A ne varie pas avec la dose d'eau contenue dans le sol ; tandis que la surface spécifique des feuilles de la septième unité sympodiale de l'expérimentation B augmente fortement en condition de déficit hydrique.

A l'échelle de la plante entière dans l'expérimentation B, la production totale de masse sèche est réduite mais l'allocation entre les différents organes est peu affectée.

Tableau II-3. Tableau résumant les résultats et tests statistiques des différentes variables décrites sur les biomasses végétatives et racinaires décrits dans la partie II.3.2 (données des figures II-8 et II-9). Le test appliqué est le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney applicable à des échantillons indépendants.

Effet du déficit hydrique (0,6 gH ₂ O g ⁻¹ de sol sec) précoce appliqué lors de l'expérimentation A	Sur les masses sèches aériennes et racinaires	Masse sèche de la 1 ^{ère} unité sympodiale, somme des feuilles, pétioles et tige (mg)	- 66,3 ± 14 %
		Masse sèche des racines (mg)	- 77,7 ± 14 %
		Masse sèche (mg)	- 77,2 ± 4,5 %
Effet du déficit hydrique tardif appliqué lors de l'expérimentation B	Sur les surface et masse sèche foliaire	Surface spécifique (mm ² mg ⁻¹)	+ 9,9 ± 2,8 %
		Surface (cm ²)	- 73,6 ± 3,7 %
		Masse sèche (mg)	- 52,8 ± 10,3% (p-value = 0.004)
		Surface spécifique (mm ² mg ⁻¹)	- 51,3 ± 7,8 % (p-value = 0.004)
		Surface (cm ²)	- 74,6 ± 5,7 % (p-value = 0.004)

II.3.3

Effet du déficit hydrique imposé en serre sur les fruits

Le déficit hydrique augmente légèrement le taux d'avortement mais la diminution de rendement est due essentiellement à une diminution de la teneur en eau des fruits.

Lors de l'expérimentation B, le rendement en fruits a été mesuré sur les inflorescences 4 à 7 de plantes cultivées en conditions bien irriguée ($n = 8$) et en déficit d'irrigation ($n = 8$). Le nombre total de fruits noués du bouquet 4 au bouquet 7 (Figure II.11A) n'a pas été significativement réduit (p -value = 0.291 pour un risque α de 0.05; Tableau II.4) par le déficit d'irrigation appliqué. Il y a 27.5 ± 1.5 fruits noués en moyenne du bouquet 4 au bouquet 7 sur les plantes cultivées dans de bonnes conditions d'irrigation. La masse fraîche totale des fruits des bouquets 4 à 7 (Figure II.11B) a en revanche été réduite de $28.9 \pm 7.7 \%$ (Tableau II.4) par le déficit d'irrigation. Le taux d'avortement (entre les bouquets 4 et 7), dont l'augmentation en condition de déficit d'irrigation aurait pu expliquer la diminution de la masse totale de fruits récoltés (du bouquet 4 au bouquet 7), n'est cependant pas significativement différent entre les deux conditions (p -value = 0.188 pour un risque α de 0.05; Tableau II.4).

Les fruits matures des inflorescences 4 à 7 de plantes cultivées en conditions bien irriguée et de déficit hydrique ont été analysés. Il apparaît que le stress hydrique appliqué n'a pas induit de variation (p -value = 0.699 pour un risque α de 0.05; Tableau II.4) de masse sèche moyenne des fruits matures (Figure II.12A). En revanche, la masse fraîche moyenne des fruits matures a été réduite de $29.1 \pm 8.4 \%$ par rapport aux fruits des plantes bien irriguées (p -value = 0.015 pour un risque α de 0.05; Tableau II.4) (Figure II.12B). Ainsi, la proportion de matière sèche moyenne des fruits matures a été au contraire augmentée de $37 \pm 4.2 \%$ chez les plantes cultivées en condition de déficit hydrique (p -value = 0.002 pour un risque α de 0.05; Tableau II.4).

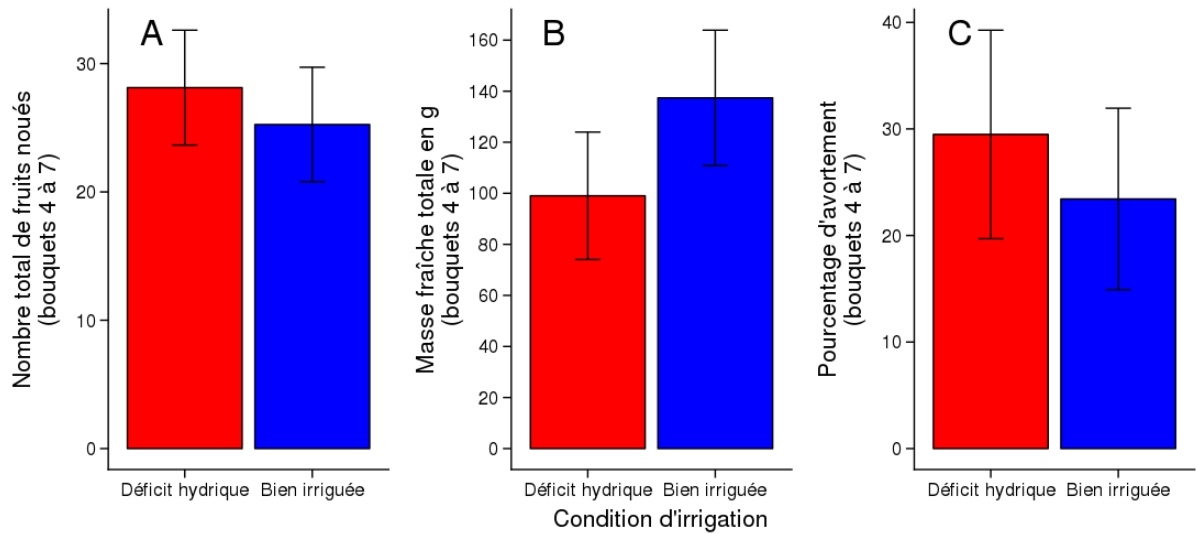


Figure II-11. Diagrammes en barre représentant les moyennes encadrées des erreurs standard (A) du nombre total de fruits noués (B) de la masse fraîche totale des fruits matures et (C) du pourcentage d'avortement, des bouquets 4 à 7 des plantes bien irriguées (bleu, n = 6) et en déficit d'irrigation (rouge, n = 6) lors de l'expérimentation B.

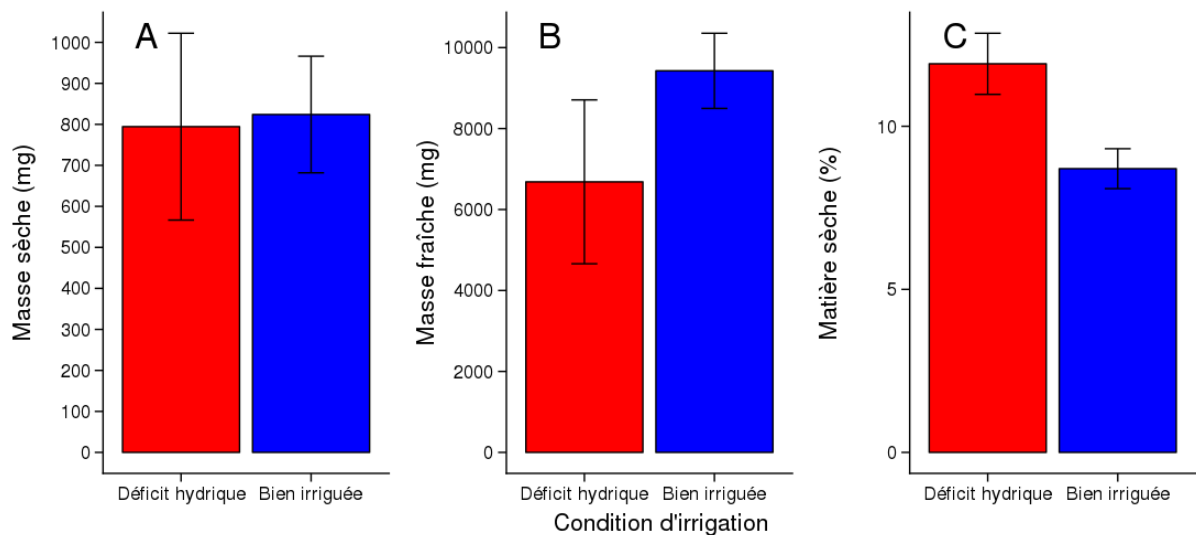


Figure II-12. Diagrammes en barre représentant les moyennes encadrées des erreurs standard de (A) la masse sèche moyenne, (B) la masse fraîche moyenne, et (C) la matière sèche moyenne des fruits matures des bouquets 4 à 7 des plantes bien irriguées (bleu, n = 6) et en déficit d'irrigation (rouge, n = 6) lors de l'expérimentation B.

Résumé des principaux résultats de la partie II.3.3

La diminution de rendement en termes de masse de fruits récoltés en condition de déficit d'irrigation est liée à la diminution de la masse fraîche moyenne du fruit. Le pourcentage de fruits avortés est légèrement supérieur en condition de déficit hydrique, mais ni le nombre de fruits noués, ni la masse sèche moyenne des fruits individuels n'ont varié significativement lors de l'expérimentation B. En conséquence, la teneur en matière sèche du fruit a été augmentée par le déficit hydrique.

Tableau II-4. Tableau résumant les résultats et tests statistiques des différentes variables décrites dans la partie II.3.3, reprises des figures II-11 et II-12. Le test appliqué est le test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney applicable à des échantillons indépendants.

Effet du déficit hydrique tardif appliqué lors de l'expérimentation B : Sur la fructification des bouquets 4 à 7	Nombre de fruits noués	Pas de différence significative
	Masse fraîche totale (g)	- 28,9 ± 7,7 %
	Pourcentage de fruits avortés	Pas de différence significative
	Masse sèche moyenne du fruit mature	Pas de différence significative
	Masse fraîche moyenne du fruit mature	- 29,1 ± 8,4 %
	Matière sèche moyenne du fruit mature	+ 37 ± 4,2 %

II.4 DISCUSSION DE LA PARTIE II

II.4.1 Nous avons pu cultiver des plantes de tomate dans des conditions d'état hydrique du sol stables au cours du temps et établir des courbes de réponse de différents traits à la teneur en eau du sol moyenne.

La chambre de culture utilisée pour l'étude présentée ici (expérimentation A) était équipée depuis 2004 de l'automate PHENOPSIS, un des premiers automates, qui permettait d'ajuster le contenu en eau du sol pour chaque pot en fonction de la transpiration de la plante et de l'évaporation d'eau du sol pour des pots de petite taille (Granier *et al.*, 2006). Pour ce travail de thèse portant sur la plasticité de croissance des feuilles et des fruits de tomate, et suite aux résultats de Dambreville *et al.*, sur le colza, en 2017, qui ont montré une forte interaction entre l'état hydrique du sol et le volume du pot, l'automate a été adapté pour accueillir des pots plus volumineux (Dauzat *et al.*, 2016). Le même type de système d'irrigation a, en partie, été utilisé dans l'expérimentation B, en pesant et ajustant à un poids cible des pots disposés en serre. Les conditions environnementales en serre étant plus fluctuantes, les apports de solution nutritive quotidiens pour atteindre ce poids cible étaient plus fluctuants également. Mais, dans les deux conditions de culture, en pesant et ajustant le poids cible des pots régulièrement, la quantité d'eau contenue dans le sol a pu être stabilisée au cours du cycle de la plante pour cinq traitements en chambre de culture et deux en serre, et ce, malgré l'augmentation de la taille des plantes de tomate au cours du temps, et donc une augmentation des pertes en eau par transpiration quotidienne. Toutefois, pour des raisons d'encombrements des plantes dans la chambre de culture (proximité des plantes lors des pesées qui pouvaient fausser la pesée et donc l'irrigation; proximité du plafond lumineux qui pouvait élever la température des parties supérieures), l'automate en chambre de culture a été utilisé pour tester l'effet de stress

précoces, i.e. uniquement sur des unités sympodiales relativement basses dans la plante. Les effets de ces stress ont pu être comparés ensuite aux effets d'un stress semblable mais maintenu sur une période plus longue en serre et donc sur des unités sympodiales plus élevées. Un avantage des plantes à croissance indéterminée, comme la tomate dont nous avons étudié la croissance et le développement ici, est qu'elle produit des unités sympodiales successives, sur lesquelles sont émis des organes végétatifs et reproducteurs de façon régulière. A chaque instant dans la plante, il y a donc des organes à différents stades de croissance et il est donc possible, jusqu'à un certain point, si les conditions restent stables au cours du développement d'utiliser cette variabilité spatiale pour comparer l'effet de l'environnement sur des événements « temporels » comme cela a été fait chez la microvigne (Luchaire *et al.*, 2017).

II.4.2 Un stress hydrique du sol modéré et constant au cours du cycle de la plante se traduit par des effets comparables sur le début et la fin du cycle pour des variables liées au développement mais également à la croissance des feuilles et fruits.

Peu d'études ont comparé les réponses à des stress abiotiques en chambre de culture et en serre. Les réponses aux déficits hydriques imposés ici dans les deux conditions sont comparables pour la plupart des variables étudiées. C'est le cas pour les variables associées aux fleurs et celles associées aux feuilles au niveau de leur développement (vitesse d'apparition, durée des phases). Le nombre de feuilles et la vitesse d'apparition des feuilles ne sont que peu ou pas altérés par les déficits d'irrigation appliqués dans les deux expérimentations. Il semble donc que contrairement au phyllochrone (temps écoulé entre l'apparition de deux feuilles successives) du coton qui est réduit par le déficit hydrique (Burke *et al.*, 1985), le phyllochrone de la tomate ne soit pas altéré. Une stabilité du phyllochrone a

déjà été montrée chez la tomate en condition de stress salin (Najla *et al.*, 2009). Et, le phyllochrone n'est pas ou très peu affecté par une contrainte hydrique du sol chez de nombreuses espèces dont *Arabidopsis thaliana* (Granier *et al.*, 2006). Le déficit hydrique, qu'il soit précoce ou tardif réduit la vitesse de floraison des inflorescences. En revanche la date de mise à fleur des bouquets est avancée en condition de stress hydrique précoce, mais n'est pas altérée par un stress hydrique appliqué plus tard dans la croissance de la plante. Réduire le temps de floraison pour finir le cycle de vie plus précocement est souvent présenté comme une stratégie des plantes pour éviter les sécheresses fortes. Chez les céréales, un déficit hydrique durant la période de croissance végétative ou durant l'induction florale et le développement des inflorescences réduit la vitesse de développement des inflorescences. Cela entraîne un retard ou une inhibition complète de la floraison (anthèse) (Angus et Moncur, 1977; Craufurd *et al.*, 1993; De Rouw et Winkel, 1998; Mahalakshmi et Bidinger, 1985a,b; Mahalakshmi *et al.*, 1987; Winkel *et al.*, 1997; Wopereis *et al.*, 1996).

De même, les deux types de stress ont eu des effets comparables sur la masse sèche moyenne des feuilles et la surface moyenne des feuilles, qui ont été réduites par toutes les conditions de stress appliquées, qu'elles soient précoces ou tardives, c'est-à-dire dans cette étude, sur des stades de développement de la plante plus ou moins avancés et, sur des rangs de feuille plus ou moins élevés. Cet effet est également observé quelle que soit l'intensité de la contrainte. De nombreuses études ont montré que la réduction de surface foliaire était l'une des premières réponses de la plante face à une contrainte hydrique et ce, chez de nombreuses espèces annuelles (Tardieu *et al.*, 1999), pérennes (Génard *et al.*, 2009), à croissance déterminée, à croissance indéterminée (Lecoeur *et al.*, 1995).

Par contre, la surface spécifique moyenne des feuilles qui est définie comme un trait stratégique en écologie, i.e. la surface foliaire capturant la lumière ramenée à l'unité de biomasse (Poorter *et al.*, 2009) n'a pas été altérée de la même façon selon le type de stress appliqué. Selon Tardieu *et al.*, (1999), les conditions qui affectent plus la croissance des feuilles que leur photosynthèse causent une réduction de surface spécifique. Dans notre étude, la surface spécifique moyenne des feuilles ne varie pas lorsque le stress hydrique est précoce, tandis qu'elle est réduite par le même stress hydrique pour les unités sympodiales émises plus tardivement. Les rangs de feuilles étudiées en serre, feuille du septième bouquet, sont nettement plus élevés que ceux étudiés lors du stress en chambre de culture, feuilles 7 à 10 sous le premier bouquet. L'hypothèse pourrait être émise que la plante privilégie son assimilation carbonée plutôt que l'expansion de ses feuilles sur les stades plus avancés qui correspondent à des stades avec un plus grand nombre de fruits en croissance le long de la tige. Gary *et Bertin* (1992) proposent d'ailleurs d'utiliser la masse spécifique des feuilles (inverse de la surface spécifique présentée ici) pour caractériser la compétition à un stade donné de croissance.

La réduction de la taille du fruit chez la tomate est associée à une diminution de l'accumulation d'eau dans le fruit, tandis que la masse sèche n'est pas affectée comme pour de nombreux fruits à pulpe (Ehret et Ho, 1986a; Sonneveld et Welles, 1988; Van Ieperen, 1996b). Le déficit hydrique entraîne une réduction de la teneur en eau du fruit. Il est décrit que le rendement de la culture de tomate peut être altéré par une variation du poids moyen des fruits (Van Ieperen, 1996a; Cuartero et Fernandez-Munoz, 1999) et/ou du nombre de fruits par plante (Gormley et Maher, 1990; Hao *et al.* 2000). Des études montrent que lors d'un stress hydrique appliqué tout le long de la croissance (croissance végétative et floraison), le nombre et la taille du fruit sont significativement réduits (Bradford et Hsiao, 1982; Cantore *et*

al. 2000). Ici, pour le stress imposé et nos conditions environnementales, le rendement n'est réduit que par la diminution de la masse fraîche moyenne du fruit.

II.4.3 Un contrôle précis de l'environnement ne suffit pas à maintenir des conditions « identiques » au cours du développement de la plante : les modifications des forces de puits.

La plante est un miroir des variations environnementales qui ont lieu lors de sa croissance. Son développement, sa croissance et son fonctionnement sont sensibles à son environnement climatique (température, pression de vapeur d'eau dans l'air, quantité d'eau contenue dans le sol, etc.), chimique (quantité et qualité des nutriments, pH, etc...) et biotique (Gratani, 2014). Chaque organe de la plante qui se développe dans des conditions environnementales données en est représentatif par sa morphologie, sa physiologie et l'expression de son génome, influençant ensuite le développement des organes en croissance et des organes qui vont lui succéder. Chez la tomate, Murneek (1924) montre que la croissance végétative est régulée par le développement des fruits. Et, Salter (1958) montre que les fruits des plantes cultivées en condition de déficit hydrique sont capables de « monopoliser » les assimilats pour maintenir leur taux de croissance. Ces résultats sont confirmés par ceux de Heuvelink et Buischool (1995) qui suggèrent l'existence d'une compétition entre les feuilles et les fruits pour les assimilats. Ainsi, toutes les feuilles qui se développent le long des unités sympodiales successives n'ont pas le même « statut » en terme de compétition avec les autres organes source (autres feuilles) ou/et puits (fruits). Il en résulte que plus le rang de la feuille le long de la tige est élevé, plus sa croissance sera altérée par les environnements dans lesquels les autres organes se sont développés et se développent et, par le nombre de fruits en croissance

le long de la tige. Ceci est particulièrement vrai chez une espèce à croissance indéterminée comme la tomate cerise.

II.4.4 Les déficits hydriques imposés ont plus affecté la croissance végétative que le rendement en fruit.

Au cours d'une saison de culture, le rendement total est déterminé par la balance entre la croissance végétative et la croissance reproductive et, par conséquent par l'acquisition des ressources et leur allocation (assimilats et eau) (Heuvelink *et al.*, 2005). Le rendement résulte du nombre de fruits mûrs et de leur taille/masse individuelle. L'avortement désignant l'interruption de la croissance du fruit à un stade précoce de son développement ($\emptyset < 20$ mm) a également un impact sur le rendement final (Bertin, 1995). Il est influencé par les conditions environnementales et la compétition intra-plante pour les assimilats. Avant l'anthèse, les inflorescences peuvent être avortées principalement à cause de la compétition pour les assimilats entre l'apex végétatif et la dernière inflorescence initiée (Kinet *et al.*, 1978; Leonard *et al.*, 1983). La masse fraîche d'un fruit est la somme de la masse sèche et de la quantité d'eau qui le composent. La masse sèche de la récolte dépend de la quantité totale d'assimilats disponibles pour la croissance (déterminés par la photosynthèse et la respiration) et de la distribution de la matière sèche entre les organes de la plante (Challa et Shapendonk, 1986 ; Heuvelink et Bertin, 1994). La distribution de la matière sèche entre les différentes parties de la plante a été décrite comme un équilibre fonctionnel (Brouwer, 1962) ou comme fonction des distributions qui sont dépendantes du temps ou du stade de développement (Barnes, 1979; Spitters *et al.*, 1989).

Ici, le nombre de fruits noués et le taux d'avortement des grappes 4 à 7 ne sont pas altérés par le déficit hydrique. En revanche, la masse fraîche des fruits des grappes 4 à 7 est réduite par le

déficit hydrique. D'autre part, la masse sèche moyenne d'un fruit de ces mêmes grappes n'est pas modifiée par le déficit hydrique tandis que la masse fraîche moyenne est réduite et la matière sèche (% en masse sèche) moyenne augmentée. Ces résultats suggèrent que la quantité d'assimilats allouée aux fruits des grappes 4 à 7 n'est pas modifiée par le déficit hydrique imposé lors de l'expérimentation et que la différence de rendement en masse fraîche des grappes 4 à 7 serait due à la quantité d'eau accumulée dans les fruits.

À l'échelle de la plante entière, les plantes cultivées en condition de déficit hydrique étaient plus petites que les plantes bien irriguées et leur masse sèche totale lors de la récolte était quasiment réduite de moitié. Le nombre maximum de bouquets de ces plantes était réduit de 15 %; alors que la matière sèche totale en fruits, limbes et, tiges et pétioles respectivement, ne sont pas modifiées par le déficit hydrique. Il semble donc qu'il y ait eu globalement moins d'assimilats disponibles pour la croissance des plantes en condition de déficit hydrique. En revanche, la répartition des assimilats est similaire entre les deux conditions d'irrigation et donc aucun organe n'a été prioritaire en condition de déficit hydrique.

II-5 CONCLUSIONS DE LA PARTIE II

Les résultats présentés dans cette partie II sont issus de deux expérimentations. La première, menée en chambre de culture dans un environnement contrôlé, a permis d'ajuster et tester des adaptations techniques de l'automate PHENOPSIS et d'établir des courbes de réponse du développement et de la croissance de la première unité sympodiale de la tomate cerise au contenu en eau du sol. La seconde a été menée en serre et, a permis d'étudier les effets du déficit hydrique sur des plantes cultivées dans des conditions d'irrigation contrôlées, jusqu'à des stades de croissance plus tardifs (jusqu'à 15 unités sympodiales). Pour la plupart des variables étudiées, les effets des déficits hydriques ont été comparables que ce soit sur le développement précoce ou plus tardif de la plante. La seule grosse différence est apparue sur la réponse au déficit hydrique de la surface spécifique des feuilles qui est réduite par le déficit hydrique sur un rang élevé de feuille (septième unité sympodiale) tandis qu'elle ne l'est pas sur un rang de feuille moins élevé (première unité sympodiale). Ce trait intègre à la fois une composante 'croissance' et une composante 'répartition des assimilats' dont l'équilibre peut être modifié suivant le stade de développement de la plante et son adaptation lors d'un stress long.

Globalement, le développement reproducteur a été plus affecté et de façon plus précoce que le développement végétatif en réponse aux déficits hydriques. Ces effets sur le développement reproducteur étaient variables suivant le stade de développement de la plante suggérant une adaptation progressive de la plante. A l'échelle de la plante entière dans l'expérimentation B, la production totale de masse sèche est réduite mais l'allocation entre les différents organes est peu affectée.

La diminution de rendement en termes de masse de fruits récoltés en condition de déficit d'irrigation est liée à la diminution de la masse fraîche moyenne du fruit. Et, la teneur en matière sèche du fruit a été augmentée par le déficit hydrique.

**PARTIE III : ANALYSE MULTI-ÉCHELLE DE LA
PLASTICITÉ DES FEUILLES CHEZ LA TOMATE**

III-1 INTRODUCTION DE LA PARTIE III

La remarquable variation de forme et de taille des feuilles entre les plantes et au sein d'une même plante a fasciné de nombreux scientifiques travaillant dans le domaine de la biologie du développement. La régulation de cette forme et de cette surface des feuilles joue un rôle prééminent dans la capture de la lumière, la photosynthèse, la transpiration et donc, la production de biomasse de la plante. Elle a été au centre de nombreuses études en agronomie. Le contrôle de l'expansion de la surface des feuilles aux échelles cellulaire et moléculaire a été étudié chez différents modèles de plantes. Ces études ont fourni des pistes permettant de mieux comprendre et simuler la régulation complexe de la morphogénèse foliaire (Rodriguez *et al.*, 2014; Vanhaeren *et al.*, 2016). Chaque feuille est formée de cellules qui se divisent et entrent en expansion à des vitesses et à des périodes différentes, dépendantes de l'espèce, du génotype, des conditions environnementales, du stade de développement, des tissus de la feuille et du type de cellules d'un tissu donné (Pyke *et al.*, 1991; Donnelly *et al.*, 1999; Tardieu *et al.*, 2000; Rymen *et al.*, 2007; Skirycz *et al.*, 2011; Wuyts *et al.*, 2012). Le cycle cellulaire standard au cours duquel une cellule mère se divise en deux cellules filles, implique une phase de duplication de l'ADN suivie par une mitose. Chez certaines espèces, il existe une variante du cycle cellulaire, le cycle d'endoréduplication ou endocycle. Durant l'endocycle, il n'y a pas de mitose et, la cellule réplique son ADN de manière répétitive. Il en résulte la formation d'une cellule endopolyploïde (Edgar *et al.*, 2014). Les cellules endopolyploïdes sont généralement plus grandes que les autres, comme cela a été montré sur les épidermes de différents organes tels la feuille, la tige ou les sépales chez *Arabidopsis thaliana* (Melaragno *et al.*, 1993; Roeder *et al.*, 2010) et dans le péricarpe du fruit de tomate (Cheniclet *et al.*, 2005). Même si une corrélation est souvent mise en évidence entre le niveau

de ploïdie et la taille de la cellule; il a récemment été montré que cette corrélation dépendait du type de cellules concerné (Katagiri *et al.*, 2016).

Les contributions respectives de la division cellulaire et de l'expansion cellulaire à la taille finale des feuilles et les interrelations entre ces processus ont été analysées dans des feuilles simples, i.e. composées d'un seul limbe rattaché à la tige chez les dicotylédones et monocotylédones (Horiguchi *et al.*, 2006; Massonnet *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2012; Nelissen *et al.*, 2016). La taille finale des feuilles est surtout déterminée par le nombre de cellules qui la composent plutôt que par la taille moyenne de ces cellules. Cela a été observé dans les plantes d'un même génotype cultivées dans des conditions environnementales variées (Granier *et al.*, 2000 pour différentes espèces), sur des populations de lignées recombinantes (Ter Steege *et al.*, 2005 chez *Aegilops tauschii*; Tisé *et al.*, 2008 chez *Arabidopsis thaliana*) et, même plus récemment sur des feuilles de différentes espèces avec des tailles très variables (Gazquez et Beemster, 2017). Quelques études ont montré que la variabilité de taille des feuilles selon leur rang le long de la tige était plutôt reliée à des changements du nombre de cellules que de taille de cellules, révélant que le cycle cellulaire joue aussi un rôle dans l'hétéroblastie (Ashby, 1948 chez *Ipomoea*; Tisé *et al.*, 2011 chez *Arabidopsis thaliana*). Pendant longtemps, il a été admis que le cycle cellulaire était 'moteur' de l'expansion des organes en contrôlant le nombre de cellules, variable déterminante dans la taille de cet organe.

La relation entre le nombre de cellules et la taille de la feuille est moins claire lorsque l'analyse porte sur des génotypes affectés dans l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Une augmentation du nombre de cellules de la feuille, causée par la surexpression de gènes activateurs du cycle cellulaire ou par la baisse d'expression de gènes inhibiteurs du cycle cellulaire, peut coïncider avec une augmentation, une diminution, ou une absence de variation de la taille de la feuille (Hemerly *et al.*, 1995; Autran *et al.*, 2002, Cookson *et al.*, 2005, Tojo *et al.*, 2008). Ces résultats ont remis en cause, au moins partiellement, le rôle

crucial du cycle cellulaire en tant que moteur de la croissance de l'organe (Fleming, 2007). La théorie selon laquelle la croissance de l'organe résultait des processus cellulaires sous-jacents a de ce fait été reconsidérée dans de nombreux articles (Kaplan et Hagemann, 1991; John et Qi, 2008; Sablowski, 2016).

Les feuilles composées ajoutent de la complexité par rapport aux feuilles simples. Leur morphogénèse est sujette à débat. Sont-elles réduites à la somme des folioles ou bien, la foliole constitue-elle un organe à part entière ? (Champagne et Sinha, 2004). Dans certaines études les folioles sont considérées comme des structures partiellement indéterminées qui partagent des propriétés avec les parties végétatives et les feuilles simples (Sattler et Rutishauser, 1992). Dans d'autres, il est suggéré que la feuille composée est équivalente à la feuille simple et que les folioles sont des subdivisions du limbe simple (Kaplan, 1975). La feuille de tomate est utilisée comme modèle pour étudier le contrôle génétique du développement de la feuille composée (Hareven *et al.*, 1996; Champagne et Sinha, 2004).. Contrairement aux nombreuses données qui existent sur les feuilles simples, la contribution des processus cellulaires sur la plasticité de la taille de la feuille de tomate ainsi que leurs interactions n'ont pas encore été analysés.

L'objectif de cette partie de la thèse était d'analyser les bases cellulaires de la plasticité des feuilles de tomate. Les contributions respectives du nombre de cellules et de la surface finale des cellules de la face adaxiale de l'épiderme à la surface finale de la feuille composée de tomate ont été étudiées en étendant l'analyse au processus d'endoréduplication. Pour mieux comprendre l'organisation cellulaire de la surface totale de la feuille, ces traits ont été analysés sur les différentes folioles des feuilles successives le long de l'unité sympodiale (analyse spatiale) et au cours de l'expansion d'une foliole (analyse temporelle). Pour enrichir le débat sur les différentes théories au sujet du contrôle de la croissance des feuilles, les mêmes traits ont été mesurés sur une lignée transgénique dans laquelle l'expression du gène

CCS52A est réduite. Le gène CCS52A est spécifiquement associé au passage du cycle mitotique au cycle d'endoréduplication dans différents organes (de Veylder *et al.*, 2011). De précédentes études sur la tomate ont montré que la réduction de l'expression du gène CCS52A induit la formation de plantes plus petites en retardant leur développement. Ces plantes avaient de plus petits fruits avec de plus petites cellules et une plus grande densité cellulaire dans le péricarpe, ainsi que de plus faibles niveaux d'endoréduplication (Mathieu-Rivet *et al.*, 2010). La variabilité de surface des feuilles, de surface des folioles et des traits cellulaires associés a également été analysée sur des plantes sujettes à différentes teneurs en eau du sol.

Les résultats obtenus ont permis :

- (1) de mieux comprendre l'organisation de la feuille composée de tomate à l'échelle cellulaire. Ils mettent en avant l'importance de considérer le rang de feuille le long de l'unité sympodiale quand différents traits sont comparés.
- (2) de démontrer que la feuille composée à un rang donné peut être représentée par l'une de ses folioles en ce qui concerne sa surface et ses caractéristiques cellulaires.
- (3) de montrer que la surface des feuilles est étroitement liée au nombre de cellules de l'épiderme sans lien direct avec les autres traits, à savoir, la surface cellulaire et l'endoréduplication; grâce à une large variabilité de surface entre feuilles de position différente sur la plante, ou en réponse à une perturbation génétique ou un traitement hydrique.
- (4) de mettre en évidence un certain découplage entre l'endoréduplication et l'expansion cellulaire lorsque des feuilles de positions différentes sur la plante sont comparées (analyse spatiale), mais également au cours du développement (analyse temporelle).

III-2 MATÉRIEL ET MÉTHODE DE LA PARTIE III

Les données présentées dans cette partie ont été mesurées sur des plantes cultivées lors de deux expérimentations différentes, A et C (voir tableau I.1).

Les conditions de l'expérimentation A ont été présentées en détails dans la partie précédente (Partie II). Les plantes étaient cultivées en chambre de culture avec l'automate de pesée et d'irrigation PHENOPSIS. Les conditions environnementales et les données d'irrigation des plantes ne sont pas montrées à nouveau dans cette partie (voir Figures II.2 ; II.3).

Lors de l'expérimentation C, les plantes ont également été cultivées en chambre de culture avec l'automate de pesée et d'irrigation PHENOPSIS jusqu'au moment où leur pesée a été gênée par la hauteur de plafond de la chambre. Elles ont alors été transférées en serre dans un compartiment équipé d'un système de pesée et d'irrigation automatique, PHENODYN, pendant les 15 derniers jours d'expérimentations en ciblant les mêmes conditions environnementales que celles obtenues dans la chambre de culture PHENOPSIS.

III.2.1 Matériel végétal, semis et pré-culture des plantules

Lors de l'expérimentation A, 147 graines de tomate cerise (*Solanum lycopersicum*), lignée West Virginia 106 (WVa 106), et neuf graines de la lignée anti-sens Pro 35S :Slccs52A AS (décrite dans Mathieu-Rivet *et al.*, 2010) ont été décontaminées comme décrit dans la partie II. La suite du protocole de semis et pré-culture est décrite dans la partie décrivant l'expérimentation A (partie II) dont sont issues les données décrites ici. Les plantes de WVa106 ont été cultivées à 6 teneurs en eau du sol avec une condition bien irriguée à $1.6 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1} \text{ sol sec}$ et 4 conditions avec une teneur en eau plus faible mais stable de $1.4 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1} \text{ sol sec}$, $1.2 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1} \text{ sol sec}$, $0.9 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1} \text{ sol sec}$, $0.6 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1} \text{ sol sec}$. Il y avait 7 répétitions pour chacune des conditions. La dernière condition comprenait 14 plantes qui ont subi un

stress plus sévère avec un arrêt d'irrigation sans ré-irrigation jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les plantes de la lignée anti-sens Pro 35S :Slccs52A AS ont été cultivées seulement en condition bien irriguée à $1.6 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ sol sec sol sec (voir Figure II.3).

Lors de l'expérimentation C, 210 graines de tomate cerise (*Solanum lycopersicum*), lignée West Virginia 106 (WVa 106) ont été semées en sol. Elles ont germé dans un sol dont le contenu en eau a été maintenu à $1.8 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ de sol sec, à 16h de photopériode, 25°C le jour, 20°C la nuit et, 0.8 kPa de pression de vapeur d'eau dans la chambre de culture équipée de l'automate PHENOPSIS pendant 3 semaines. Les pots ont été éclaircis 10 jours après semis pour ne laisser qu'une plante par pot.

III.2.2 Conditions de croissance

Lors de l'expérimentation A, les plantes ont été cultivées dans la chambre de culture équipée de l'automate PHENOPSIS comme décrit dans la partie II.

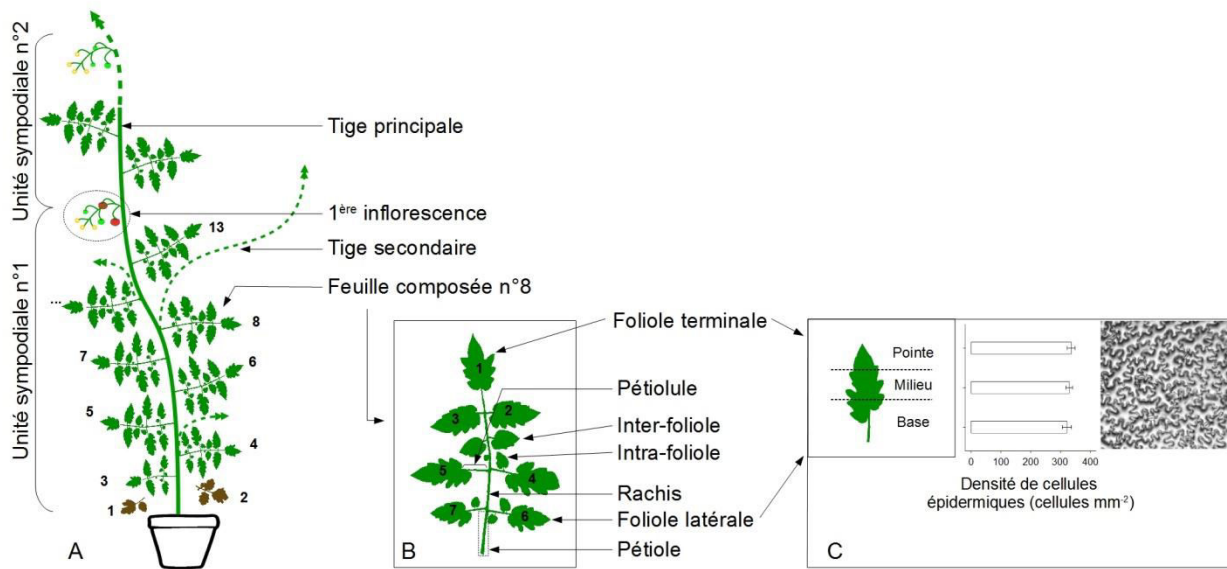
Lors de l'expérimentation C, les plantes ont dans un premier temps été cultivées dans la chambre de culture équipée de l'automate PHENOPSIS jusqu'à 8 semaines après leur levée. Les conditions environnementales dans la chambre de culture étaient stables avec 16h de photopériode, 23°C le jour, 20°C la nuit et 0.8 kPa de pression de vapeur d'eau. Une fois les plantes éclaircies et ramenées à une plante par pot, deux conditions de teneur en eau ont été maintenues stables durant cette expérimentation, $1.4 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ de sol sec pour la condition bien irriguée et $0.8 \text{ gH}_2\text{O g}^{-1}$ de sol sec pour la condition en déficit hydrique. Ces teneurs en eau du sol ont été maintenues une fois les plantes transférées dans la serre équipée de l'automate PHENODYN. Cet automate comprend 70 balances chacune avec un système

d'irrigation. Chaque pot était posé sur sa balance individuelle et avait son propre système d'irrigation relié à un programme précisant le poids cible de chaque pot pour avoir la teneur en eau du sol voulue. Les plantes ont ainsi été irriguées avec la solution nutritive deux fois par jour pour atteindre le poids cible défini. Afin de prendre en compte le poids des plantes développées dans le calcul de la teneur en eau du sol, une plante de chaque condition d'irrigation était coupée et pesée chaque semaine pour ajuster le poids cible. Les conditions de température ont aussi été régulées dans la serre de façon à avoir des conditions les plus proches possibles de celles obtenues dans la chambre de culture.

III.2.3 Mesure des traits phénotypiques

Le protocole expérimental utilisé ici est basé sur des protocoles précédemment appliqués aux feuilles simples et étendus à la feuille composée afin de faciliter la comparaison avec des résultats précédents (Hemerly *et al.*, 1995; Autran *et al.*, 2002, Cookson *et al.*, 2006, Tojo *et al.*, 2008, Massonnet *et al.*, 2011, Gazquez et Beemster, 2017).

Lors de l'expérimentation A, pour chaque plante, les traits relatifs à la croissance foliaire (échelle feuille, foliole et cellule, Figure III.1) ont été mesurés quand toutes les feuilles de la première unité sympodiale ont eu fini leur croissance. Au moment de la récolte, même les plantes les plus stressées ne montraient pas de signes de dépérissement. Toutes les mesures phénotypiques ci-dessous ont donc été réalisées sur toutes les folioles individuelles des feuilles individuelles de la première unité sympodiale.



Lors de l'expérimentation C, pour chaque plante, les traits relatifs à la croissance foliaire ont été mesurés sur deux folioles de la treizième feuille. En effet, il a été montré lors de l'expérimentation A (voir résultats qui suivent), qu'au sein d'une même feuille, les folioles sont équivalentes entre elles et les variables phénotypiques liées à la croissance des folioles résument les variables phénotypiques de la feuille à laquelle elles sont rattachées. Les mesures phénotypiques ont donc été faites en parallèle sur la paire de folioles qui émerge après la foliole terminale sur la feuille 13, i.e., les folioles 2 et 3 dont l'émergence est simultanée. Pour cette expérience, les mesures phénotypiques ont été réalisées en dynamiques au cours du temps, sur des folioles mesurées tous les 2 ou 3 jours de façon à obtenir des cinétiques de croissance.

III.2.3.1 Mesure des traits relatifs à la taille des feuilles

Lors de l'expérimentation A, pour chaque plante, la première unité sympodiale était composée d'un maximum de 13 feuilles (Fig III.1). Les deux premières feuilles n'ont pas pu être mesurées car elles étaient sénescents lors de la récolte pour tous les régimes d'irrigation appliqués. Pour toutes les plantes bien irriguées du génotype sauvage WVa106, la troisième feuille était composée de cinq folioles tandis que toutes les autres feuilles étaient composées de sept folioles. Pour les plantes de WVa106 cultivées en condition de déficit hydrique (humidité pondérale $< 1.4 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}\text{sol sec}$), la quatrième feuille peut être composée de cinq folioles seulement. Pour la lignée transgénique Pro35S:Slccs52A AS, la troisième, la quatrième, la cinquième et, certaines sixièmes feuilles étaient composées de cinq folioles, tandis que les autres étaient composées de sept folioles. Comme décrit dans la partie II, les feuilles de la première unité sympodiale ont été coupées à la base du rachis puis scannées. Ensuite, les surfaces individuelles de toutes les folioles (cm^2) ont été mesurées à partir des

scans avec le logiciel d'analyse d'image ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Pour chaque feuille, la surface foliaire a été calculée comme la somme de la surface de ses folioles.

Lors de l'expérimentation C, les trois premières mesures effectuées (une mesure tous les deux jours) après la date d'émergence des folioles 2 et 3 ont été destructives. Les folioles 2 et 3 de la 13^{ème} feuille de 9 plantes (3 plantes par jour) ont été coupées à la base du limbe et ont été scannées. Six jours après leur émergence, les folioles étaient assez grandes pour qu'il ne soit plus nécessaire de les couper. Les folioles ont donc été photographiées tous les deux jours. Les photos des folioles ont été effectuées devant une feuille sur laquelle un carré de 1 cm² de côté était dessiné. La surface des folioles (mm²) a ensuite été mesurée à partir des scans et photos avec le logiciel d'analyse d'image ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

III.2.3.2 Mesure des traits relatifs à l'anatomie de la face adaxiale de l'épiderme

Réalisation d'empreintes de l'épiderme adaxial des folioles

Lors de l'expérimentation A, les empreintes de la face adaxiale de l'épiderme ont été obtenues en étalant un vernis à ongles translucide sur la face adaxiale de chaque foliole de chaque feuille des rangs successifs (de la feuille 3 à la feuille 13). Une fois le vernis sec, l'empreinte a été décollée et immédiatement collée sur une lame de microscope à l'aide d'un ruban adhésif.

Lors de l'expérimentation C, les trois premières mesures effectuées (une mesure tous les deux jours) après la date d'émergence des folioles 2 et 3 ont été destructives. Les empreintes de la face adaxiale de l'épiderme ont été obtenues de la même façon que pour

l'expérimentation A. Six jours après leur émergence, les folioles étaient assez grandes pour qu'il ne soit plus nécessaire de les couper. Les empreintes ont donc été prises régulièrement avec une résine dentaire (Coltene President Light Body Surface Activated, faible viscosité (distribuée par Patterson Dental, Detroit MI). Le protocole détaillé est décrit dans Kagan, Novoplansky, et Sachs, 1992. Les empreintes ont été prises tous les deux jours et sur toute la longueur d'une même foliole à chaque mesure. Pour les imprimer : les contenus des deux tubes constituant la résine, un catalyseur (vert) et une base (blanc) ont été mélangés et appliqués sur la face adaxiale des folioles. Après une minute de séchage, la résine dentaire a été délicatement retirée de l'épiderme de la foliole. Les empreintes prises avec la résine ont ensuite été réimprimées avec du verni, comme décrit précédemment.

Visualisation des empreintes épidermiques

Pour les expérimentations A et C, les empreintes ont été placées sous un microscope (Leitz DM RB; Leica, Wetzlar, Germany) couplé au logiciel d'analyse d'image ImageJ (Figure III.1C). Seul l'épiderme de la face adaxiale des feuilles est considéré dans cette étude. Lorsqu'il est question de cellules de l'épiderme dans la suite du texte, cela fait référence à la face adaxiale de l'épiderme dont les mesures sont décrites ici.

Densité de cellules de l'épiderme de la foliole

Lors de l'expérimentation C, les données de densité des cellules de l'épiderme (nombre de cellules mm^{-2}) ont été obtenues en comptant le nombre de cellules observées au microscope dans une surface donnée et connue de chaque empreinte épidermique réalisée. Systématiquement, plus de 50 cellules ont été comptées sur chaque zone. La zone était dessinée manuellement sans tronquer de cellules.

Distribution de la surface cellulaire par foliole et par feuille

Lors de l'expérimentation A, pour chaque foliole, au moins 75 cellules de l'épiderme ont été dessinées manuellement sur une zone centrale (de part et d'autre de la nervure centrale) de la foliole mature. Cette zone de la foliole a été sélectionnée après une expérimentation préliminaire qui a montré que la densité cellulaire de l'épiderme ne variait pas de la base à la pointe de la foliole mature (Figure III.1C, Test de Kruskal-Wallis par rangs, p-value = 0.131). La distribution de la surface cellulaire dans les épidermes des folioles a été obtenue en groupant les données de cellules dessinées sur les folioles de même position sur la feuille. La distribution des surfaces cellulaires par feuille a été obtenue en groupant des données de cellules dessinées sur les différentes folioles d'une même feuille.

Lors de l'expérimentation C, la distribution de la surface cellulaire dans l'épiderme de la foliole a été analysée en dessinant des cellules non-tronquées d'une surface donnée, sur trois zones sélectionnées à la base, au milieu et, à la pointe de la foliole du côté droit de la nervure centrale, pour chaque empreinte réalisée. Pour chaque zone, les surfaces de 30 cellules environ ont été mesurées.

Surface cellulaire moyenne dans l'épiderme de la foliole

Lors de l'expérimentation C, la surface cellulaire moyenne des folioles a été calculée par le ratio entre la surface moyenne de la foliole et la densité cellulaire moyenne de l'épiderme de la foliole.

Lors de l'expérimentation A, la surface cellulaire moyenne des folioles a été calculée à partir des distributions de surface cellulaire.

Nombre moyen de cellules par foliole

Le nombre moyen de cellules par foliole a été calculée par le ratio de la surface moyenne la foliole considérée et la surface moyenne des cellules au sein de cette foliole.

Nombre moyen de cellules par feuille

Le nombre moyen de cellules par feuille a été calculé par le ratio de la surface foliaire sur la surface cellulaire moyenne au sein de cette feuille.

III.2.3.3 *Niveaux de ploïdie dans les feuilles et les folioles*

Les niveaux de ploïdie ont été mesurés dans tous les folioles à la fin de leur croissance pour l'expérimentation A. Ils ont été mesurés sur un des deux folioles, 2 ou 3, de la feuille 13 au cours du temps pour l'expérimentation C.

Juste avant de scanner les feuilles, des disques foliaires ont été récoltés à la base, au milieu et, à la pointe de la foliole. Ils ont été récoltés de part et d'autre de la nervure centrale à l'aide d'un emporte-pièce de 8 mm de diamètre. Les disques ont été immédiatement mis dans des tubes Eppendorf de 2 mL et gelés dans l'azote liquide. Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'au moment de la mesure au cytomètre de flux. Les disques congelés ont été hachés avec une lame de rasoir et incubés dans 200 µL de tampon d'extraction pendant 2 minutes. Les noyaux extraits ont ensuite été fixés avec 200 µL d'éthanol 70 % pendant 2 minutes et colorés avec 800 µL de DAPI. Les solutions ont été filtrées pour éliminer toutes les structures dont le diamètre était supérieur à 30 µm. Les solutions résultantes ont été analysées par cytométrie en flux avec le système C6 de chez BD Accuri. Tous les réactifs ont été fournis par BD Biosciences.

Les histogrammes représentant la distribution des différents niveaux de ploïdie ont été groupés, i.e. superposés, pour chaque position de foliole, rang de feuille, génotype et, condition d'irrigation. Les positions des pics correspondant aux différentes classes de noyaux, i.e. noyaux en 2C, 4C, et 8C ont été manuellement identifiés. Les fenêtres ont été positionnées à partir d'un échantillon de référence dont les noyaux ont été extraits à partir de jeunes feuilles de tomate contenant une forte proportion de cellules en division (Figure III.2).

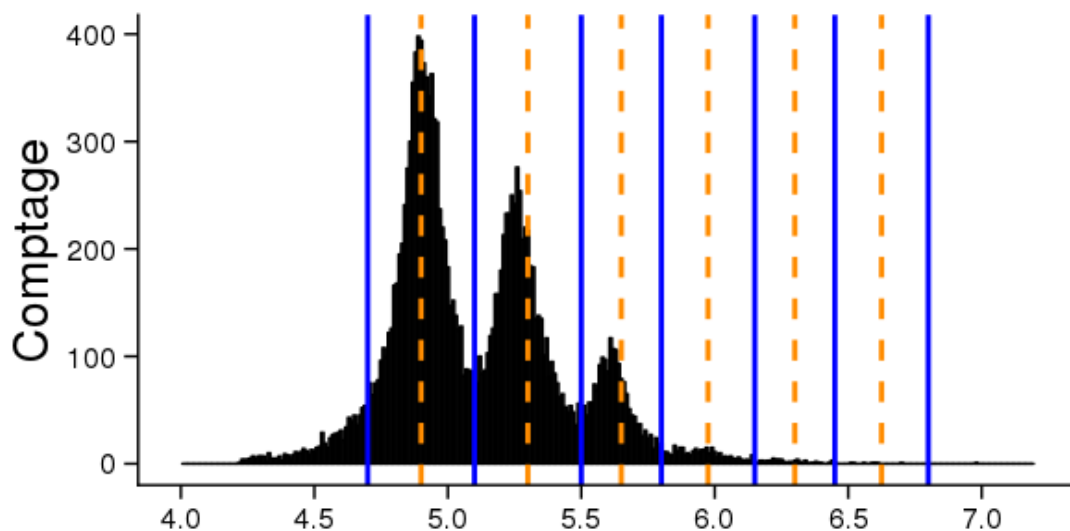


Figure III-2. Distribution des niveaux de ploïdie mesurés par cytométrie en flux dans des jeunes feuilles de tomates et utilisés comme référence pour identifier les positions des pics des cellules en 2C, 4C, 8C, 32C et 64 C.

Ce traitement manuel des données a permis de supprimer les bruits de fond, i.e., toutes les structures sous le pic 2C qui peuvent provenir de différentes origines (principalement des interactions chimiques avec le DAPI et peut être aussi de débris résultant du hachage). Ce

traitement manuel a été impossible pour les échantillons récoltés sur les feuilles de la lignée anti sens, principalement à cause de la position du premier pic difficilement détectable et, affectant donc les résultats. Les positions des pics des noyaux en 16C et 32C ont été déduites à partir de la position des autres pics en considérant que le contenu en ADN est additif.

La position des pics a été identifiée à partir de la Figure III.2 et a été conservée pour toute l'étude. Les histogrammes de ploïdie ont été analysés de manière quantitative avec le logiciel R pour les plantes de WVa 106 de toutes les conditions d'irrigation.

III.2.4 Extraction des tendances pour les différentes variables morphologiques

La méthode LOESS (Cleveland, 1979), utilisée dans cette partie pour extraire les tendances des différentes variables morphologiques est décrite dans la partie II.

III.2.5 Ajustement des cinétiques obtenues pour les différents traits relatifs à la cinétique de croissance de la foliole

Pour les analyses des mesures phénotypiques en dynamique obtenues lors de l'expérimentation C, des ajustements des courbes ont été effectués avec deux fonctions sigmoïdales différentes :

Une fonction logistique standard :

$$y = \mathbf{a} / (1 + \exp(-(x - x_0) / \mathbf{b}))$$

Et une fonction de Gompertz :

$$y = \mathbf{a} * \exp(- \exp(x - x_0) / \mathbf{b}))$$

Pour chaque courbe, les deux fonctions ont été testées et les résidus ont été analysés pour choisir le modèle mathématique le plus approprié.

Afin de décrire les cinétiques de croissance de la surface foliaire, de la surface cellulaire moyenne de l'épiderme supérieur et du nombre de cellules de l'épiderme supérieur de la foliole, obtenues lors de l'expérimentation C, les courbes ont été ajustées à l'aide de modèles de régression non-linéaires. Pour cela deux modèles de type sigmoïde ont été testés, le modèle logistique et le modèle de Gompertz.

Le modèle de régression non-linéaire logistique est défini par :

$$y = a/[1 + \exp\{-[-\exp\{(t - t_0)/b\}] + \varepsilon,$$

Le modèle de régression non-linéaire de Gompertz est défini par :

$$y = a \exp[-\exp\{-(t - t_0)/b\}] + \varepsilon,$$

où a est l'asymptote supérieure, t_0 le temps au point d'inflexion, b la durée caractéristique de croissance (inverse du taux de croissance) et ε le terme résiduel distribué selon une loi normale centrée en 0.]

Les paramètres du modèle a , t_0 et b sont estimés par l'algorithme de Gauss-Newton qui est une méthode des moindres carrés itérés.

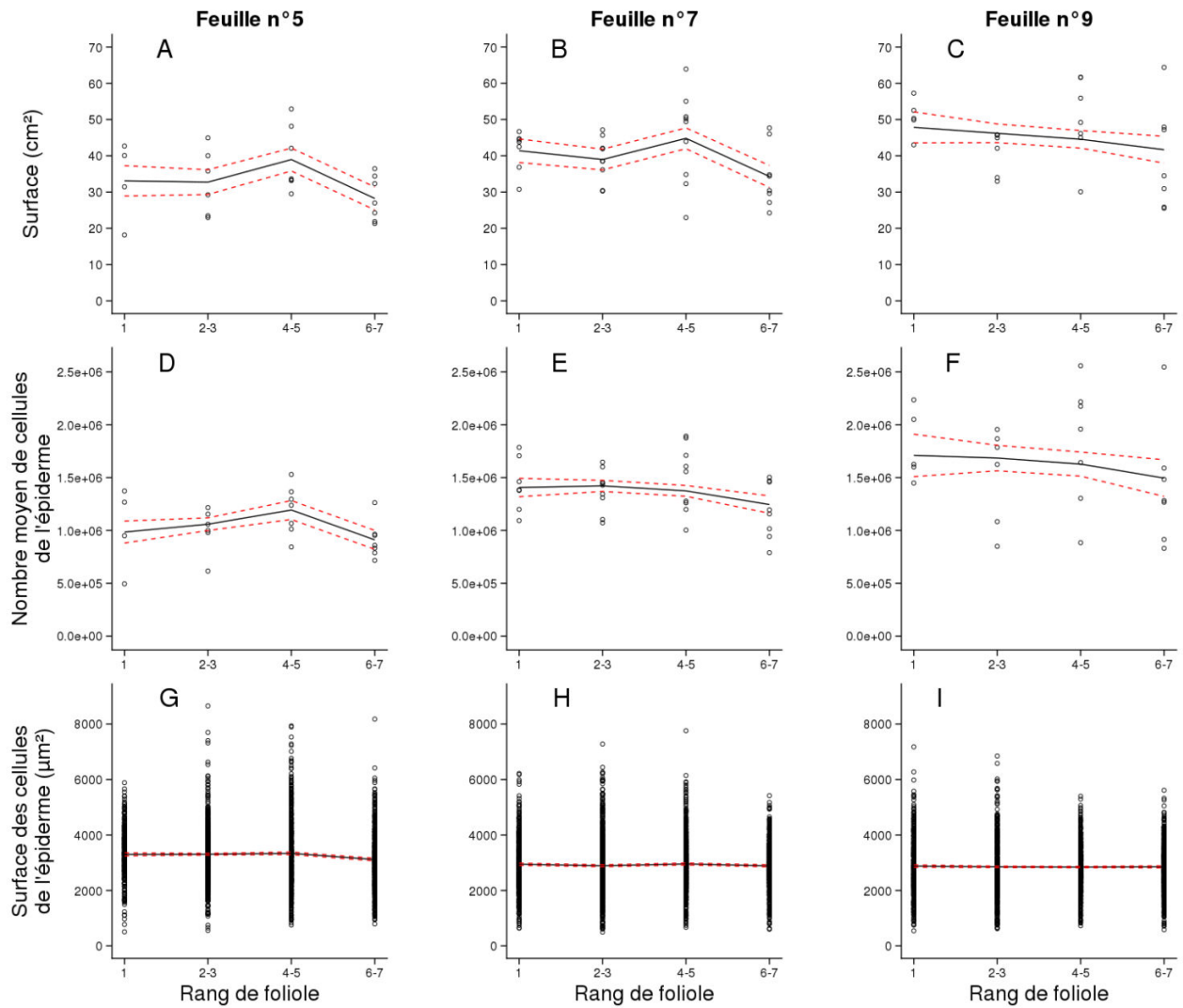
III-3 RÉSULTATS DE LA PARTIE III

III.3.1 Variation de surface finale des folioles et des traits cellulaires relatifs à la taille de la foliole le long du rachis de la feuille composée de tomate.

Pour chaque plante de WVa106 cultivée en condition bien irriguée, les surfaces des folioles ont été mesurées sur des séries successives de feuilles (dites séries hétéroblastiques) de la première unité sympodiale. La plupart des feuilles étaient composées de 7 folioles, à part les feuilles 1, 2 et 3 qui étaient composées de 3 à 5 folioles suivant les plantes (non présentées ici). Les mesures ont été effectuées sur les feuilles des rangs 3 à 13, lorsque les feuilles avaient atteint leur taille finale (Figure III.1).

Les surfaces des folioles varient légèrement le long du rachis d'une même feuille, comme montré pour les feuilles 5, 7 et 9 (Figure III.3 A-C, respectivement). De même le nombre final moyen de cellules de l'épiderme varie légèrement (Figure III.3 D-F). Il n'y a pas de variation de la distribution des surfaces des cellules de l'épiderme entre les folioles d'une même feuille (Figure III.3 G-I). Si l'on considère les variations des traits relatifs à la taille de la foliole en fonction du rang de feuille, les folioles de la feuille 9 sont plus grandes que ceux de la feuille 5, avec un nombre moyen de cellules de l'épiderme plus grand et une surface cellulaire moyenne plus petite ainsi qu'une distribution de taille de cellules plus étroite (Figure III.3).

Pour chaque foliole mature de la 9^{ème} feuille, la distribution des niveaux de ploïdie de l'ADN dans les faibles proportions, en 2C et 32C, était difficile à distinguer du bruit de fond (Figure III.4). En revanche, la somme des noyaux en 4C et 8C représente plus de 76% de tous les noyaux et, les noyaux en 16C varient de 7.2 à 10.8% (Figure III.4). Les distributions des niveaux de ploïdie ne montrent pas de tendance spécifique en lien avec la position de la foliole sur la feuille (Figure III.4).



III.3.2 Variations de la surface foliaire et des traits cellulaires associés le long de la première unité sympodiale.

Pour chaque plante de WVa106 cultivée en condition bien irriguée, la surface foliaire, le nombre de cellules épidermiques par feuille et la distribution de la surface des cellules épidermiques au sein de la feuille ont été mesurées le long de la première unité sympodiale (de la feuille 3 à la feuille 13). Les mesures ont été effectuées lorsque les feuilles avaient atteint leur taille finale. La surface foliaire finale augmente graduellement de la feuille 3 à la feuille 9; de 115.9 ± 24.7 à $321.6 \pm 12.9 \text{ cm}^2$ puis décroît légèrement jusqu'à la feuille 13 (Figure III.5A). Le nombre de cellules épidermiques moyen suit la même tendance (Figure III.5B). Par opposition, la surface cellulaire épidermique moyenne décroît de la feuille 3 à la feuille 8 où elle atteint un plateau (Figure III.5C). La surface cellulaire épidermique des feuilles les plus basses est très variable avec une distribution qui s'étend vers la droite révélant la présence de grandes cellules dans l'épiderme (Figure III.5C). La distribution du niveau de ploïdie de l'ADN dans les cellules de la feuille montre une variation du 2C au 32C dans les feuilles matures (Figure III.6). Elle ne montre pas de tendance spécifique avec le rang de feuille pour les rangs 4, 6, 8 et 12 le long de la première unité sympodiale (Figure III.6). Dans toutes les feuilles, la somme des noyaux en 4C et 8C représente plus de 74 % de tous les noyaux, tandis que les noyaux en 16C varient de 8.3 à 9.9 %. Il était difficile de distinguer de petites proportions de noyaux en 2C et 32C du bruit de fond.

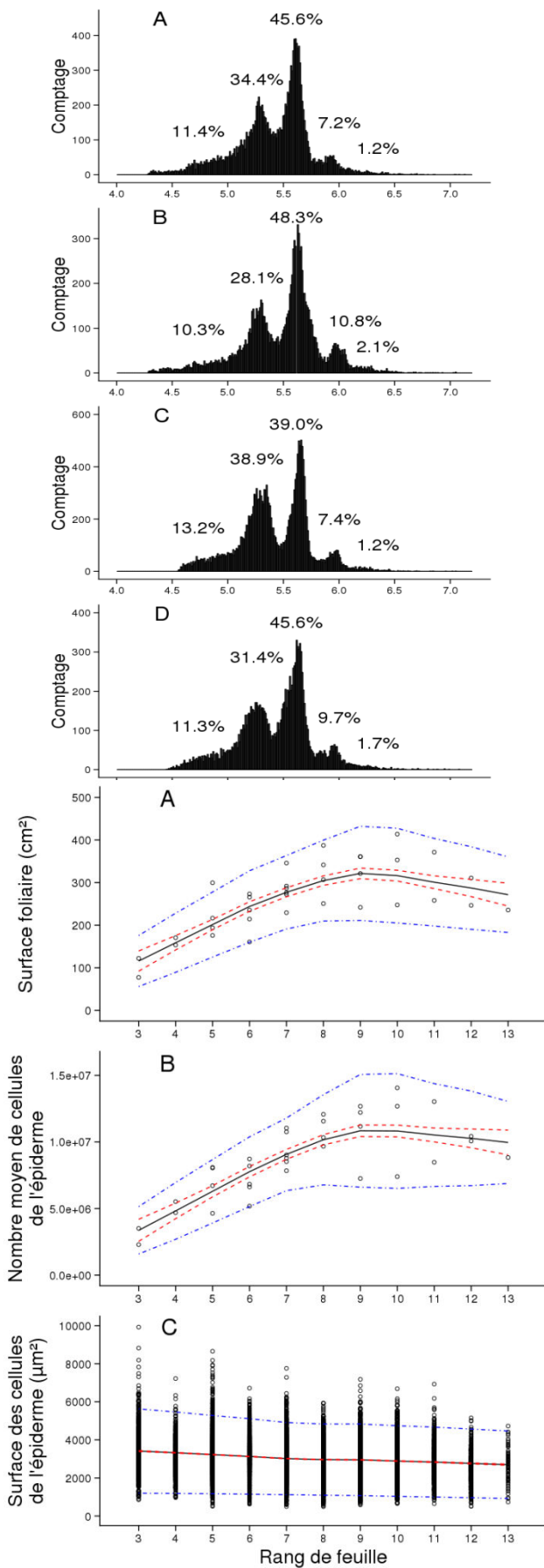


Figure III-4. Distribution du niveau de ploïdie mesuré par cytométrie en flux sur des folioles matures de la feuille 9 de la première unité sympodiale de plantes de tomate WVa106 cultivées dans de bonnes conditions d'irrigation. Les données sont montrées pour les folioles 1(A), 2 et 3 (B), 4 et 5 (C), 6 et 7 (D). Chaque distribution est obtenue en groupant les distributions obtenues pour 3 plantes différentes. Pour chaque distribution, le pourcentage de noyaux en 2C, 4C, 8C, 16C et 32C est noté sur les distributions.

Ces résultats montrent que les variations de taille finale des feuilles en fonction de leur rang le long de la première unité sympodiale des plantes de WVa106 sont liées aux variations de la surface des folioles et non de leur nombre (sauf pour les feuilles 1, 2 et 3 qui ont un nombre réduit de folioles) et aux variations du nombre de cellules de l'épiderme, et non de leur taille ou du niveau d'endoréduplication.

Au sein d'une feuille d'un rang donné, les caractéristiques cellulaires sont communes à toutes les folioles, i.e. avec des distributions communes des surfaces des cellules de l'épiderme et des niveaux de ploïdie des cellules.

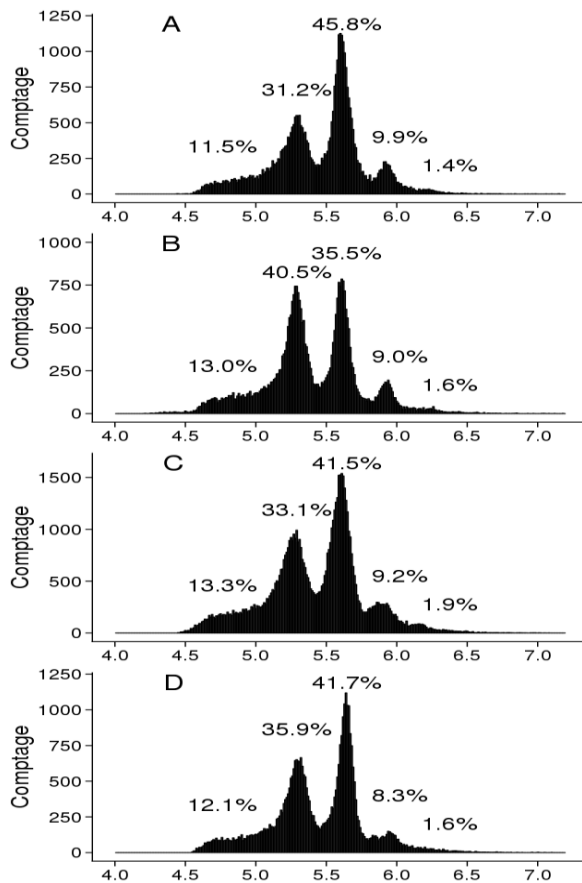
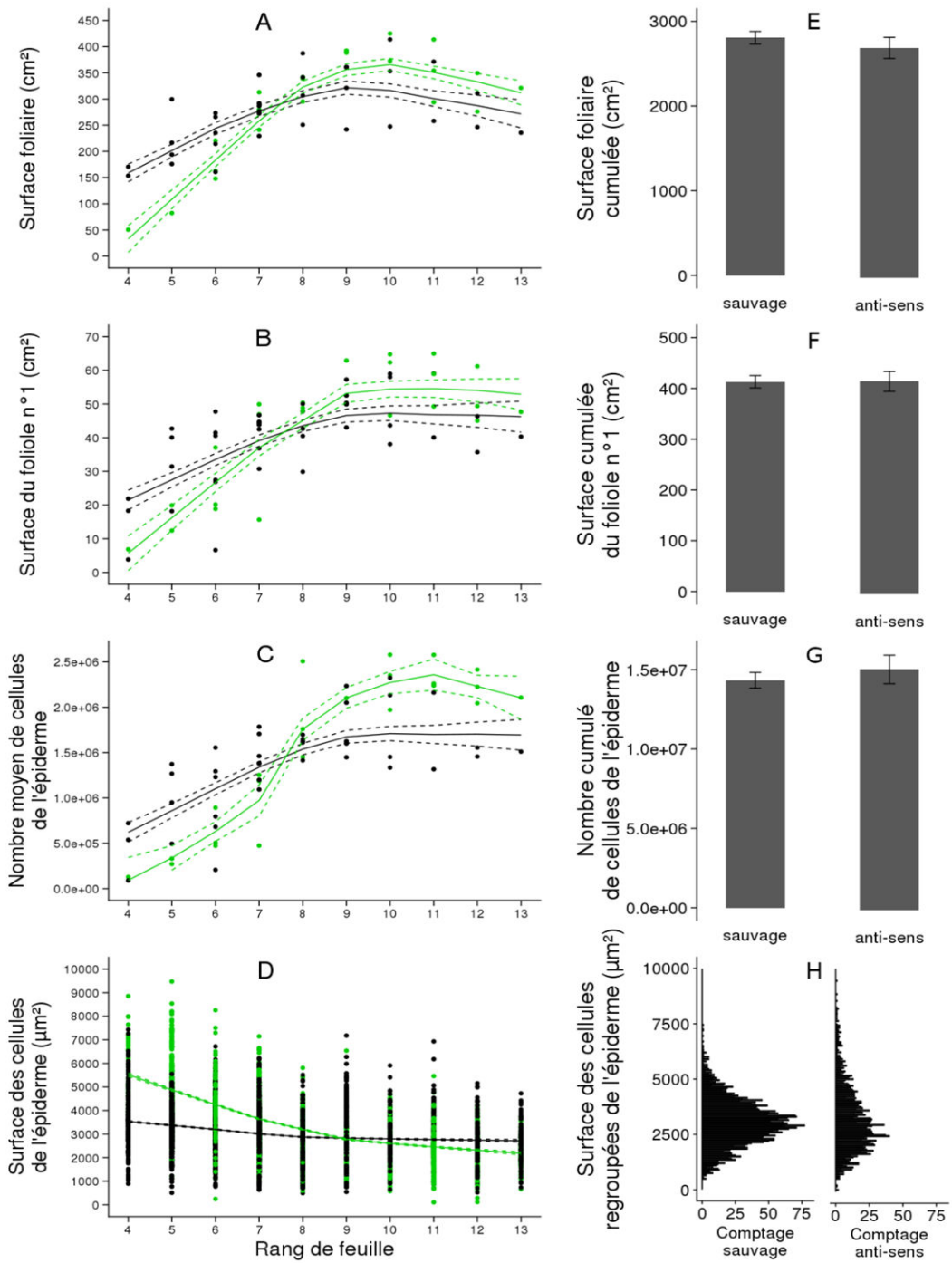


Figure III-6. Distribution du niveau de ploïdie mesuré par cytométrie en flux sur des feuilles matures considérant les feuilles des rangs 4(A), 6(B), 8(C) et 12(D) de la première unité sympodiale de plantes de tomates WVa106 cultivées dans de bonnes conditions d'irrigation. Chaque distribution est obtenue en groupant les distributions obtenues pour 3 plantes différentes. Pour chaque distribution, le pourcentage de noyaux en 2C, 4C, 8C, 16C et 32C est noté sur les distributions.

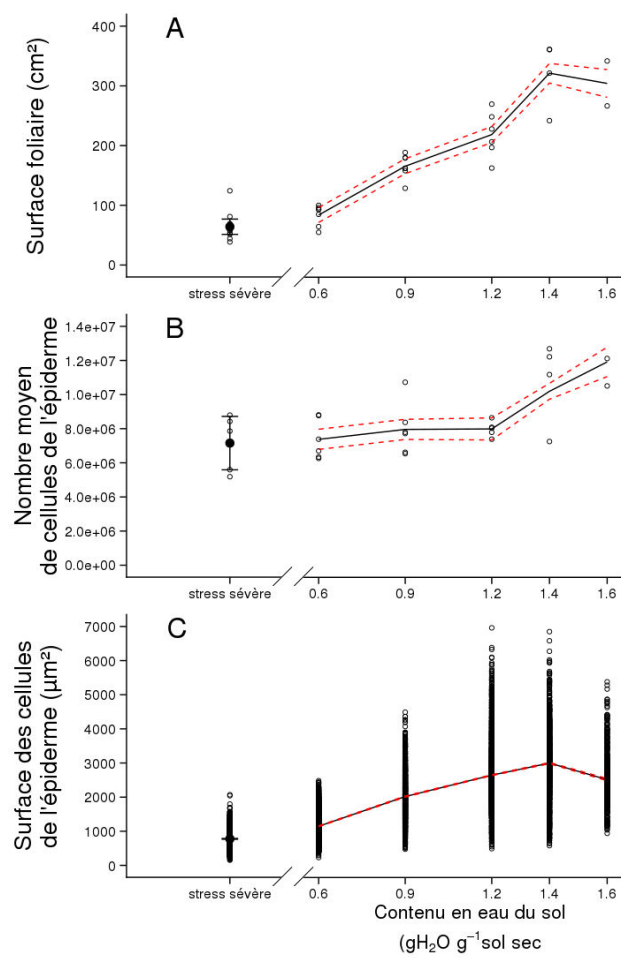
III.3.3 Variations de la surface foliaire finale et traits cellulaires associés de la feuille composée de tomate chez la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS}.

Les traits relatifs à la taille des feuilles ont également été mesurés sur une lignée transgénique, la lignée présentant une perte de fonction du gène *SlCCS52A* (se référer à Pro35S:*Slccs52A*^{AS}; Mathieu-Rivet *et al.*, 2010). Cette lignée a un développement plus lent et produit de plus petites plantes (non décrit ici mais également observé dans cette expérimentation, voir aussi Mathieu-Rivet *et al.*, 2010). Les changements de la surface foliaire totale, de la surface de la foliole 1 et le nombre moyen de cellules épidermiques de la foliole 1 en fonction du rang de feuille le long de la première unité sympodiale ont été comparés entre les lignées WVa106 et Pro35S:*Slccs52A*^{AS} (Figure III.7A-C). Tous les traits étudiés augmentent graduellement avec le rang de feuille jusqu'à une valeur maximale autour de la feuille 9 et diminuent ensuite légèrement ou se stabilisent suivant les traits (Figure 7A-C). Pour les premières feuilles, les valeurs de ces traits sont plus faibles sur la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS} que sur le sauvage. Par exemple, la surface foliaire finale des feuilles 4 atteint $32,8 \pm 26,6 \text{ cm}^2$ chez la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS} tandis qu'elle est de $158,8 \pm 17,5 \text{ cm}^2$ chez le sauvage. La surface finale de la foliole 1 est égale à $5,3 \pm 5,2 \text{ cm}^2$ pour la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS} tandis qu'elle atteint $21,5 \pm 3 \text{ cm}^2$ chez le sauvage. Le nombre moyen de cellules épidermiques de la foliole 1 est réduit d'un facteur supérieur à 6 dans la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS} comparée à la lignée sauvage ($9,2 \cdot 10^4 \pm 2,6 \cdot 10^4$ cellules vs $6,2 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^5$ cellules par foliole respectivement). Dans la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS}, l'augmentation avec le rang de feuille de ces trois traits est plus rapide que dans la lignée sauvage. Après la feuille 8, la surface foliaire, la surface de la foliole 1 et le nombre moyen de cellules épidermiques sont plus grands pour la lignée anti-sens que pour le sauvage (Figure III.7A-C). Lorsque les traits sont considérés à l'échelle de l'unité sympodiale dans sa totalité, la surface foliaire cumulée des feuilles ne diffère pas entre la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS} et la lignée sauvage (Figure III.7E).



De manière similaire, les surfaces de la foliole 1 cumulées et le nombre cumulé de cellules de l'épiderme des folioles 1 de la première unité sympodiale ne diffèrent pas entre les deux lignées (Figure III.7F, G). La surface des cellules de la foliole 1 (Figure III.7D) décroît nettement avec le rang de feuille dans la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS}. Elle ne décroît que faiblement chez le sauvage. Pour les feuilles 4 à 7, la surface des cellules de l'épiderme est plus grande dans la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS} que dans la lignée sauvage. Au-delà de la feuille 10, la surface des cellules est plus faible dans la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS} que dans la lignée sauvage. Quand la distribution des surfaces des cellules de l'épiderme est considérée à l'échelle de la première unité sympodiale, en groupant toutes les cellules des folioles 1, la surface cellulaire moyenne ne diffère pas entre les deux génotypes. En revanche, la distribution est plus dispersée et s'étend vers la droite dans la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS} comparée à la lignée sauvage (Figure III.7H). Comme chez la plante sauvage, la distribution des niveaux de ploïdie des cellules a été mesurée sur les folioles 1 des feuilles de rangs différents chez la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS}. Cependant, les distributions des niveaux de ploïdie contenaient trop de bruits de fond pour en extraire des données quantitatives fiables et en déduire des conclusions robustes. De fait, les résultats ne sont pas présentés ici.

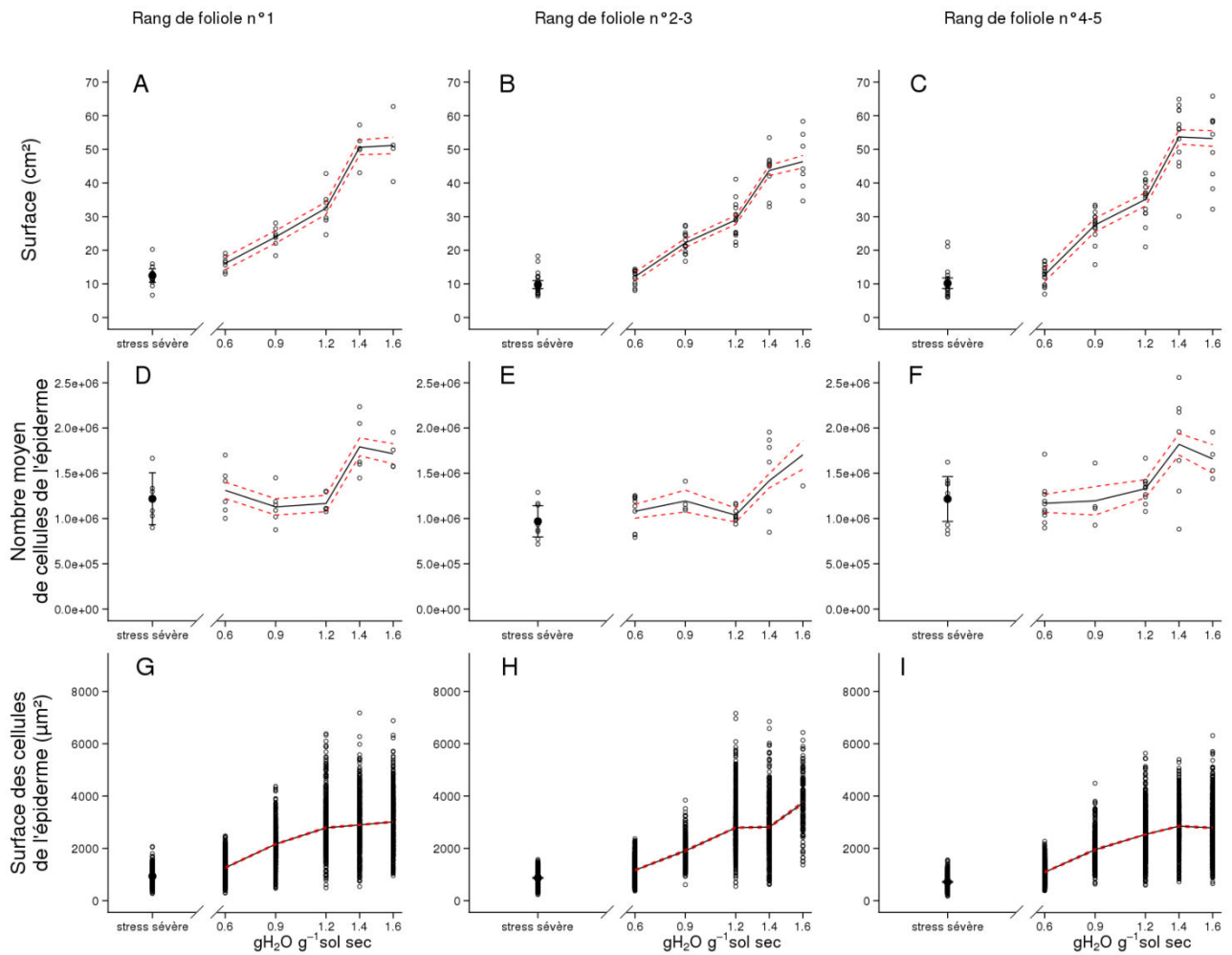
Ces résultats montrent que la perte de fonction de CCS52A altère la valeur absolue des traits relatifs à la taille des feuilles pour chaque rang de feuille; que ce soit pour la surface de la feuille elle-même, la surface de ces folioles, la surface et le nombre de cellules épidermiques. Suivant le rang de feuille considéré, les traits peuvent être augmentés ou diminués par la perte de fonction de ce gène. La progression de la variation de ces traits d'une feuille à l'autre le long de la première unité sympodiale est également affectée par la perte de fonction de CCS52A. Lorsque les traits sont comparés à l'échelle de l'unité sympodiale entière, il n'y a plus de différence entre la lignée anti-sens et la lignée sauvage.



III.3.4 Effet dose du déficit hydrique du sol sur la surface finale des feuilles et les traits cellulaires associés dans la feuille composée de tomate.

Six traitements hydriques du sol ont été imposés aux plantes du génotype sauvage. Les traitements ont démarré lorsque toutes les folioles de la feuille 5 étaient visibles (Figure III.1, Figure II.3). La réponse à la quantité d'eau contenue dans le sol a été étudiée sur la feuille 9, une feuille ayant passé la majorité de la durée de son développement dans la période de stress hydrique. La surface finale de la feuille 9 est maximale pour les deux niveaux de contenu en eau du sol les plus élevés, i.e. 1.6 et 1.4 gH₂O g⁻¹ sol sec (Figure III.8A) et réduite pour les teneurs en eau du sol inférieures (Figure III.8A). De 1.4 à 0.6 gH₂O g⁻¹ sol sec, la surface finale de la feuille 9 est réduite de 321.3 ± 17.1 à 83.9 ± 12.9 cm². La réduction de la surface finale de la feuille 9 induite par le traitement le plus sévère du déficit d'irrigation (voir Figure II. II.2), est comparable à celle induite par le traitement avec une teneur en eau à 0.6 gH₂O g⁻¹ sol sec (Figure III.8A). Ceci est cohérent avec le fait que ces deux traitements ne diffèrent pas durant une grande partie du développement de la feuille 9. Le nombre moyen de cellules de l'épiderme de la feuille 9 est maximal pour le niveau le plus élevé de contenu en eau du sol, i.e. 1.6 gH₂O g⁻¹ sol sec (Figure III.8B). Il décroît avec la réduction de teneur en eau du sol de 1.6 à 1.2 gH₂O g⁻¹ sol sec mais ne décroît pas pour les valeurs plus faibles de teneurs en eau du sol (Figure III.8B). La surface moyenne des cellules de l'épiderme est maximale pour les deux niveaux les plus élevés de teneur en eau du sol (Figure III.8C) et décroît ensuite avec la réduction de la teneur en eau du sol (Figure III.8C). La gamme de surfaces des cellules de l'épiderme est réduite dans les feuilles des plantes ayant grandi aux plus faibles niveaux de teneur en eau du sol (Figure III.8C).

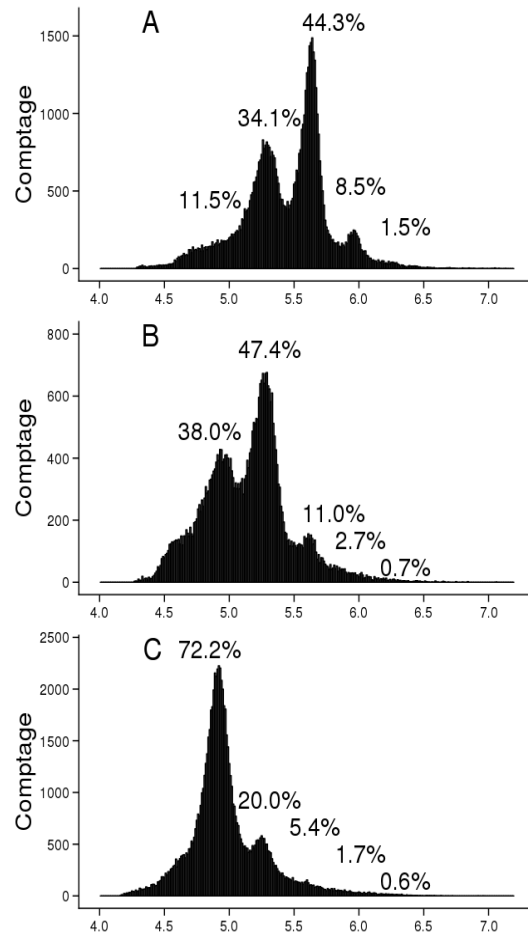
En considérant chaque foliole indépendamment, les effets de la teneur en eau du sol sur tous les traits décrits ici, sont identiques à ceux observés à l'échelle de la feuille entière (Figure III.9).



La réduction de teneur en eau du sol a aussi induit un décalage de la distribution des niveaux de ploïdie dans les cellules de la feuille dans le sens d'une diminution des valeurs (Figure III.10). La plus grande proportion de cellules est retrouvée dans les catégories 8C (44,3%), 4C (47,5%) et 2C (72,2%) respectivement pour la condition bien irriguée, pour un déficit hydrique modéré et pour un déficit hydrique sévère (Figure III.10).

Ces résultats montrent que les effets de la sécheresse du sol sur la surface des feuilles composées de tomate sont liés à la réduction de la surface des folioles individuelles, du nombre de cellules, de la taille des cellules et du niveau d'endoréduplication.

Ici encore, les effets du déficit hydrique reportés à l'échelle de la feuille entière sont les mêmes que ceux observés à l'échelle de la foliole, considérant les différentes folioles qui forment la feuille composée.

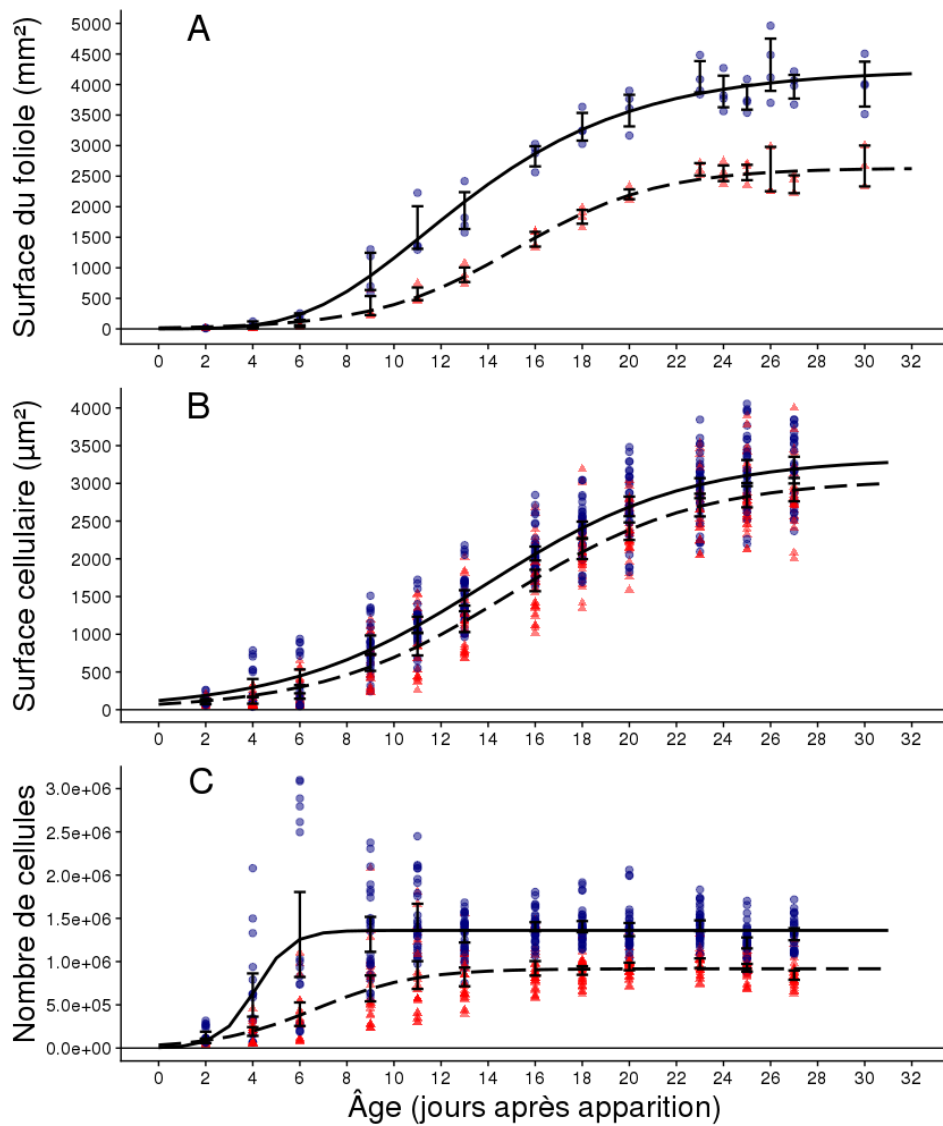


III.3.5 Effet d'un déficit hydrique constant sur la dynamique de croissance de la foliole

Au cours de l'expérimentation C, un traitement de déficit hydrique modéré a été imposé à des plantes de WVa106. Le dessèchement du sol a commencé trois semaines après semis. Toutes les mesures ont été effectuées sur les folioles 2 et 3 de la feuille 13 dont l'émergence est simultanée. Toute la durée de croissance des folioles 2 et 3 de la feuille 13 a eu lieu en condition de déficit hydrique constant.

Le déficit hydrique du sol appliqué affecte la dynamique de mise en place de la surface de la foliole ainsi que la dynamique de mise en place du nombre de cellules mais peu l'expansion cellulaire.

La surface de la foliole (Figure III.11A), la surface moyenne des cellules de l'épiderme (Figure III.11B) et le nombre de cellules épidermique par foliole (Figure III.11C) suivent une courbe de tendance sigmoïdale entre l'émergence de la foliole et la fin de son expansion. En condition bien irriguée, durant les 6 premiers jours, l'expansion de la foliole est lente (Figure III.11A) et cela coïncide avec la faible augmentation de la surface des cellules de l'épiderme que ce soit en condition bien irriguée ou de déficit hydrique constant (Figure III.11B). Dans les deux conditions hydriques, c'est pendant cette phase, par contre, que le nombre de cellules de l'épiderme augmente rapidement (Figure III.11C). Le nombre final de cellules de la foliole est d'ailleurs atteint au bout de 6 jours (Figure III.11C et Tableau III.1). Le déficit hydrique affecte à la fois les dynamiques de division cellulaire et expansion cellulaire (Figure III.11 B, C). Le nombre final de cellules par foliole est atteint plus tardivement en condition de contrainte hydrique (Figure III.11C et Tableau III.1).



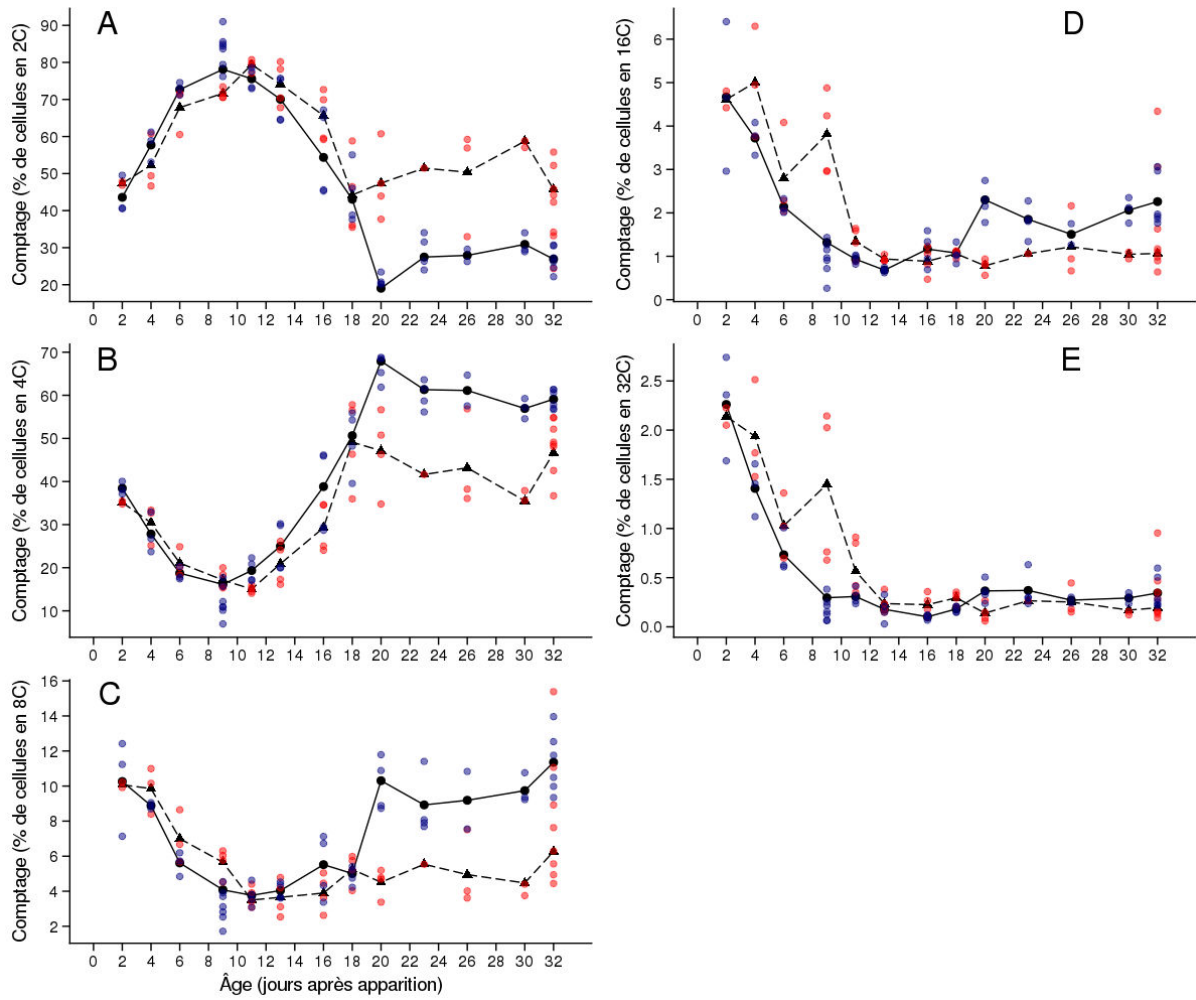
Le déficit hydrique du sol réduit la proportion de cellules endorédupliées.

Pendant une première phase qui dure entre 8 et 10 jours, la proportion de cellules en 2C augmente (passe de 40 à 80%) alors que les proportions de cellules en 4C et 8C diminuent dans la foliole (passent de 40 à 20% et de 10 à 4% respectivement) que ce soit pour des plantes en conditions bien irriguées ou en déficit hydrique du sol (Figure III.13). Les proportions de cellules en 16C et 32C diminuent également pendant cette phase mais partent de niveau faible (respectivement 5% et 2% dès les premières dates de mesures sans différence entre les deux traitements hydriques). Entre 10 et 20 jours après émergence de la foliole, la proportion de cellules en 2C diminue chez les plantes bien irriguées pour atteindre un plateau à 30%. La tendance est la même mais le plateau est atteint plus tôt pour les folioles de plantes en contrainte hydrique du sol qui au final, 18 jours après leur émergence, ont 50% des cellules en 2C. Dans les folioles de plantes bien irriguées, les proportions de cellules en 4C et 8C augmentent pour atteindre à 20 jours un plateau à 60% et 10 % respectivement.

En condition de stress hydrique, les tendances sont les mêmes mais les plateaux sont atteints systématiquement 2 jours plus tôt et atteignent 40 et 5 % respectivement. Le déficit hydrique réduit donc la durée de la phase pendant laquelle il y a de l'endoréduplication.

Globalement, que ce soit en condition bien irriguée ou en condition de déficit hydrique du sol :

- Il a y des cellules endorédupliées très tôt dans le développement de la feuille comme en témoigne la présence de cellules en 8C, 16C et 32C dès les premières mesures et ce processus cohabite donc avec le processus de division cellulaire;
- Le processus d'endoréduplication cesse avant la fin de l'expansion cellulaire (26 jours).



A maturité de la foliole, lorsque les proportions des populations cellulaires sont stables, le pourcentage de la population de cellules en 2C de la foliole développée en condition de déficit hydrique du sol est plus élevé que le pourcentage de la population de cellules en 2C de la foliole développée en condition bien irriguée (Figure III.12A). En revanche, les pourcentages des populations de cellules en 4C (Figure III.12B), 8C (Figure III.12C), 16C (Figure III.12D) et 32C (Figure III.12E), de la foliole développée en condition de déficit hydrique du sol sont plus faibles que les pourcentages des populations de cellules en 2C de la foliole développée en condition bien irriguée.

Les résultats montrent que le déficit hydrique du sol constant imposé durant tout le développement de la foliole impacte plus la prolifération cellulaire que l'expansion cellulaire. (Figure III.12D). Le pourcentage de cellules endorédupliées est diminué par ce déficit hydrique.

Ils montrent aussi que la durée de la phase de division cellulaire est augmentée par le déficit hydrique du sol imposé, alors que la phase pendant laquelle se produit l'endoréduplication est diminuée. Quel que soit le traitement hydrique, il existe une phase de développement pendant laquelle il y a de l'expansion cellulaire sans endoréduplication.

Tableau III-1. Tableau regroupant les valeurs calculées à partir des courbes ajustées de surface de la foliole et surface cellulaire moyenne de l'épiderme, et nombre moyen de cellule.

	Plantes bien irriguées	Plantes en déficit d'irrigation
Surface finale d'une foliole (mm ²)	4032,3	2500,9
Vitesse maximum d'expansion (mm ² j ⁻¹)	312,0	218,8
Durée d'expansion (j)	26,2	24,1
Surface cellulaire moyenne finale (µm ²)	3169,7	2887,8
Vitesse maximum d'expansion cellulaire (µm ² j ⁻¹)	196,1	189,5
Durée de la phase d'expansion cellulaire (j)	26,5	26,7
Nombre final de cellules par foliole	1 292 709	871 201,2
Vitesse maximum de division cellulaire (nombre de cellules j ⁻¹)	450 751,5	109 841,3
Durée de la phase de division cellulaire (j)	6,3	12,9

III-4 DISCUSSION DE LA PARTIE III

III.4.1 Les variations de surface des feuilles, des folioles, et des traits relatifs à la taille des cellules supportent l'hypothèse que les folioles partagent des propriétés cellulaires communes.

La taille, la forme et, les traits relatifs à la morphologie changent le long de la plante. Les variations de ces traits avec le rang de feuille peuvent être graduelles ou plus abruptes, suivant le trait considéré, les conditions environnementales et le génotype (Zotz *et al.*, 2011). Dans tous les cas, les feuilles d'une plante peuvent être groupées en classes successives qui partagent des propriétés phénotypiques comme l'absence ou la présence de trichomes (Hunter *et al.*, 2003), ou un ensemble de propriétés développementales (Lièvre *et al.*, 2016). Dans les feuilles simples, comme celles d'*Arabidopsis thaliana*, celles du tabac ou celles du pois, les traits morphologiques comme le changement de surface foliaire avec le rang de feuille, sont accompagnés par des changements des traits cellulaires. L'augmentation de surface foliaire avec le rang de feuille est systématiquement associée à une augmentation du nombre de cellules de l'épiderme, tandis que la surface cellulaire des cellules de l'épiderme est seulement légèrement réduite ou inchangée (Granier *et al.*, 2000; Cookson *et al.*, 2007). Ceci a été montré chez des espèces à feuilles simples et est maintenant décrit ici pour les feuilles composées de tomate le long de la première unité sympodiale de la lignée sauvage WVA106 cultivées dans de bonnes conditions d'irrigation. La progression de l'hétéroblastie des traits étudiés, i.e. les changements relatifs de la surface des feuilles, du nombre de cellules de l'épiderme et de la surface des cellules de l'épiderme d'une feuille à l'autre, est analogue à la progression reportée pour les plantes Col-0 d'*Arabidopsis thaliana* pour les mêmes traits

(Cookson *et al.*, 2007; Lièvre *et al.*, 2016). Chez la tomate, nous n'avons trouvé aucun changement du niveau d'endoréduplication avec le rang de feuille.

Considérant les folioles d'une feuille individuellement, il est possible de montrer que les 7 folioles individuelles d'une même feuille partagent les mêmes propriétés, en termes de surface cellulaire, de surface foliaire, de nombre de cellules de l'épiderme et de niveau d'endoréduplication. Cela supporte la théorie selon laquelle les folioles sont des subdivisions de la feuille qu'elles composent (Kaplan, 1975). Ce résultat est important, dès lors, une foliole peut être utilisée pour représenter la feuille entière pour les études de phénotypage de la croissance des feuilles, au moins chez la tomate, simplifiant ainsi le cadre d'analyse. La robustesse de ces résultats est montrée ici pour différentes feuilles d'une plante, en comparant deux génotypes avec des développements foliaires différents et, des plantes ayant grandi en condition de déficits hydriques du sol de différentes intensités.

III.4.2 Contributions du nombre et de la taille de cellules de l'épiderme à la plasticité de surface de la feuille composée de la tomate : qu'en est-il des mécanismes de compensation décrits sur les feuilles simples ?

Les changements quasi-parallèles de la surface foliaire et du nombre de cellules de l'épiderme le long de la tige observés pour les feuilles simples sont reportés ici pour les feuilles composées de deux génotypes différents de tomate. Ce résultat est cohérent avec la théorie selon laquelle le développement de la feuille pourrait être piloté par les processus associés au cycle cellulaire. Les cellules peuvent être accumulées par des divisions qui ont lieu dans des régions particulières de la feuille. Elles peuvent déterminer la forme et la taille finale de la feuille par expansion (Fleming, 2007). Les traitements de déficit hydrique du sol appliqués

dans notre expérimentation supportent aussi ce point de vue. Les déficits hydriques ont été appliqués ici pendant toute la durée du développement de la feuille. Ils ont réduit à la fois le nombre de cellules produites par division et leur expansion comme déjà montré sur *Arabidopsis thaliana* et le colza oléagineux (Baerenfaller *et al.*, 2011; Dambreville *et al.*, 2017). Durant les 20 dernières années, cette vision de la croissance des organes des plantes a été mise en cause par les observations de phénomènes de compensation de la morphogénèse des feuilles, i.e. un accroissement anormal du volume cellulaire provoqué par une diminution du nombre de cellules. Cela suggère l'existence de systèmes d'intégration liant les taux de prolifération cellulaire et d'expansion cellulaire (Tsukaya, 2002; Ferjani *et al.*, 2007). De plus, un autre type de compensation a été décrit, i.e. une augmentation de la prolifération cellulaire causée par une déficience d'expansion cellulaire (Usami *et al.*, 2009) et associée aux changements de phase du développement à l'échelle de la plante (Hisanaga *et al.*, 2015). Les deux types de compensations entre le nombre de cellules et leur taille ont été observés dans cette étude dans deux contextes différents.

- (1) Les changements des composantes cellulaires de la feuille le long de la première unité sympodiale (liés à l'hétéroblastie). Dans ce contexte, l'augmentation du nombre de cellules est accompagnée par une diminution de la taille des cellules pour les premières feuilles de l'unité sympodiale. Pour les feuilles les plus hautes, le nombre et la taille des cellules ne varient plus avec le rang de feuille.

- (2) La perte de fonction du gène SICCS52A entraîne une diminution du nombre de cellules de l'épiderme des feuilles pour les premières feuilles de l'unité sympodiale; accompagnée d'une augmentation de la surface des cellules de l'épiderme dans ces mêmes feuilles tandis que l'inverse est observé dans les zones les plus hautes.

Une « balance » totale entre le nombre et la taille des cellules conduirait à l'absence de variation de la surface foliaire le long de la première unité sympodiale et/ou entre les génotypes. A l'échelle de la feuille, la variabilité spatiale de la surface finale le long de la première unité sympodiale et/ou la variabilité génétique observées lors de la comparaison de la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS} avec le sauvage reflètent que les balances observées sont partielles dans cette étude.

Etonnamment, les résultats mettent en avant une compensation totale à l'échelle de l'unité sympodiale entière lorsque l'on compare les traits phénotypiques entre les lignées Pro35S:*Slccs52A*^{AS} et sauvage. Il a été constaté précédemment que la lignée transgénique avait une vitesse de développement plus faible à l'échelle de la plante entière et des plus petits fruits (Mathieu-Rivet *et al.*, 2010). Le ralentissement de la vitesse de développement aérien a été observé durant cette expérimentation (non montré). La comparaison des traits relatifs à la surface des feuilles est difficile à interpréter. Elle dépend du rang de feuille. Pour chaque trait, le changement d'une feuille à la feuille supérieure est plus pentu dans la lignée Pro35S:*Slccs52A*^{AS} que dans la lignée sauvage, i.e. la surface des feuilles et le nombre de cellules de l'épiderme augmentent avec une pente plus élevée, tandis que la surface des cellules de l'épiderme diminue avec une pente plus forte. Finalement, à l'échelle de l'unité sympodiale, les deux génotypes atteignent la même surface de feuille cumulée, la même surface et le même nombre de cellules de l'épiderme. Quelques études ont suggéré que les traits relatifs à la taille des feuilles à l'échelle de la feuille sont contrôlés à l'échelle de la plante entière. La relation négative entre le nombre de feuilles produites par une plante déterminée et le nombre de cellules de l'épiderme par feuille ont été constatées sur des lignées recombinantes d'*Aegilops tauschii* et *Arabidopsis thaliana* (Ter Steege *et al.*, 2005; Tisné *et al.*, 2008). A notre connaissance, les données présentées ici sont les premières cumulant les traits des différentes feuilles. Il est possible que la compensation apparaisse dans d'autres

études. Cependant, cela n'a pas pu être prouvé du fait de l'absence de mesures sur toutes les feuilles le long de la tige.

III.4.3 Une preuve supplémentaire d'absence de lien direct entre l'augmentation du niveau de ploïdie dépendant de l'endoréduplication et l'augmentation de l'expansion cellulaire.

L'augmentation de la taille des cellules dans les plantes déterminées résulte de deux processus indépendants : La croissance cellulaire, augmentation de la masse totale de molécules dans le cytoplasme, et l'expansion cellulaire, augmentation du volume cellulaire par vacuolisation (Breuer *et al.*, 2010). Les noyaux de ploïdie élevée (résultant de l'endoréduplication) sont souvent associés à une augmentation de la taille des cellules *via* l'augmentation de la croissance cellulaire (Sugimoto-Shirasu et Roberts 2003; Lee *et al.*, 2004). Dans cette étude, la taille des cellules est modifiée par le rang de feuille le long de la première unité sympodiale comme montré précédemment pour des plantes à feuilles simples (Ashby, 1948; Granier et Tardieu, 1998, Cookson *et al.*, 2007; Tisné *et al.*, 2011). Cependant, la distribution des niveaux de ploïdie des cellules ne change pas d'un rang de feuille à l'autre le long de la première unité sympodiale. Par contre, l'application de déficits hydriques, qu'il soit modéré ou sévère entraîne ici la diminution systématique de la taille des cellules avec un décalage du niveau de ploïdie vers des valeurs plus faibles comme déjà constaté pour de nombreux facteurs environnementaux (Scholes et Paige, 2015). En fin de compte, nos résultats présentent une nouvelle preuve que la relation entre le niveau de ploïdie et l'expansion des cellules n'est pas direct et que les deux processus peuvent, dans une certaine mesure, être découplés (Tsukaya, 2013; Tsukaya, 2014). Ils sont également découplés dans le temps

puisque (1) le processus d'endoréduplication a lieu dans la foliole avant la phase d'expansion rapide des cellules comme en témoigne la forte proportion de cellules en 8C dès l'émergence de la foliole et (2) la fin d'expansion de la foliole a lieu avec une forte expansion cellulaire sans augmentation du niveau de ploïdie des cellules.

III.4.4 Découplage de l'expansion foliaire et des divisions cellulaires dans la réponse de la croissance de la foliole à une contrainte hydrique du sol.

Chez de nombreuses espèces, la réduction de la surface foliaire en condition de déficit hydrique du sol a été analysée en considérant la dynamique d'expansion de la feuille et celle des processus cellulaires sous-jacents, i.e., vitesse de division cellulaire et d'expansion cellulaire ainsi que leurs durées respectives (Durand *et al.* 1995 chez la luzerne; Lecoeur *et al.*, 1995 chez le pois; Ben Haj Salah et Tardieu 1997 chez le maïs). De nombreux travaux ont montré que la réduction de vitesse d'expansion foliaire causée par un stress hydrique s'accompagnait d'une réduction de la vitesse de division cellulaire (Granier et Tardieu 1999 chez le tournesol; Granier, Inzé et Tardieu 2000 chez le maïs; Baerenfaller *et al.*, 2012 chez *Arabidopsis thaliana*). C'est ce que nous retrouvons ici dans la foliole de tomate (Figure III.12). En revanche, les effets du déficit hydrique sur la durée de l'expansion foliaire et la taille des cellules ne sont pas cohérents d'une étude à l'autre et semblent dépendre fortement du scénario de stress imposé, i.e., son intensité, sa durée et sa position par rapport au développement de l'organe (Rawson et Turner 1982; Granier et Tardieu 1999). Ici, la durée de l'expansion de la foliole est réduite de deux jours par le déficit hydrique du sol (sur une durée totale de 26 jours) alors que la phase de division cellulaire des cellules de l'épiderme de la foliole est rallongée lorsque les plantes sont cultivées en condition de déficit hydrique du

sol (13 jours au lieu de 6; Figure III.12) indiquant une phase plus longue de chevauchement des deux processus de division et d'expansion.

III.4.5 Les cinétiques de croissance des traits cellulaires relatifs à la croissance d'une foliole de tomate sont comparables aux cinétiques de croissance de la feuille d'*Arabidopsis thaliana*.

Les cinétiques de croissance de la surface de la foliole, de la surface cellulaire moyenne de l'épiderme de la foliole et du nombre de cellules par épiderme supérieur de foliole sont similaires à celles observées sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Figure III.13).

Les positions des différentes phases de division cellulaire, expansion cellulaire et croissance foliaire les unes par rapport aux autres dans le temps sont similaires entre la foliole de tomate et la feuille d'*Arabidopsis thaliana*.

La phase de division cellulaire intense a lieu au début de l'expansion de la foliole. Chez la tomate, la vitesse d'expansion de la foliole accélère après la phase d'intense prolifération cellulaire. L'expansion cellulaire accélère à la fin de la phase d'intense prolifération cellulaire et se poursuit jusqu'à la fin de l'expansion de la foliole. Par contre, les cinétiques des proportions de cellules des différents niveaux de ploïdie sont différentes dans les fractions de cellules des niveaux de ploïdie les plus élevés (8C, 16C, 32C et 64C). Il apparaît que des cellules endorédupliquées sont présentes en début de croissance dans la foliole de tomate (Figure III.13). Le processus d'endoréduplication commence donc très tôt chez la tomate et cesse avant la fin de l'expansion cellulaire. Chez *Arabidopsis*, le processus d'endoréduplication est absent en début de croissance et une augmentation des proportions de

populations cellulaires en 8C et 16C s'effectue plus tardivement et jusqu'à la fin de l'expansion cellulaire (Figure II.13).

Les effets du stress hydrique sur les cinétiques de croissance de la foliole sont semblables aux observations faites sur la feuille d'*Arabidopsis thaliana* (Baerenfaller *et al.*, 2012). Il n'existe cependant pas de cinétiques de croissance des proportions des différentes populations de cellules des différents niveaux de ploïdie dans la feuille en condition de déficit hydrique.

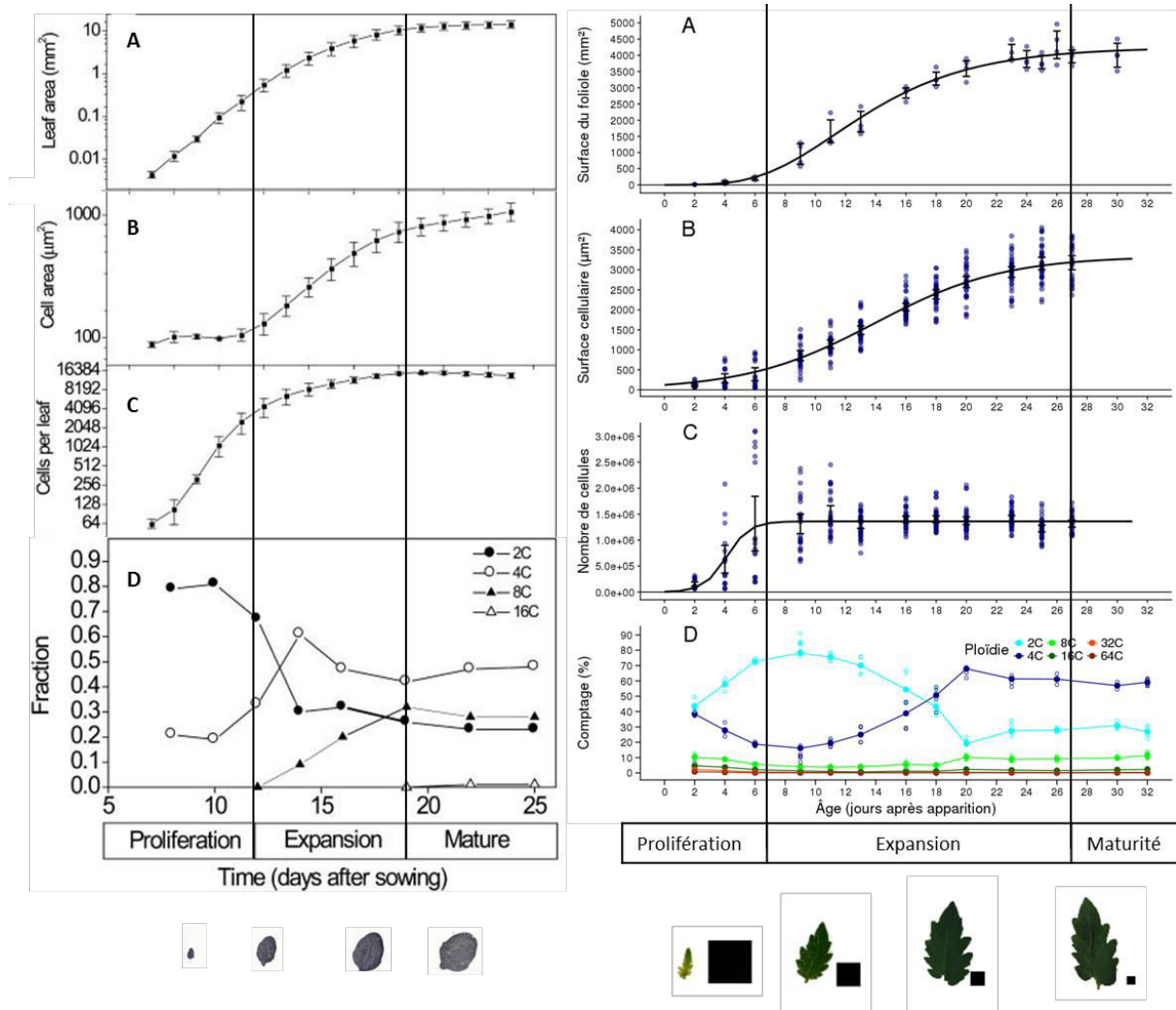


Figure III-13. Cinétiques d'expansion foliaire et des traits cellulaires sous-jacents chez *Arabidopsis thaliana* (à gauche) (d'après Beemster *et al.*, 2005) et d'expansion de la foliole et des traits cellulaires sous-jacents chez la tomate cerise (à droite).

III-5 CONCLUSIONS DE LA PARTIE III

Comparer la progression de la surface finale des feuilles, du nombre et de la taille des cellules de l'épiderme le long de la première unité sympodiale de deux génotypes de tomate, a permis de révéler des processus de compensation entre le nombre et la surface des cellules de l'épiderme. Ces compensations ne sont pas seulement associées au développement individuel de chaque feuille mais aussi au développement de la plante entière comme suggéré pour des plantes à feuilles simples (Massonnet *et al.*, 2011). La distribution de l'endoréduplication ne varie pas entre les feuilles. Cela montre que l'endoréduplication est, dans une certaine mesure, découplée de l'expansion cellulaire, comme pour les feuilles simples (Tsukaya, 2014). Contrairement aux gradients constatés le long de la tige pour les différents traits étudiés ici, les différentes folioles le long du rachis d'une même feuille sont identiques en termes de surface foliaire finale, de nombre et de taille des cellules de l'épiderme et de distribution de l'endoréduplication. Ceci suggère qu'ils partagent des propriétés communes et sont représentatifs de la feuille dont ils font partie. Les folioles peuvent donc être utilisées individuellement, au moins chez la tomate, dans un objectif de phénotypage et c'est ce que nous avons fait ici pour l'analyse dynamique multi-échelles du développement de la feuille. Cette analyse a mis en évidence que le processus d'endoréduplication était très précoce dans le développement de la feuille et elle a montré que le processus était découplé dans le temps du processus d'élongation cellulaire.

**PARTIE IV : ANALYSE MULTI-ÉCHELLE DE LA
DYNAMIQUE DE CROISSANCE DU FRUIT ET DE SA
PLASTICITÉ CHEZ LA TOMATE**

IV-1 INTRODUCTION DE LA PARTIE IV

Le fruit charnu de la tomate est composé de différents tissus : l'épiderme, le péricarpe (partie charnue), le placenta et le tissu loculaire incluant les graines (aussi appelé pulpe). L'augmentation du volume du fruit est la résultante des restrictions biophysiques de l'extensibilité de l'épiderme (Thompson, 2001) et du développement du péricarpe, tissu qui constitue généralement plus des deux tiers du poids total du fruit (Ho et Hewitt, 1986). La taille et la forme finales des fruits résultent des coordinations spatiales et temporelles des cinétiques de prolifération, d'expansion et de différenciation cellulaires. Chez la tomate, après fécondation, la division cellulaire est activée dans l'ovaire et continue pendant 7 à 25 jours selon les génotypes (Mapelli *et al.*, 1978; Varga et Bruinsma, 1986; Bohner et Bangerth, 1988a ; Bertin *et al.*, 2007). Après fécondation, le développement précoce du fruit est communément divisé en deux phases : une première phase durant laquelle les divisions cellulaires sont très actives et le péricarpe se développe en multiples couches cellulaires et, une seconde phase d'expansion cellulaire durant laquelle les divisions et expansions cellulaires se produisent simultanément jusqu'à ce que l'activité de prolifération soit nulle et que toutes les cellules grandissent jusqu'à atteindre leur volume final (Gillaspy *et al.*, 1993).

A la fois les activités de division et d'expansion des cellules du péricarpe sont donc déterminantes pour la croissance du fruit. L'activité de division cellulaire dans les cellules du péricarpe est toutefois limitée à une courte période et une fois les divisions cellulaires terminées, l'expansion cellulaire devient le facteur dominant de l'augmentation de la taille du fruit. En effet, comme le processus d'expansion des cellules dure plus longtemps, il a un effet plus grand que la division cellulaire sur la croissance du péricarpe (Renaudin *et al.*, 2017).

Par ailleurs, chez la tomate, de grandes cellules endorédupliquées sont localisées dans le mésocarpe (partie centrale du péricarpe) (Figure IV.1 ; Bourdon *et al.*, 2011).

Le nombre final et la taille finale des cellules contribuent tous deux au contrôle de la taille et de la masse finales du fruit (Bertin *et al.*, 2002). Chez de nombreuses espèces telles que l'avocat, le melon, ou la banane, une petite taille de fruit, qu'elle soit causée par un facteur environnemental ou génétique, est liée au contraire essentiellement à une diminution du nombre de cellules (Cowan *et al.*, 1997; Higashi *et al.*, 1999; Jullien *et al.*, 2001). Chez la tomate, au sein d'une même inflorescence, il existe des différences de taille de fruit entre les fruits à la base et à la pointe et ces différences sont attribuées à des différences de nombre de cellules (Bünger-Kibler et Bangerth, 1983; Bohner et Bangerth, 1988a; Ho, 1996a). Certaines études suggèrent également l'existence d'un lien direct entre l'endoréduplication et la taille du fruit (Bünger-Kibler et Bangerth, 1983; Bourdon *et al.*, 2011) ou l'expansion cellulaire car une relation positive entre endoréduplication et taille des cellules est souvent observée sur des cellules de l'épiderme de la feuille d'*Arabidopsis* (Melaragno *et al.*, 1993) ainsi que dans le péricarpe du fruit chez la tomate (Bourdon *et al.*, 2011). Toutefois, l'existence d'une relation directe entre endoréduplication et taille des cellules est également remise en cause par certaines études (Boudolf *et al.*, 2004; Tsukaya, 2013).

Le déficit hydrique du sol ou d'autres stress abiotiques affectent à la fois l'intensité et la durée des processus de division, d'expansion et d'endoréduplication des cellules. Toutefois, il n'existe pas de consensus clair sur les interactions entre ces différents processus et la question reste entière de savoir « qui pilote qui » au cours du développement de l'organe et lors de sa plasticité (Massonnet *et al.*, 2011).

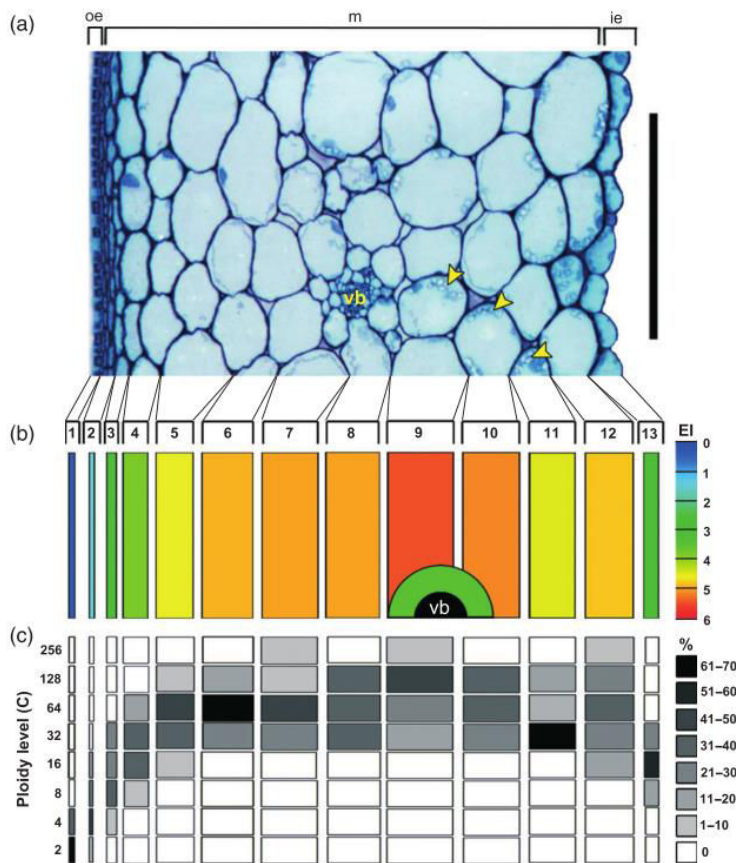


Figure IV-1. Cartographie de la ploïdie du fruit vert mature de la tomate.

(a) Section du péricarpe de fruit vert mature.

(b) Distribution de l'index d'endoréduplication (EI) de chaque assise cellulaire.

(c) Niveau de ploïdie représentatif de chaque assise cellulaire.

(Bourdon *et al.*, 2011)

Les modèles sont des outils très efficaces pour intégrer les connaissances en biologie et comprendre les interactions entre les processus de structures complexes (Génard *et al.*, 2007). Pour cela, modéliser les connaissances et données acquises sur les processus de division, expansion cellulaire et endoréduplication pourrait permettre de mieux comprendre leur influence sur les traits morphologiques, leur interaction et leur plasticité en réponse aux variations environnementales et aux facteurs génétiques. Il existe des modèles de division cellulaire dans le fruit (Dale, 1976; Thornley, 1981; Bertin *et al.*, 2003; Bertin *et al.*, 2007) et des modèles concernant la croissance du fruit à des stades tardifs (phase d'expansion cellulaire) (Fishman et Génard, 1998; Liu *et al.*, 2007). Afin de mieux intégrer les échelles cellule-organe, un modèle de développement du fruit intègre les processus de division et

d'expansion cellulaires supposant que la division pilote la croissance (Baldazzi *et al.*, 2013). Ce modèle permet ainsi d'analyser de manière virtuelle les conséquences de stress abiotiques au sein des populations de cellules. Le modèle prend en compte les changements qui ont lieu lors de la phase précoce de développement du fruit, et intègre deux modèles : un modèle de prolifération (Bertin *et al.*, 2003) et un modèle d'expansion cellulaire (Fishman et Génard 1998; Liu *et al.*, 2007). L'adaptation de la plante est prise en compte d'une façon indirecte, via l'ajustement de son potentiel hydrique et de la concentration en carbone dans la sève, qui déterminent les ressources disponibles pour la croissance du fruit. Des simulations permettent ainsi d'étudier l'impact de déficits en eau et en carbone sur les flux de nutriments et, les effets sur le développement du fruit chez la tomate (Baldazzi *et al.*, 2013). Ce modèle fruit est basé sur deux autres modèles qui ont été construits à partir de jeux données biologiques partiels provenant de différentes expérimentations.

L'objectif de ce dernier chapitre de ma thèse était de mieux comprendre les interactions entre les différents processus cellulaires participant à la croissance du fruit en réponse au déficit hydrique. Comme nous l'avons fait sur la feuille dans le chapitre précédent, les cinétiques des principaux processus impliqués dans la croissance du fruit, i.e, évolutions du nombre de cellules, de la taille des cellules et du processus d'endoréduplication, ont été analysées chez le génotype sauvage de tomate cerise (WVA106) et une lignée transgénique affectée sur le processus d'endoréduplication spécifiquement dans le fruit (promoteur spécifique). Pour cela les traits ont été mesurés aux différentes échelles sur des fruits d'âge variables entre les stades pré-anthèse et maturité. Deux méthodes de mesures des traits relatifs au nombre et à la taille des cellules ont été utilisées afin d'obtenir des données sur des fruits très jeunes (de -2 à 10 jours après anthèse) et de stades plus tardifs (jusqu'à 33 jours après anthèse). Pour des raisons méthodologiques, il n'était pas possible d'utiliser la même technique à la fois sur les phases

précoces et tardives du développement du fruit. La première méthode basée sur des techniques d'histologie est plus appropriée à la mesure sur jeunes fruits et, la seconde utilisant des pratiques d'enzymologie est plus appropriée aux mesures sur des fruits à des stades de croissance plus avancés. Les résultats obtenus ont soulevé la difficulté de combiner ces deux techniques pour établir une cinétique en révélant une disparité entre les résultats obtenus. De ce fait, dans ce chapitre, les cinétiques de croissance du fruit aux différentes échelles sont analysés de manière essentiellement qualitative pour analyser les effets du déficit hydrique sur les stades précoces de développement (pour lesquels il y a très peu de points de cinétique), puis de manière quantitative sur la fin de croissance. Des études sont en cours pour comprendre la divergence entre les deux méthodes.

IV-2 MATÉRIEL ET MÉTHODES DE LA PARTIE IV

Les données présentées dans ce chapitre sont issues de deux expérimentations, les expérimentations B et C (voir Tableau I.1).

IV.2.1 Matériel végétal

Lors de l'expérimentation B déjà décrite dans les parties précédentes, deux génotypes ont été cultivés en serre à Avignon. Le génotype sauvage WVA106 et une lignée transgénique ProPEPc2 :SICCS52A OE générée au sein de l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie de l'INRA de Bordeaux. Pour obtenir ce génotype transgénique, la lignée sauvage WVA 106 de tomate cerise a été modifiée au niveau de l'expression d'un gène du cycle cellulaire, à savoir le gène CCS52A (Figure IV.2). La protéine CCS52A est un activateur de l'APC (Anaphase Promoting Complex). La lignée transgénique ProPEPc2 :SICCS52A OE a été obtenue selon le protocole de transformation décrit dans Mathieu Rivet *et al.*, 2010 (construction du plasmide représentée dans l'annexe 5). Le promoteur de tomate PhosphoEnolPyruvate Carboxylase 2 (PEPC2) (Fernandez *et al.*, 2009) est spécifiquement et fortement exprimé dans les cellules en expansion du mésocarpe durant la phase précoce de développement du fruit (Nafati *et al.*, 2011; Guillet *et al.*, 2012). Les plantes de la lignée transgénique ProPEPc2 :SICCS52A OE sur-expriment le gène CCS52A (Figure IV.2) dans le mésocarpe du fruit entraînant une augmentation des niveaux de ploïdie du fruit (Chevalier *et al.*, 2011). Cette augmentation du niveau de ploïdie se traduit par une augmentation de la taille du fruit par rapport à la taille du fruit de la lignée sauvage WVA 106 (Chevalier *et al.*, 2011).

Lors de l'expérimentation C, seul le génotype sauvage de la lignée West Virginia 106 (WVA 106) a été cultivé en pot.

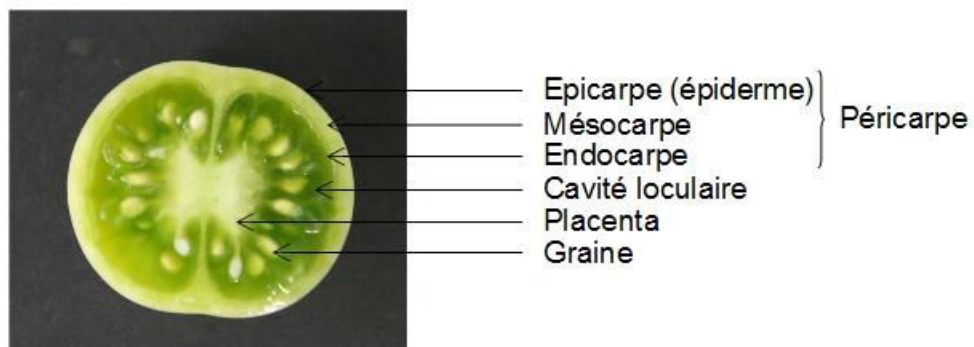
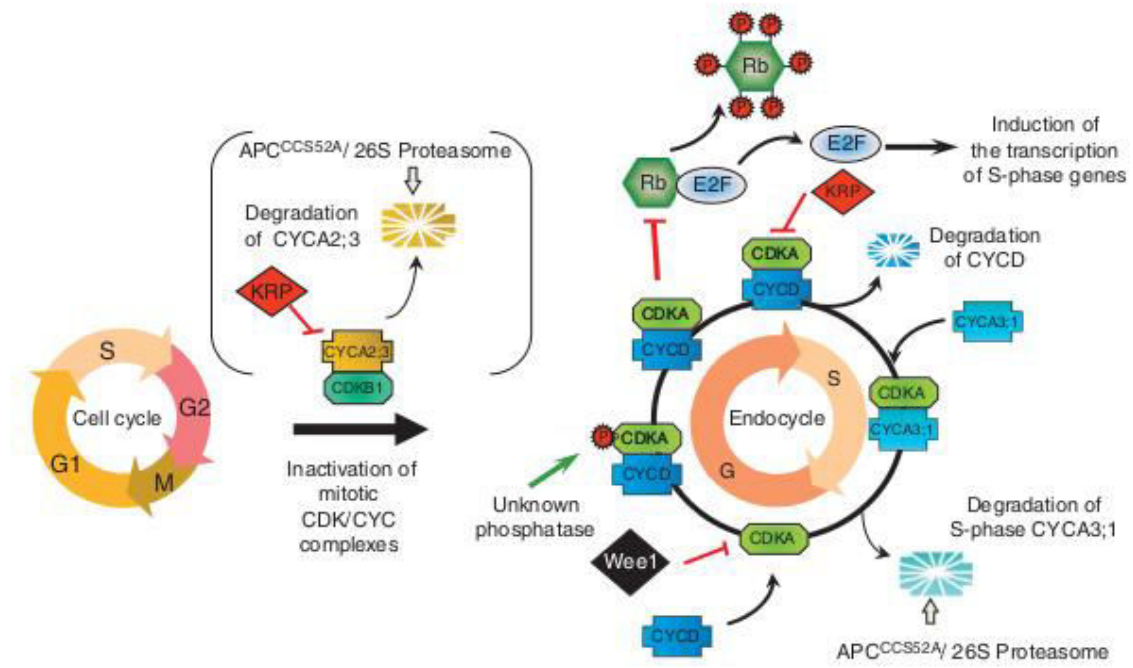


Figure IV-3. Coupe transversale de fruit de tomate au stade vert mature.

IV.2.2 Semis et pré-culture des plantules

Lors de l'expérimentation B, 105 graines de tomate cerise (*Solanum lycopersicum*) WVA 106 et 60 graines de la lignée transgénique PEPC2 :Slccs52A OE ont été stérilisées puis semées sur milieu gélosé (protocole décrit dans la partie II, II.2.A). Les boîtes de culture ont été posées dans une chambre de culture pendant 14 jours à 20°C la nuit et 25 °C le jour. Les plantules ont été transplantées des boîtes de gélose vers le sol dans 35 petits pots de terreau 14 jours après semis. Elles sont restées 14 jours en chambre de culture, dans les mêmes conditions d'éclairage et de températures jour/nuit que lorsqu'elles étaient en boîte de culture. Elles ont ensuite été placées 12 jours en serre, à partir du 26 avril. La température était consignée à 22°C de jour et 16°C la nuit. Les plantules ont été repiquées dans des gros pots (protocole décrit dans la partie II, II.2.B) le 3 mai.

Lors de l'expérimentation C, 210 graines de tomate cerise (*Solanum lycopersicum*), lignée West Virginia 106 (WVA 106) ont été semées en sol. Elles ont germé dans un sol dont le contenu en eau a été maintenu à 1.8 gH₂O g⁻¹ de sol sec, à 16h de photopériode, 25°C le jour, 20 °C la nuit et, 0.8 kPa de pression de vapeur d'eau dans la chambre de culture PHENOPSIS pendant 3 semaines. Les pots ont été éclaircis 15 jours après semis pour ne laisser qu'une plante par pot.

IV.2.3 Conditions de croissance

Lors de l'expérimentation B, les plantes ont été cultivées en serre verre comme décrit dans la partie II (page 36). Les grappes de fruit ont été taillées afin d'être toutes composées d'un maximum de huit fruits.

Lors de l'expérimentation C, les plantes ont d'abord été cultivées dans la chambre de culture PHENOPSIS, le temps de la stabilisation des conditions hydriques du sol. Les plantes ont ensuite été transférées dans la serre PHENODYN.

Les 70 plants de tomate (*Solanum lycopersicum*, cv. WVA106) ont été cultivées dans la chambre de culture PHENOPSIS dans des conditions environnementales stables (16h de photopériode, 23°C le jour, 20°C la nuit et 0.8 kPa de pression de vapeur d'eau). Deux conditions d'irrigation stable ont été maintenues durant cette expérimentation, 0.8 (stress hydrique modéré) et 1.4 gH₂O g⁻¹ de sol sec (plantes bien irriguées).

Une fois le contenu en eau du sol stabilisé pour tous les pots, les plantes ont été transférées dans la serre PHENODYN. Cette serre est équipée avec des balances et un système d'irrigation pour chaque pot. Cela a permis de maintenir les contenus en eau du sol stables à chaque cycle d'irrigation. Deux plantes (une de chaque condition d'irrigation) ont été coupées et pesées chaque semaine pour ajuster le poids cible en corrigeant avec le poids de la plante. Les conditions de température ont aussi été régulées. La pression de vapeur d'eau et les radiations photosynthétiquement actives ont été mesurées par des capteurs présents dans la serre.

.IV.2.4 Mesures des traits phénotypiques

Tous les fruits ont été récoltés, que ce soit durant l'une ou l'autre des expérimentations, sur des inflorescences qui ont émergé après la stabilisation des conditions de déficit hydrique du sol. Toute la durée de croissance (de l'initiation à la maturité) des fruits récoltés sur les plantes cultivées en condition de déficit hydrique du sol a donc eu lieu en condition de déficit hydrique du sol stable.

Lors de l'expérimentation B, les mesures des traits cellulaires des fruits ont été effectuées par l'unité PSH à Avignon. Lors de l'expérimentation C, pour les fruits dont l'âge est compris entre -2 et 10 jours après anthèse, les mesures ont été effectuées par l'UMR BFP (Biologie du Fruit et Pathologie) située à Bordeaux. Pour les fruits matures, toutes les mesures ont été effectuées par l'unité PSH. Ces fruits ont été prélevés sur les bouquets 2 à 5 à Montpellier et 6 à 9 à Avignon.

Mesures des traits relatifs à la croissance des fruits

Lors de l'expérimentation B, des fruits d'âge variable (3 à 42 jours après anthèse) ont été récoltés sur les bouquets 4 à 9 en évitant les positions distales. La date d'anthèse est définie comme le premier jour où les pétales de la fleur sont ouverts à plus de 45°. Au total 135 fruits ont été récoltés sur les plantes du génotype sauvage cultivées en condition de traitement témoin (bien irriguée), 130 fruits sur des plantes du génotype sauvage cultivées en condition de déficit hydrique du sol et, 142 fruits sur des plantes de la lignée transgénique PEPc2 :Slccs52A OE cultivées dans les mêmes conditions d'irrigation que les plantes témoins sauvages. Chaque fruit individuel a été pesé puis les fruits ont été répartis pour effectuer différentes mesures (matière sèche totale, masse fraîche du péricarpe, nombre et surface des cellules du péricarpe, niveaux de ploïdie des cellules du péricarpe). Le rendement cumulé par plante (bouquets 1 à 7) a également été mesuré sur 8 plantes par traitement.

Lors de l'expérimentation C, des fruits d'âge variable (-2 à 10 jours après anthèse) ont été récoltés sur les bouquets 2 à 5 en évitant les positions distales. Au total, 78 fruits ont été récoltés sur les plantes du génotype sauvage cultivées en condition de traitement témoin (bien irriguée) et 78 fruits sur des plantes cultivées en condition de déficit hydrique du sol.

Masse du fruit et teneur en matière sèche

Lors de l'expérimentation B, 39 fruits de plantes bien irriguées, 37 fruits de plantes cultivées en condition de déficit hydrique du sol, et 45 fruits de plantes de la lignée transgénique PEPC2 :Slccs52A OE, ont été récoltés entiers, pesés frais puis séchés individuellement à l'étuve à 65°C pendant 8 jours et pesés avec une balance de précision 10⁻⁵g. La teneur en matière sèche a ensuite été calculée comme étant le pourcentage de la masse sèche totale du fruit par rapport à la masse fraîche totale du fruit.

Lors de l'expérimentation C, 78 fruits de plantes bien irriguée et 78 fruits de plantes cultivées en condition de déficit hydrique du sol, ont été récoltés entiers et pesés frais.

Masse fraîche du péricarpe et proportion de péricarpe dans le fruit

Lors de l'expérimentation B, sur 54 fruits de plantes bien irriguées, 53 fruits de plantes cultivées en condition de déficit hydrique du sol, et 55 fruits de plantes de la lignée transgénique PEPC2 :Slccs52A OE, les graines, le placenta et la columelle, ont été retirés (Figure IV.2). Le péricarpe restant a ensuite été pesé avec une balance de précision 10⁻⁵g. La proportion de péricarpe dans le fruit a été calculée comme étant le pourcentage de la masse fraîche de péricarpe par rapport à la masse fraîche totale du fruit.

Lors de l'expérimentation C, le périmètre équatorial (p) de chaque ovaire ou fruit de moins de 4 jours après anthèse a été mesuré à partir d'images de sections équatoriales. Pour les fruits plus âgés, il a été calculé à partir du diamètre équatorial (considérant le fruit comme une sphère). Les ovaires et fruits ont été préparés pour l'analyse de sections de résines comme décrit dans Cheniclet *e .al.*, 2005. La fixation au glutaraldéhyde a été suivie par une post-fixation avec 1% de téroxyde d'osmium pendant 4h à 4°C et la résine Technovit 7100 (Kulzer) a été remplacée par de l'Epon. Des sections de 1 à 2 µm d'épaisseur ont été colorées avec du bleu de toluidine et des images ont été enregistrées à partir d'un microscope Zeiss

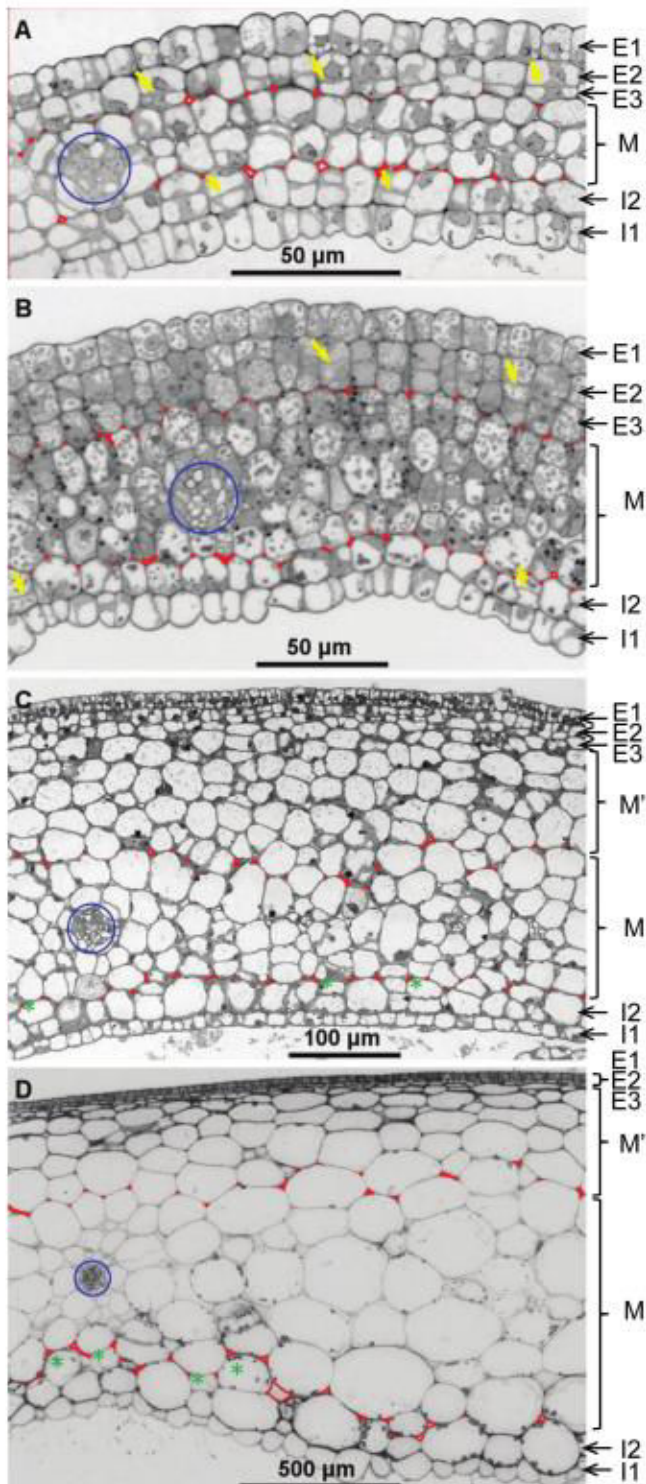
Axiopot avec une caméra Spot RTKE. Les images ont été analysées avec le logiciel image Pro-Plus (Media Cybernetics). Le nombre d'assises et l'épaisseur du péricarpe ont été estimés sur trois portions de péricarpe dénuées des tissus vasculaires.

Taille et nombre des cellules du péricarpe des fruits

Lors de l'expérimentation B, sur 23 fruits par traitement, le péricarpe (Figure IV.3) des fruits a été pesé et une portion de ce péricarpe a été plongée dans 8 ml d'une solution d'EDTA-mannitol et pectinase. Les pectines sont un des constituants de la paroi végétale. Elles maintiennent ensemble les cellules des tissus végétaux. Les pectinases sont des enzymes capables de décomposer la pectine. La présence de pectine dans la solution permet donc de séparer les cellules et de former des protoplastes (cellules exemptes de parois). Les cellules obtenues sont ensuite observées au microscope et comptées à l'aide d'une cellule de Malassez, permettant ainsi d'estimer le nombre de cellules contenues dans la section de péricarpe prélevée et préalablement pesée. Le nombre de cellules mesuré à partir de la section est ensuite rapporté au poids total du péricarpe du fruit. Le volume moyen d'une cellule du péricarpe est estimé en divisant le volume du péricarpe par le nombre de cellules total calculé.

Pour l'expérimentation C, le protocole (de la préparation des coupes histologiques à l'obtention des images utilisées pour l'analyse) est en partie décrit dans la section précédente (partie IV.2.4.1.2 «Masse fraîche du péricarpe et proportion de péricarpe dans le fruit»). Les images de coupe transversale de fruit obtenues sont analysées avec le logiciel image Pro-Plus (Media Cybernetics). Pour chaque fruit, trois portions de péricarpe ont été analysées selon la méthode décrite par Renaudin *et al.* (2017) résumée ci-dessous (voir aussi Figure IV.4).

Un groupe de cellules des couches de l'épiderme externe (E1), du sous-épiderme (E2) et du sous-épiderme interne (I2), ainsi que de l'épiderme interne (I1) est déterminé manuellement (Figure 3) et, son nombre de cellules, et sa surface sont mesurés.



Pour chaque fruit, les mesures faites sur trois portions de péricarpe représentent chacune 107 ± 48 cellules par fruit suivant le nombre de couches cellulaires et le stade de développement. Ces valeurs ont été utilisées pour calculer la moyenne du diamètre péricline des cellules et le diamètre anticline de chaque couche pour chaque fruit. La troisième dimension, le diamètre longitudinal, a été estimé comme égal à au diamètre péricline moyen des cellules à partir de mesures de contrôle de sections longitudinales du fruit. Le volume moyen d'une cellule de la couche a été calculé en considérant une forme parallélépipédique des cellules des couches E1, E2, I2, et I1.

Le nombre de cellules de chaque couche de tout le péricarpe d'un fruit, a été calculé en assimilant le fruit à une sphère, en divisant la surface externe de cette sphère par la moyenne de la surface péricline d'une cellule. Les cellules du mésocarpe M forment une couche qui n'est pas continue en raison de la présence de faisceaux vasculaires. Elles ont alors été analysées en délimitant manuellement des groupes de cellules de une à quatre couches dont la surface et le nombre de cellules ont été mesurés pour calculer la surface moyenne de la section de la cellule du mésocarpe. Avant 12 jours après anthèse, les cellules du mésocarpe n'ont pas d'axe d'élongation préférentiel dans la tomate cerise WVA106. Elles ont donc été considérées de forme cubique. La taille et le nombre des cellules de la nouvelle couche M' (Figure IV.4) formée après anthèse sont déduits des mesures précédentes. Pour chaque fruit, le nombre de cellules de la couche M' a été calculé comme la différence entre le nombre total de couches de cellules dans ce fruit et le nombre moyen de couches de cellules au stade anthèse déterminé sur d'autres fruits. Le nombre total de cellules du péricarpe a été calculé en additionnant le nombre de cellules de chaque couche du péricarpe. La moyenne du volume cellulaire du péricarpe a été calculée comme la moyenne du volume cellulaire, pondérée du nombre de cellules, de toutes les couches de cellule du péricarpe. Pour plus de détails, se référer à la publication de Renaudin *et al.* (2017).

Niveaux de ploïdie dans les fruits et analyse des sorties de fluorescence de cytométrie en flux

Des morceaux de 0,5 cm² de péricarpe des fruits ont été découpés. Pour les fruits les plus jeunes (3 jours après anthèse) tout l'organe a été analysé. Les morceaux ont été immédiatement mis dans des sachets plastiques et congelés dans l'azote liquide. Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'au moment de la mesure au cytomètre en flux. Les disques congelés ont été hachés avec une lame de rasoir et incubés dans 200 µL de tampon d'extraction pendant 2 minutes. Les noyaux extraits ont ensuite été fixés avec 200 µL d'éthanol 70 % pendant 2 minutes et colorés avec 800 µL de DAPI. Les solutions ont été filtrées pour éliminer toutes les structures dont le diamètre était supérieur à 30 µm. Les solutions résultantes ont été analysées par cytométrie en flux avec le système C6 de chez BD Accuri. Tous les réactifs sont fournis par BD Biosciences. Pour chaque échantillon, plus de 1000 noyaux ont été comptés et le pourcentage de noyaux en 2C, 4C, 8C, 16C et 32C ont été calculés. Les histogrammes représentant la distribution des différents niveaux de ploïdie ont été analysés individuellement (par échantillon) et groupés pour chaque stade de croissance, génotype et, condition d'irrigation (les histogrammes de plusieurs échantillons ont été réunis pour n'en former qu'un). Les positions des pics correspondant aux différentes classes de noyaux, i.e. noyaux en 2C, 4C, 8C, 16C, 32C, 64C, 128C et 256C ont été identifiés manuellement. Les fenêtres ont été positionnées à partir d'échantillons de stades juvéniles et tardifs permettant ainsi de déterminer à la fois les niveaux de ploïdie les plus faibles et les plus élevés. Ce traitement manuel des données a permis de supprimer les bruits de fond, i.e., toutes les structures précédant le pic 2C qui peuvent provenir de différentes origines (principalement des interactions chimiques avec le DAPI et peut être aussi de débris résultant du hachage. La position des pics a été identifiée et a été conservée pour toute l'étude. Les

histogrammes de ploïdie ont été analysés de manière quantitative avec le logiciel R pour toutes les plantes.

Ajustement des cinétiques de croissance

Afin de décrire les cinétiques de croissance du fruit, les variables de masse fraîche totale du fruit et de volume cellulaire moyen du péricarpe ont été ajustées à l'aide de modèles de régression non-linéaires. Pour cela deux modèles de type sigmoïde ont été testés, le modèle logistique et le modèle de Gompertz. Le modèle de Gompertz permet un meilleur ajustement notamment concernant les valeurs proches de 0 (stades précoces de croissance du fruit).

Le modèle de régression non-linéaire de Gompertz est défini par :

$$y = a \exp[-\exp\{-(t - t_0)/b\}] + \varepsilon$$

où a est l'asymptote supérieure, t_0 le temps au point d'inflexion, b la durée caractéristique de croissance (inverse du taux de croissance) et ε le terme résiduel distribué selon une loi normale centrée en 0. Les paramètres du modèle a , t_0 et b sont estimés par l'algorithme de Gauss-Newton qui est une méthode des moindres carrés itérés.

La valeur maximum y_{\max} retenue représente 95% de l'asymptote du modèle. La durée x_{\max} retenue est la valeur x associée à y_{\max} . La vitesse de croissance comme étant la pente de la tangente au point d'inflexion du modèle (Figure IV.5).

La matière sèche du fruit a d'autre part été modélisée à l'aide d'un modèle de décroissance exponentielle défini par :

$$y = a \exp\{-b(t - t_0)\} + c + \varepsilon$$

où $a+c$ est la valeur de la fonction en t_0 , b le paramètre de décroissance exponentielle, c l'asymptote et ε le terme résiduel distribué selon une loi normale centrée en 0.

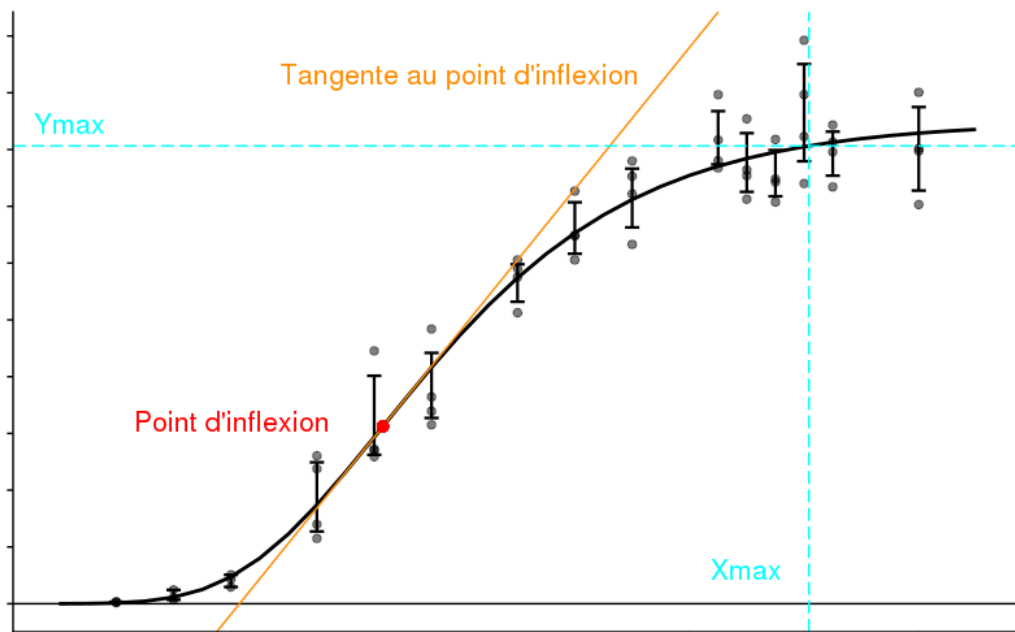


Figure IV-5. Représentation illustrant les valeurs finales Y_{\max} (asymptote à 95 % de la courbe de croissance) et X_{\max} (bleu clair), le point d'inflexion (rouge) et, la tangente au point d'inflexion (orange), d'une courbe de croissance type.

IV-3 RÉSULTATS DE LA PARTIE IV

IV.3. Un déficit hydrique du sol modéré constant affecte la dynamique de croissance en masse fraîche du fruit.

Lors de l'expérimentation B, la masse sèche du fruit (Figure IV.6A) suit un profil sigmoïdal en fonction de l'âge du fruit, comme sa masse fraîche (Figure IV.7A). Durant les six premiers jours après anthèse, l'évolution de la masse sèche et de la masse fraîche du fruit sont lentes. Tandis que l'évolution de la teneur en matière sèche (Figure IV.6B) est rapide (passe de 30 à 10%). Elle ne diminue ensuite que de 1 à 2% jusqu'à la fin de la croissance du fruit (Figure IV.6B).

Le déficit hydrique du sol imposé ne modifie pas la cinétique d'évolution de la masse sèche du fruit (Figure IV.6A). Il n'entraîne pas non plus de modification de la valeur finale de la masse sèche (Figure IV.6A), alors qu'il entraîne une réduction de 30 % à la fois de la vitesse d'expansion en masse fraîche et de sa valeur finale (Figure IV.7A). La durée de l'expansion du fruit (Figure IV.6A) n'est pas modifiée par le déficit hydrique. La teneur en matière sèche est en revanche augmentée de 15 % par le déficit hydrique du sol imposé (Figure IV.6B).

En conclusion, le déficit hydrique du sol imposé réduit la masse fraîche finale du fruit de 30% et augmente la teneur en matière sèche de 15% mais ne réduit pas la masse sèche du fruit. La durée de croissance du fruit n'est pas réduite non plus par le déficit hydrique.

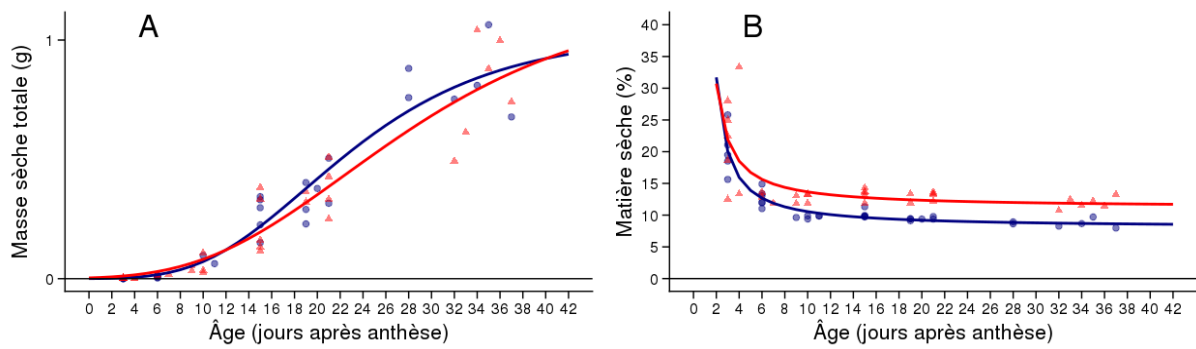


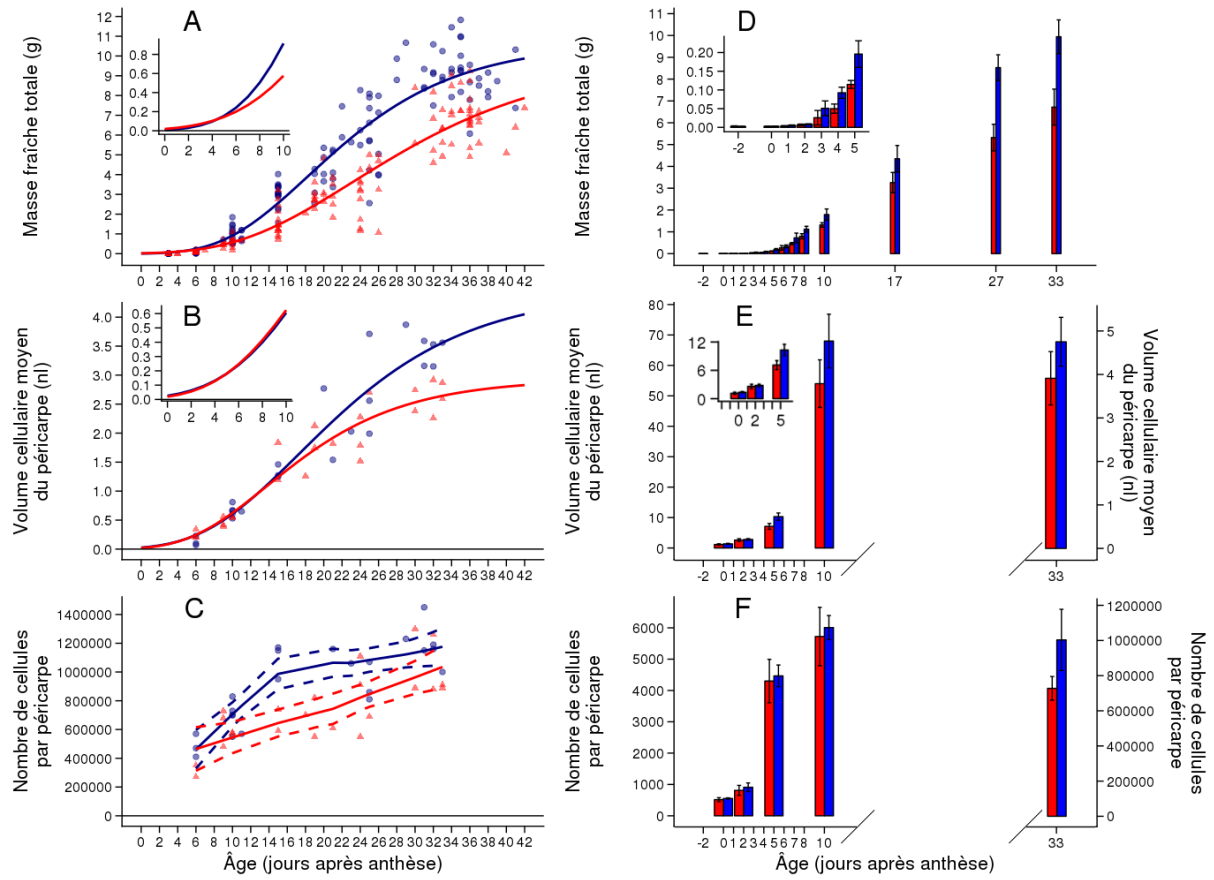
Figure IV-6. Cinétique d'évolution de la masse sèche et de la teneur en matière sèche des fruits de plantes de tomate cerise WVA 106 cultivées en condition bien irriguée (ronds et lignes bleus), et en condition de déficit hydrique du sol (triangles et lignes rouges) durant l'expérience B. Chaque point représente la masse sèche (A) et la teneur en matière sèche (B) d'un fruit.

IV.3.2 Un déficit hydrique du sol modéré constant affecte les traits cellulaires dans le fruit pendant la phase précoce de la croissance du fruit

Les données sur les stades précoces (de -2 à 10 jours après anthèse) de croissance du fruit récoltées lors de l'expérimentation C, montrent que la phase durant laquelle le nombre de cellules augmente le plus fortement précède la phase durant laquelle le volume cellulaire augmente le plus. Le volume cellulaire moyen du péricarpe (Figure IV.7E) est multiplié par 2 entre l'anthèse et 2 jours après l'anthèse, puis, par 3 entre 2 et 5 jours après anthèse et, par 7 entre 5 et 10 jours après anthèse. Par contre le nombre de cellules par péricarpe (Figure IV.7F) est lui aussi multiplié par 2 entre l'anthèse et 2 jours après, puis par 5 entre 2 et 5 jours après anthèse, mais seulement par 1,2 entre 5 et 10 jours après anthèse, signifiant un ralentissement de la vitesse de l'activité de division cellulaire après 5 jours.

Le déficit hydrique du sol imposé réduit la masse fraîche du fruit (Figure IV.7D) dès trois jours après anthèse. Cependant, le volume cellulaire moyen du péricarpe est réduit par le déficit à partir de 5 jours après anthèse (Figure IV.7E) et le nombre de cellules par péricarpe n'est pas encore réduit par le déficit hydrique à 10 jours après anthèse (Figure IV.7F), alors que la majorité des divisions ont eu lieu à ce stade.

En conclusion, le nombre de cellules par péricarpe augmente plus précocement que le volume cellulaire moyen du péricarpe.



IV.3.3 Un déficit hydrique du sol modéré constant affecte les traits cellulaires dans le fruit pendant la phase rapide de la croissance du fruit.

Globalement, lors de l'expérimentation B, la masse fraîche du fruit (Figure IV.7A) et le volume cellulaire moyen du péricarpe (Figure IV.7B) suivent un profil sigmoïdal en fonction de l'âge du fruit. Le début de l'expansion du fruit est lente (Figure IV.7A) et cela coïncide à une faible augmentation du volume des cellules du péricarpe (Figure IV.7B). Après 10 jours après anthèse, le volume moyen des cellules du péricarpe augmente plus rapidement (Figure IV.7B) et atteint un plateau 30 jours après anthèse. Ce volume est multiplié par 7 entre 10 et 30 jours après anthèse. Le nombre de cellules par péricarpe en revanche ne varie plus beaucoup au-delà de 15 jours après anthèse (Figure IV.7C). Il est multiplié par 2 entre 6 et 15 jours après anthèse puis atteint un plateau. Lors de l'expérimentation B, le volume cellulaire moyen final du péricarpe et la vitesse d'expansion des cellules du péricarpe sont respectivement réduits de 30 et 20% par le traitement de déficit hydrique du sol (Figure IV.7B). Le nombre de cellules par péricarpe augmente plus lentement en condition de déficit hydrique (Figure IV.7C) et l'écart entre les deux traitements se creuse principalement entre 10 et 15 jours (1180000 et 1040000 cellules par péricarpe dans les fruits matures des plantes cultivées en condition bien irriguée et en déficit hydrique du sol respectivement). En conclusion, le nombre de cellules du péricarpe n'augmente plus au-delà de 15 jours après anthèse, tandis que le volume cellulaire augmente très fortement entre 10 et 30 jours après anthèse. Le déficit hydrique du sol entraîne une réduction de 30% du volume cellulaire final.

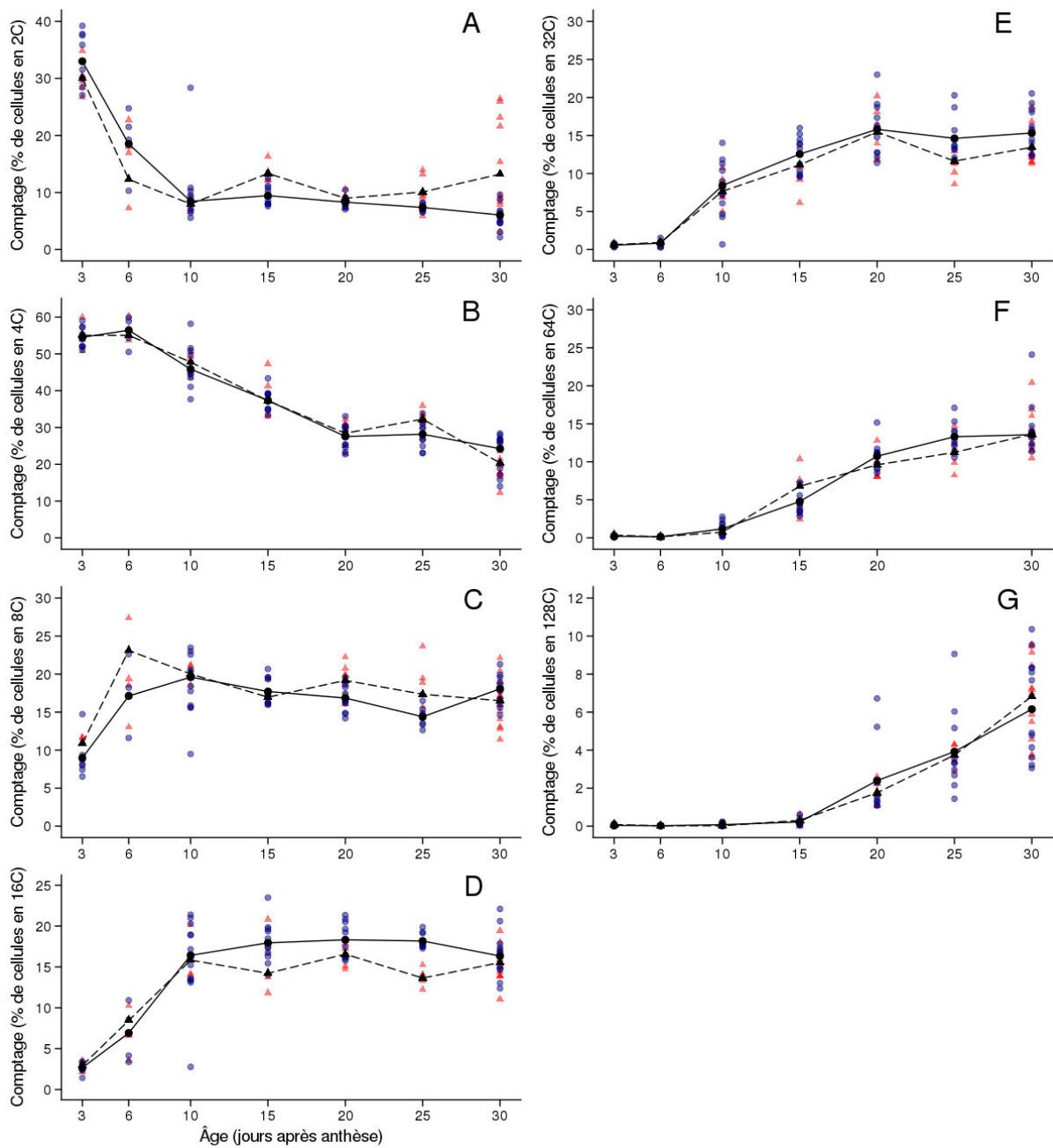
IV.3.4 Les deux méthodes utilisées pour mesurer les volumes cellulaires dans le péricarpe présentent des différences dans les valeurs absolues des nombres de cellules mesurés.

La comparaison des deux expérimentations permet de constater des différences entre les valeurs absolues des variables cellulaires (volume et nombre de cellules du péricarpe) pour des fruits de masses comparables. Le volume moyen des cellules du péricarpe des fruits mesurés par la méthode utilisée par l'unité BFP (Renaudin *et al.*, 2017) est dix fois plus grand (fruits de 0 à 10 jours de l'expérimentation C) (Figure IV.7E) que celui des fruits mesurés par la méthode utilisée par l'unité PSH (Bertin *et al.*, 2002) (fruits de l'expérimentation B et fruits matures, 33 jours après anthèse, de l'expérimentation C) (Figure IV.7B, E). En toute logique, le nombre de cellules par péricarpe est aussi différent, il est cent fois plus grand dans les péricarpes des fruits mesurés par l'unité PSH (fruits de l'expérimentation B et fruits matures, 33 jours après anthèse, de l'expérimentation C) (Figure IV.7C, F) que dans les péricarpes des fruits mesurés par l'unité BFP (fruits de 0 à 10 jours de l'expérimentation C) (Figure IV.7F). En revanche, les ordres de grandeur des résultats sur les stades finaux des fruits des variables de masse fraîche totale du fruit (Figure IV.7A, D), volume cellulaire moyen du péricarpe (Figure IV.7B,E) et, nombre de cellules par péricarpe (Figure IV.7C, F) sont similaires d'une expérimentation à l'autre (les mesures des traits cellulaires des stades finaux des fruits des deux expérimentations ont été faites selon le même protocole, au sein de l'unité PSH). On peut toutefois constater que les effets du déficit hydrique sur le nombre et la taille des cellules du fruit sont cohérents avec les deux méthodes.

IV.3.5 Un déficit hydrique du sol modéré constant n'affecte pas la dynamique du processus d'endoréduplication dans le fruit.

Lors de l'expérimentation B, l'évolution des différents niveaux de ploïdie des cellules du péricarpe (Figure IV.8) a été mesurée dans le même laboratoire, avec le même cytomètre et, selon le même protocole pour tous les stades de croissance des fruits récoltés durant l'expérimentation. A partir de trois jours après anthèse, la proportion de cellules en 2C (Figure IV.8A) diminue (de 30 à 10%) pendant que les proportions de cellules en 8C (Figure IV.8C), et 16C (Figure IV.8D) augmentent (de 10 à 20% et de moins de 5 à un peu plus de 15% respectivement) durant une phase qui dure environ 10 jours. La proportion de cellules en 4C (Figure IV.8B) commence à réduire à six jours après anthèse et, jusqu'à la fin de la croissance du fruit (de 55 à 25 %) tandis que la proportion de cellules en 32C (Figure IV.8E) commence à augmenter six jours après anthèse et se stabilise 20 jours après anthèse (de 0 à 15%). Les proportions de cellules en 64C (Figure IV.8F) et 128C (Figure IV.8G) commencent à augmenter à 10 et 15 jours après anthèse respectivement (elles atteignent 15 et 10% respectivement) jusqu'à la fin de la croissance du fruit. Une fois le développement du fruit terminé, toutes les proportions des populations cellulaires sont stabilisées, la proportion de cellules la plus élevée est celle de la population de cellules en 4C (20%), suivie par les proportions des populations de cellules en 8C, 16C, 32C et 64C (chacune à 15%), puis les proportions de cellules en 2C et 128C (chacune à 10%).

Il y a donc des cellules endorédupliées très tôt dans le développement du fruit comme en témoigne la présence de cellules en 4C, 8C, 16C et 32C dès trois jours après anthèse. Ce qui met en évidence la coexistence de l'activité des processus de division cellulaire et d'endoréduplication. Le processus d'endoréduplication a lieu tout le long de la phase



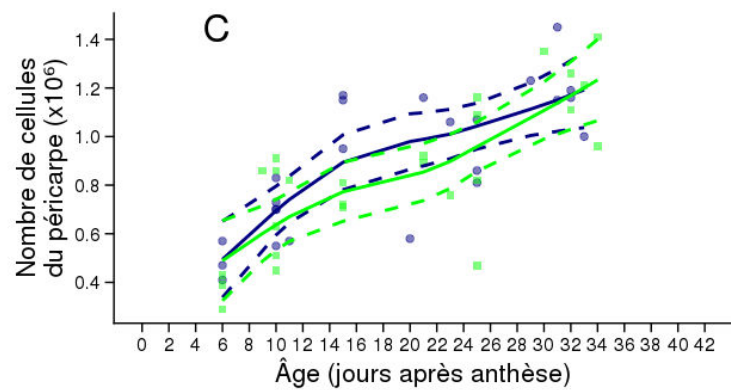
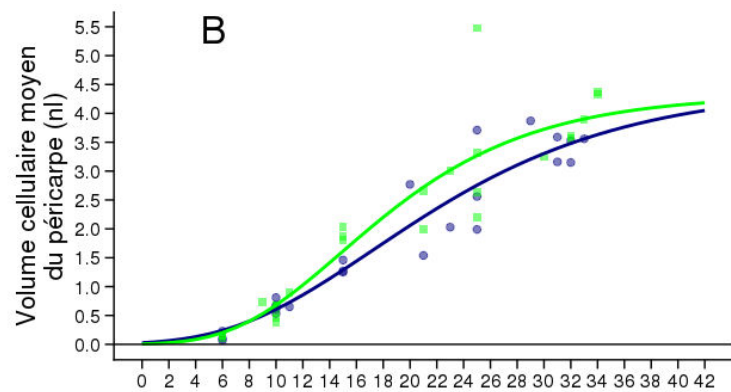
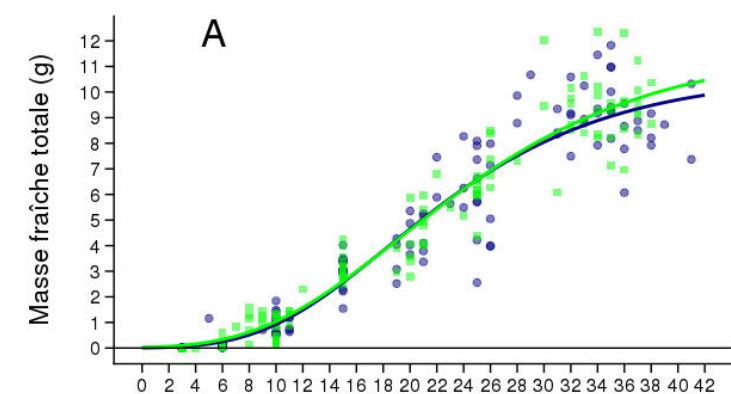
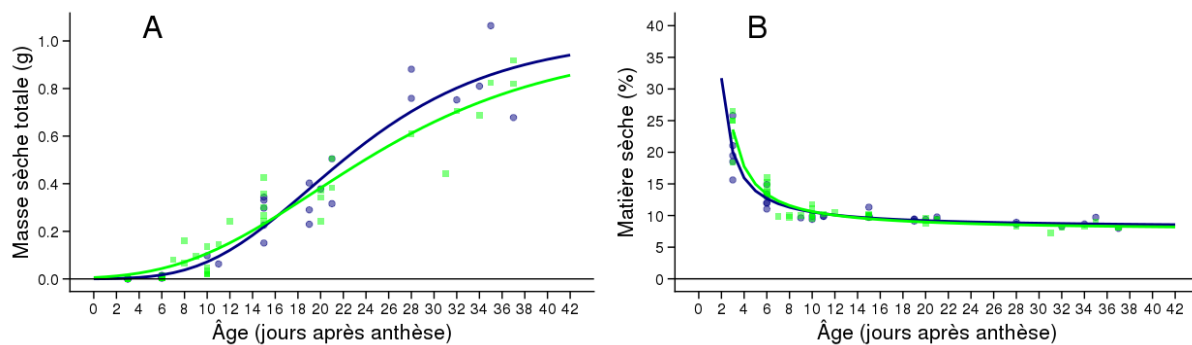
d'expansion cellulaire, jusqu'à la fin de la croissance du fruit. Les tendances observées montrent qu'il n'y a pas d'effet du déficit hydrique du sol sur ce processus dans le fruit.

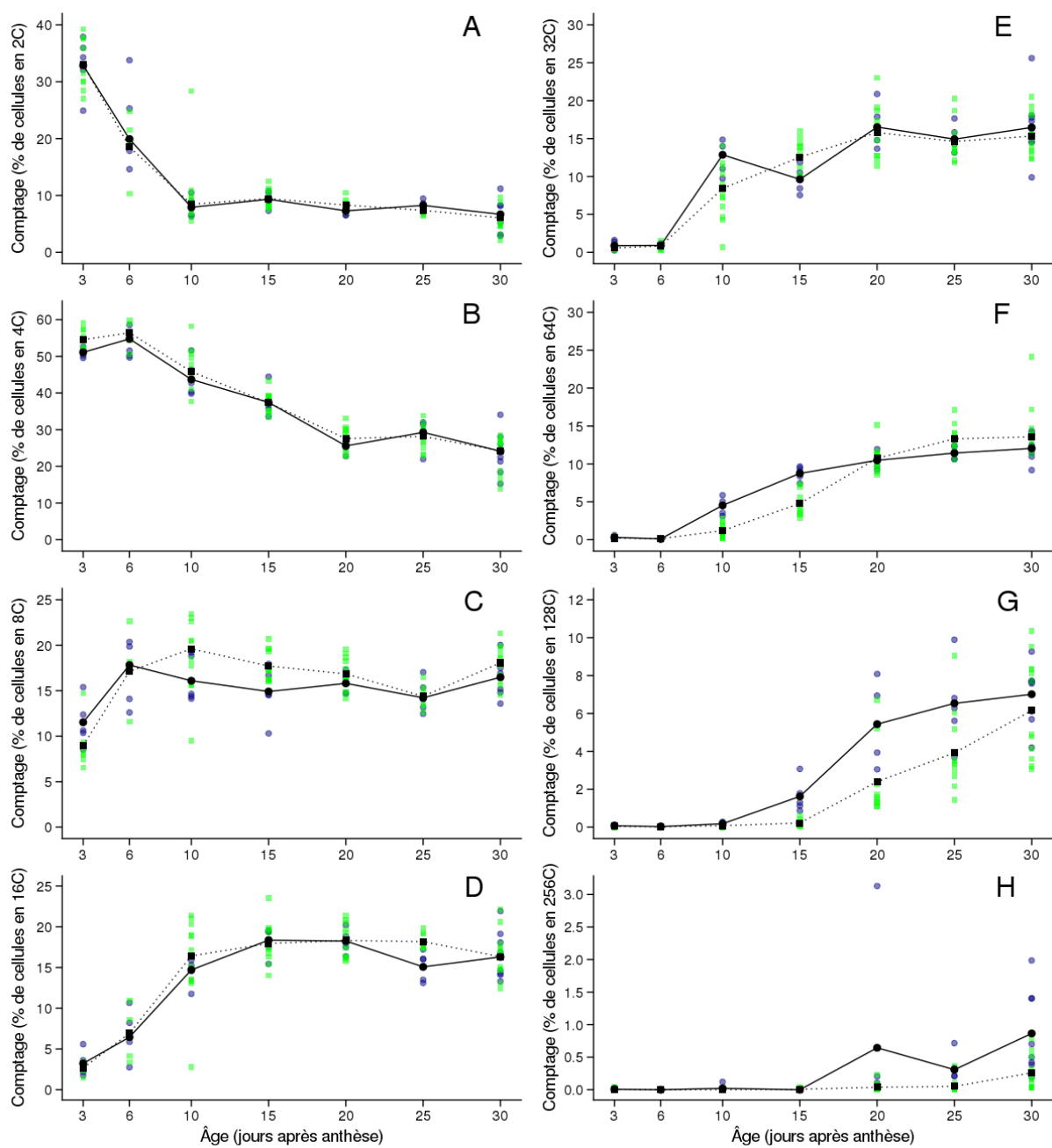
IV.3.6 La dynamique de croissance en masse fraîche du fruit et des traits cellulaires associés dans le péricarpe de tomate n'est pas affectée chez la lignée transgénique SICCS52AOE.

Les cinétiques d'évolution des traits morphologiques et cellulaires des plantes transgéniques sont similaires à ceux des plantes de génotype sauvage (Figure IV.9). Ni la masse fraîche finale du fruit, ni la durée de croissance en masse fraîche du fruit ou la vitesse maximum de croissance en masse fraîche (Figure IV.9A) des plantes transgéniques ne sont modifiées par rapport à celles des plantes du génotype sauvage. Etant donné le chevauchement des intervalles de confiance à 95% (représentés en pointillés) (Figure IV.9 et 10), aucune différence n'est décelée pour les cinétiques de croissance des variables observées (masse fraîche totale du fruit, volume cellulaire moyen du péricarpe, nombre de cellules du péricarpe), ainsi que le pourcentage de matière sèche du fruit (Figure IV.10), entre le génotype sauvage et la lignée transgénique SICCS52AOE.

Il en va de même concernant les cinétiques d'évolution des proportions des populations de cellules des différents niveaux de ploïdie (Figure IV.11).

En conclusion, ces résultats ne montrent pas ou très peu de modifications de la masse fraîche totale du fruit, du volume cellulaire moyen dans le péricarpe, du nombre de cellules par péricarpe et, des niveaux de ploïdie dans les cellules du péricarpe des fruits de la lignée transgénique ProPEPc2 ::SICCS52A^{OE}.





IV-4 DISCUSSION DE LA PARTIE IV

IV.4.1 La plasticité du volume du fruit de la tomate est liée à une plus faible teneur en eau mais également moins de cellules et des cellules de volume réduit

Dans cette partie, nous avons tenté de faire varier la taille finale du fruit chez la tomate à la fois par un stress hydrique modéré et également en jouant sur l'expression d'un gène contrôlant le processus d'endoréduplication.

Le stress hydrique du sol appliqué a bien causé une réduction de la masse fraîche des fruits comme cela était attendu. Par contre, d'après les résultats présentés par Chevalier *et al.*, (2011), nous nous attendions à une augmentation du niveau de ploïdie, ainsi qu'une augmentation de la taille des cellules et de la taille des fruits dans le génotype portant la construction permettant une sur-expression du gène SICCS52A dans la tomate. Ce phénotype n'a pas été obtenu et la plante sauvage et le sur-expresser avaient au final le même phénotype 'taille de fruit'. Nous ne pouvons expliquer avec certitude l'absence de phénotype attendu mais il existe différents activateurs du complexe APC/C dont l'expression des gènes peut varier d'un organe à un autre dans la plante de tomate (Mathieu-rivet *et al.*, 2010). Leur variabilité de profils d'expression augmente la possibilité qu'il y ait des formes variées de complexes APC/C qui jouent des rôles différents dans le développement du fruit (Mathieu-rivet *et al.*, 2010). Il est donc aussi possible qu'un phénomène de compensation de la régulation de l'activité de l'APC/C ait eu lieu au niveau moléculaire.

Comme nous le montrons ici, chez la tomate, la réduction de la disponibilité en eau causée par un potentiel osmotique élevé dans l'environnement des racines entraîne une réduction de la masse fraîche mais augmente la teneur en matière sèche du fruit (Ehret et Ho 1986; Fanasca *et al.*, 2007). Mingo *et al.*, (2003) montre aussi que des conditions de sécheresse dans l'environnement des racines entraîne une réduction du diamètre de croissance du fruit chez la

tomate. Chez le raisin, la faible taille des baies en condition de déficit hydrique entre l'anthèse et la véraison (début du murissement) est associée à une réduction de la taille des cellules du péricarpe, mais aucun effet significatif n'est observé sur la division cellulaire (Ojeda *et al.*, 2001). Les résultats présentés ici montrent qu'un stress hydrique modéré tel que celui qui a été appliqué tout au long de la croissance du fruit altère essentiellement l'accumulation d'eau dans le fruit en augmentant la teneur en matière sèche (Figure IV.7) et impacte les deux processus de division et d'expansion cellulaire, avec un effet plus marqué sur l'expansion dans l'expérimentation B et un effet plus marqué sur la division dans l'expérimentation C (Figure IV.5, 6, 7 et 8). Les fruits ayant été prélevés sur des bouquets de rang supérieurs (bouquets 6 à 9) dans l'exp. B comparé à l'exp. C (bouquets 1 à 4), il est probable qu'un effet stress carboné induit par le déficit hydrique ait contribué à la réduction du volume cellulaire.

D'autres travaux ont mis en évidence une co-variation positive entre le nombre de cellules et la taille du fruit chez la tomate, que ce soit par des variations des conditions environnementales durant la croissance du fruit ou des manipulations génétiques générant des mutants de sur-expression ou de perte de fonction de certains gènes (Bohner et Bangerth 1988a; Bertin *et al.*, 2003; Bertin 2005; Baldet *et al.*, 2006; Bertin *et al.*, 2009). De même, il a aussi été montré la présence d'une corrélation positive entre le nombre de cellules et la masse fraîche du fruit chez quatre différentes lignées quasi-isogéniques (Bertin *et al.*, 2009). En revanche, d'autres études attribuent les différences de taille du fruit à la taille des cellules ou aux niveaux de ploïdie des cellules (Cheniclet *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2007; Czerednik *et al.*, 2012). La masse fraîche des fruits est fonction du diamètre cellulaire et la moyenne des niveaux de ploïdie des cellules est positivement corrélée avec à la fois le diamètre cellulaire et la masse fraîche du fruit. Un effet similaire de la taille des cellules et du niveau de ploïdie sur la taille des fruits de tomate a aussi été montré par Gonzalez *et al.*,

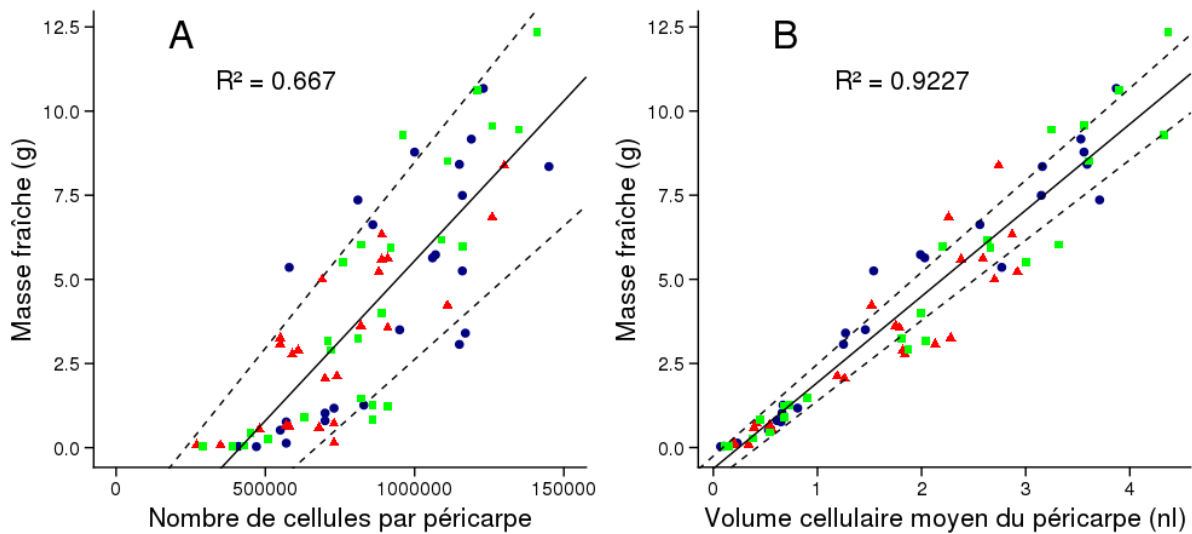
(2007). En réponse au stress hydrique appliqué ici, la diminution de taille du fruit a eu lieu sans modification du niveau de ploïdie.

IV.4.2 Un découplage des processus de division, expansion et endoreduplication a lieu au cours du développement du fruit chez la tomate et en réponse au déficit hydrique du sol.

En condition bien irriguée, le développement du péricarpe semble se dérouler en deux phases au niveau cellulaire : une phase de production de cellules pendant laquelle les cellules augmentent également en volume suivie d'une phase d'expansion des cellules produites. Ce résultat est en accord avec les cinétiques de nombres et volume de cellules publiés récemment par Renaudin *et al.* (2017). La succession de ces deux phases est moins évidente dans notre jeu de donnée lorsque la croissance du fruit est limitée par un stress hydrique du sol qui semble rallonger la phase de division cellulaire. Dans notre jeux de données, la masse fraîche du fruit est bien corrélée aux variables de nombre de cellules par péricarpe et au volume cellulaire moyen du péricarpe toutes variations dans le temps, toutes conditions d'irrigation et tous génotypes compris (Figure IV.12).

Le processus d'endoreduplication commence très tôt pendant la croissance du fruit. Des 3 jours après anthèse, des cellules en 4C, 8C et 16C sont déjà présentes dans des proportions non négligeables. Les cellules en 4C à ce stade- là peuvent être dues à des cellules engagées dans le cycle cellulaire ou des cellules ayant connu un endocycle mais les cellules en 8C et 16 C témoignent sans ambiguïté du fait que le processus d'endoreduplication est présent dès l'anthèse comme cela a déjà été montré dans le fruit de tomate par Cheniclet *et al.*, (2005) et Bertin *et al.*, (2003b). Ceci suggère que les processus de division cellulaire et

d'endoréduplication coexistent au début de la croissance du fruit avant l'expansion rapide des cellules. Le processus d'endoréduplication continue ensuite durant toute la croissance du fruit.



Jusqu'à la fin de l'expansion du fruit les proportions des populations de cellules des niveaux de ploïdie les plus élevés augmentent (ici, 64 et 128C). Les proportions des populations de cellules des niveaux de ploïdie inférieurs, de 2, 8, 16 et 32C, sont stabilisées avant la fin de la croissance du fruit. Tandis que la proportion de cellules en 4C diminue jusqu'à la fin de la croissance du fruit, comme les proportions de cellules en 64 et 128C.

Le processus d'endoréduplication n'est pas altéré par le déficit hydrique du sol constant imposé durant toute la croissance du fruit contrairement aux processus de division et d'expansion cellulaire, découplant ainsi le processus d'expansion et d'endoréduplication.

IV.4.3 Nous avons mis en évidence des disparités méthodologiques lorsque deux protocoles différents sont utilisés pour analyser les nombres de cellules dans les phases précoces puis tardives du développement du fruit.

Deux méthodes de mesures différentes ont été utilisées pour analyser les données des expérimentations B et C présentées précédemment. Les protocoles sont très différents. Les deux méthodes présentent des différences en termes de mesures et d'estimation des traits étudiés. Ce ne sont pas les mêmes variables qui sont mesurées et estimées.

Globalement, la méthode utilisée par l'unité BFP (protocole décrit par Renaudin *et al.* (2017), produit des mesures de surface cellulaire effectuées sur des coupes transversales équatoriales de fruit de tomate, permettant ainsi d'estimer le volume cellulaire moyen du péricarpe. Le volume du péricarpe est calculé en considérant le fruit comme une sphère, à partir des mesures de son épaisseur. Le nombre de cellules du péricarpe est ensuite calculé à partir du volume cellulaire moyen estimé et du volume de péricarpe calculé.

La méthode utilisée par l'unité PSH (protocole décrit par McAtee *et al.*, 2009), produit des mesures du nombre de cellules à partir de suspensions de protoplastes (cellules végétales exemptes de leur paroi). Ce nombre de cellules obtenu sur un volume de péricarpe est ensuite rapporté au volume total du péricarpe du fruit préalablement mesuré. Le volume cellulaire moyen du péricarpe est ensuite calculé à partir du nombre de cellules calculé par péricarpe et du volume total mesuré du péricarpe.

Ici nous observons une différence d'un facteur 10 entre les volumes cellulaires obtenus avec les deux méthodes de mesure et une différence d'un facteur 100 entre les nombres de cellules par péricarpe. Donc, soit le volume cellulaire moyen du péricarpe est surestimé par la méthode utilisée par l'unité BFP, soit, le nombre de cellules par péricarpe est sous-estimé par

la méthode utilisée par l'unité PSH. Il est probable que cette différence soit à la fois due à une surestimation du nombre de cellules via la méthode A et une sous-estimation via la méthode B. Une étude est menée actuellement afin de déterminer les origines des différences des résultats obtenus avec ces deux méthodes de mesure.

IV-5 CONCLUSIONS DE LA PARTIE IV

Comparer l'évolution de la masse fraîche totale des fruits, de la matière sèche des fruits, du nombre et de la taille des cellules du péricarpe au cours du développement des fruits en condition de déficit hydrique du sol au cours de deux expérimentations menées en parallèle a permis de mettre en évidence que le stress hydrique du sol affectait la teneur en eau du fruit fortement mais également les divisions cellulaires et l'expansion cellulaire dans le péricarpe. Par contre, le processus d'endoréduplication n'était pas affecté dans le fruit par ce même stress montrant un exemple supplémentaire de découplage entre ce processus et l'expansion cellulaire ou le volume de l'organe considéré, ici le fruit. Cette partie de ma thèse a permis aussi de mettre en évidence la difficulté de mettre bout à bout des variables mesurées par des techniques différentes pour obtenir des cinétiques. Les disparités entre les deux protocoles de mesures utilisés n'ont pas pu être étudiées plus en détail par manque de temps. De même l'absence de phénotype observée sur le géotype joint à WVA106 dans cette étude n'a pas pu être expliquée.

**PARTIE V : DISCUSSION-CONCLUSIONS -
PERSPECTIVES**

L'objectif de ce travail était d'analyser les contributions respectives des processus cellulaires, i.e., endoreduplication, division cellulaire et expansion cellulaire, à la croissance des organes, la feuille et le fruit, chez la tomate cerise, de mieux comprendre les relations entre ces processus ainsi que d'étudier leur plasticité en réponse au déficit hydrique du sol.

Dans des plantes à croissance déterminée telles *Arabidopsis thaliana*, *Aegilops tauschii*, certains travaux ont montré que les processus cellulaires liés à la croissance d'un organe dépendaient de processus à des échelles supérieures : l'expansion de l'organe lui-même (Tsukaya, 2003 ; Tisné *et al.*, 2008), et même le développement de la plante entière (Ter Steege *et al.*, 2005 ; Massonnet *et al.*, 2011). Nous avons systématiquement considéré dans nos expérimentations l'ensemble des différentes échelles d'organisation : les mesures d'endoreduplication, division cellulaire et expansion cellulaire dans les folioles, feuilles et fruits étaient systématiquement replacées dans le contexte de la plante entière et de son développement. Ce type de travail n'avait jamais été réalisé auparavant sur une plante à croissance indéterminée avec des feuilles composées. Il présentait donc un degré de complexité nouveau avec également l'originalité de considérer à la fois les cinétiques de croissance multi-échelles des feuilles et des fruits dans des environnements bien contrôlés et contrastés en termes d'état hydrique du sol.

Des cellules à l'organe ou de l'organe aux cellules ?

Chaque organe, chaque tissu de la plante est formé de cellules, mais lequel, de la cellule ou de l'organe pilote la croissance de l'autre. C'est une question que beaucoup de scientifiques se posent et qui est encore à ce jour non résolue. Il existe trois théories sur la croissance des organes, i.e., théorie de croissance par la cellule, par l'organe ou la théorie néo-cellulaire qui

combine les deux précédentes (Beemster *et al.* 2003; John et Qi 2008; Horiguchi et Tsukaya 2011, Figure V.1).

Dans la théorie cellulaire, la croissance de l'organe dépend de la croissance des cellules individuelles qui le composent (Figure V.1A). Au contraire dans la théorie de l'organisme, les cellules sont des compartiments d'un espace plus grand formé par l'organe qui exerce une régulation sur la croissance cellulaire. Ce qui suggère que la division cellulaire par exemple est une conséquence et non une cause de la croissance (Kaplan, 2001) (Figure V.1B). La théorie néo-cellulaire de croissance combine les deux théories précédentes. Il est alors proposé l'existence d'un niveau d'interaction entre les cellules et l'organe entier. Selon cette théorie, l'organe peut compenser une déficience en division cellulaire par une expansion de ses cellules plus importante. L'origine de la capacité de compensation de la division cellulaire par l'expansion cellulaire n'est pas claire, mais il est probable que ce soit un moyen d'atteindre une taille d'organe génétiquement prédestinée lorsque les conditions environnementales ne sont pas optimales durant la phase de division cellulaire (Okello *et al.*, 2015).

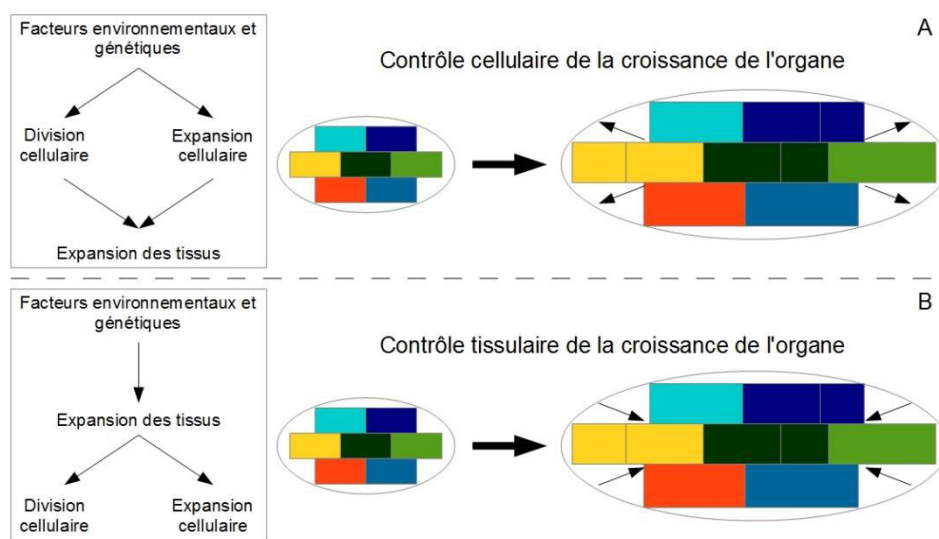


Figure V-1. Schématisation des théories du (A) contrôle cellulaire de la croissance de l'organe et (B) tissulaire de la croissance de l'organe.

Globalement, que ce soit dans la feuille ou dans le fruit de tomate, les résultats présentés dans cette thèse montrent que la division et l'expansion cellulaires sont deux processus affectés par un déficit hydrique constant imposé pendant tout le développement de l'organe, quelle que soit son intensité et donc, qu'il n'y a pas de compensation entre ces processus qui expliquent à eux deux la diminution de taille de l'organe

De nombreux travaux ont montré que la vitesse de division cellulaire était réduite par une contrainte hydrique du sol (Granier et Tardieu, 1999b ; Baerenfaller *et al.*, 2012). L'effet de la contrainte hydrique sur la durée de la phase pendant laquelle les divisions cellulaires ont lieu est moins clair dans la littérature. Nous montrons ici que la contrainte hydrique du sol entraîne une augmentation de la durée de la phase de division cellulaire mais une diminution de la vitesse de division à la fois dans la feuille (Figure V.2A) et dans le fruit (Figure V.2B). Au contraire la durée de la phase d'expansion n'est pas affectée mais le taux d'expansion est réduit, précocement chez la feuille et plus tardivement chez le fruit. Il y a donc une période de chevauchement des processus de division et d'expansion plus longue en condition de déficit hydrique.

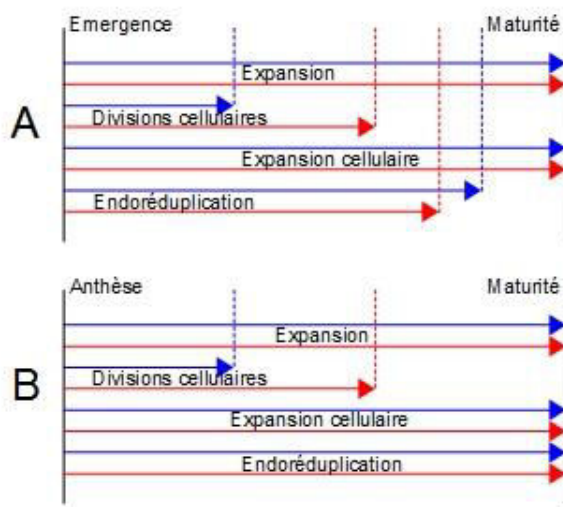


Figure V-2. Effet du stress hydrique sur les durées des processus cellulaires (division cellulaire, expansion cellulaire et endoreduplication) durant la croissance de la foliole (A) et du fruit (B) de la tomate.

Les durées des différents processus de la croissance des organes sont représentées en bleu pour la condition de croissance 'normale' et en rouge pour la condition de 'stress hydrique'.

Relations entre les processus cellulaires

Malgré des points de vue divergents sur les théories de la compensation à l'échelle cellulaire ou de l'organisme (Beemster *et al.*, 2003 ; Tsukaya, 2003), il est admis que l'organogénèse ne peut être complètement comprise si les organes sont considérés comme des collections de cellules individuelles (Tsukaya et Beemster, 2006).

Une relation positive entre le niveau d'endoréduplication et la taille des cellules est souvent mise en avant (Autran *et al.*, 2002 ; De Veylder *et al.*, 2002 ; Dewitte *et al.*, 2003 ; Boudolf *et al.*, 2004 ; Verkest *et al.*, 2005 ; Cheniclet *et al.*, 2005 ; Bourdon *et al.*, 2011). Cependant, le lien de cause à effet est un sujet à débat dans la littérature (Tsukaya, 2008). De grandes cellules ont tendance à être polyploïdes mais, les cellules des plantes peuvent aussi augmenter leur volume sans augmenter leur niveau de ploïdie (Tsukaya, 2008 ; Ferjani *et al.*, 2007). C'est le cas par exemple en réponse à une diminution du rayonnement incident : la diminution de la surface des feuilles s'accompagne d'une augmentation de la surface des cellules mais une diminution du niveau d'endoréduplication dans les feuilles (Cookson *et al.*, 2006). En réponse à la contrainte hydrique du sol, ici, la réduction du volume des cellules du péricarpe du fruit ne s'accompagne pas d'une modification du niveau de ploïdie. La co-variation entre les deux processus ou l'absence de co-variation dépend certainement de l'organe et/ou même des tissus concernés puisque le stress hydrique a un effet négatif à la fois sur la taille des cellules et le niveau de ploïdie dans les feuilles de tomates.

Dans certains cas, l'endoréduplication peut avoir lieu avant l'expansion des cellules, comme montré dans les cellules de l'hypocotyle de chou (*Brassica oleracea*) (Kudo et Kimura, 2001). Ainsi, le processus d'endoréduplication n'est pas toujours couplé à une augmentation de la taille des cellules lorsque ces processus sont comparés en cinétique. Ceci est bien confirmé

par notre travail. Les analyses dynamiques des différents processus indiquent que le processus d'endoréduplication démarre très tôt dans le développement de la feuille (Figure V.2A) et du fruit (Figure V.2B) avant l'expansion rapide des cellules. Par ailleurs, dans la feuille, l'endoréduplication cesse avant la fin d'expansion des cellules, ce qui n'est pas le cas dans le fruit. Ces analyses dynamiques des différents processus suggèrent donc que les processus d'expansion cellulaire et d'endoréduplication ne sont pas directement couplés.

Relations entre les organes

De nombreux organes ont été mesurés pendant cette thèse. La biomasse des racines, le volume des fruits, la surface des feuilles, la surface des folioles sont réduits par les contraintes hydriques du sol imposées. Nos résultats montrent que la foliole peut être considérée comme une partie de la feuille à laquelle elle appartient et comme suggéré par Kaplan (1975), la feuille composée peut être vue comme équivalente à une feuille simple découpée (Figure V-3). Cette théorie a été confortée dans la partie III de la thèse qui montre qu'une foliole est représentative de la feuille pour les traits relatifs à la taille des cellules (surface cellulaire et nombre de cellules de l'épiderme).

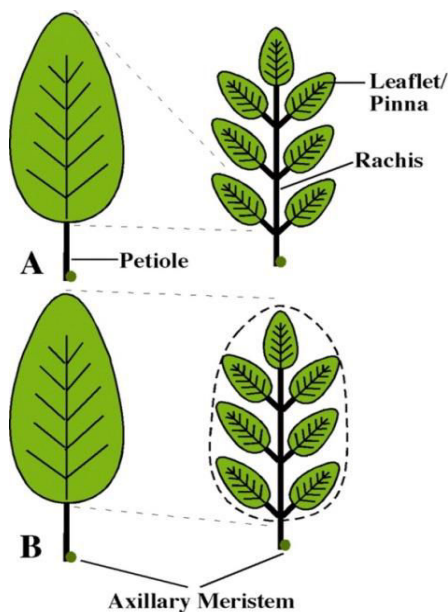


Figure V-3. Les feuilles composées peuvent être vues comme (A) des collections de feuilles simples ou (B) équivalents aux feuilles simples. D'après (Kaplan, 1975)

Il existe une compétition entre les feuilles et fruits pour les assimilats nécessaires à leur croissance. Cette compétition augmente le long de la tige, plus les rangs de feuille et d'inflorescences / grappes sont grands plus la compétition pour les assimilats est grande entre les jeunes feuilles et les fruits (Bertin 1995). Il en résulte une diminution de la croissance des feuilles en termes de masse spécifique (Gary et Bertin, 1992). La feuille adulte n'est pas un puits d'assimilats, ce qui suggère que ce soit essentiellement la division cellulaire qui soit impactée par la compétition pour les assimilats durant sa croissance. De même les fruits des positions les plus basses exercent une forte compétition sur les fruits des rangs supérieurs. Cela entraînant ainsi une baisse de la croissance des fruits selon un gradient le long de la tige de la plante (Figure V-4). Ce gradient n'est pas continu car arrive un stade où les fruits des premières grappes mûrissent entraînant alors une stabilisation de la compétition. En effet, arrivés à maturité, les fruits ne sont plus des puits d'assimilats et n'entrent plus en compte dans le processus de compétition d'acquisition des assimilats.

Des organes à la plante

Les organes reproducteurs en phase de croissance ont un statut carboné au moins préservé, et souvent amélioré, chez des plantes soumises à un déficit hydrique (Dosio *et al.*, 2010 ; Muller *et al.*, 2011). La limitation de leur croissance n'est donc pas due à un défaut d'approvisionnement en assimilats carbonés, mais plutôt à un effet direct du déficit hydrique sur les transferts d'eau dans la plante qui pilotent l'expansion des tissus. Comme le déficit hydrique affecte plus les processus d'expansion que la photosynthèse, cela se traduit par une accumulation de sucres dans les organes dont la croissance est limitée (Muller *et al.*, 2011). Ce qui entraîne une augmentation de la matière sèche (proportion de la masse sèche par rapport à la masse fraîche) dans les fruits de plantes cultivées en condition de déficit hydrique.

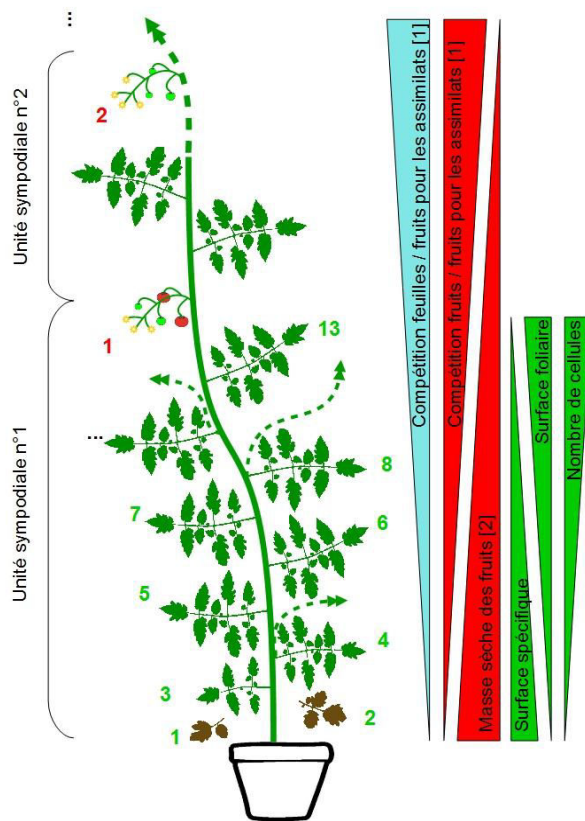


Figure V-4. Schéma des relations entre les feuilles et les fruits dans la plante de tomate et des gradients observés en termes de croissance de la feuille et du fruit le long de la tige. Les flèches vertes représentent les variables liées aux feuilles, les flèches rouges les variables liées aux fruits et la flèche bleue la relation entre feuille et fruit, le long de la tige de la plante de tomate à croissance indéterminée. [1] Gary et Bertin, 1992 [2] Bertin, 1995

Les relations entre l'avortement des organes reproducteurs et les processus d'expansion des tissus et de transfert d'eau dans la plante sont communs à différentes espèces végétales, et peuvent être vues comme un mécanisme adaptatif qui permet, en cas de limitation des ressources, d'éliminer les organes les moins développés pour assurer la production de graines viables avec les organes les plus avancés, et ce, avant même que le statut carboné ne soit affecté (Turc et Tardieu, 2018) chez le maïs. À l'opposé, la nouaison commence à échouer (entraînant alors l'avortement du fruit) lorsque le rapport entre la croissance réelle et la croissance potentielle tombe sous une valeur seuil chez la tomate (Bertin, 1995). Ce qui suggère que dans le cas de la tomate, c'est après réduction du statut carboné que l'avortement des organes reproducteurs commence à avoir lieu.

Conclusions- perspectives

Le modèle de développement du fruit décrit par Baldazzi *et al.*, (2017) intègre à la fois les processus de division, expansion cellulaires, et endoréduplication. Le fruit est décrit comme une collection de populations de cellules, chacune ayant un âge et un volume spécifiques. La vitesse de croissance est dépendante des conditions environnementales, donnant lieu à des différences de distributions de la taille des cellules en lien avec l'environnement et/ou les pratiques culturales. Dans le modèle actuel, les processus de division cellulaire et d'endoréduplication ne dépendent pas de l'environnement. La plupart des valeurs des paramètres sont basées sur des modèles déjà existants (Bertin *et al.*, 2003b ; Liu *et al.*, 2007, Figure V.5).

Les limites et la complexité de ce modèle sont connues et certaines questions restaient en suspens au démarrage de cette thèse. Ce modèle est complexe, dans le sens où il comporte de nombreux paramètres, impliquant ainsi la nécessité d'un jeu de données consistant pour être calibré. Il y avait un manque de données cinétiques, sur les phases précoces autour de l'anthèse pour le fruit, ce qui rendait difficile l'identification de conditions initiales du modèle. Ces données ont été obtenues ici dans deux environnements même si les problèmes méthodologiques rencontrés ont soulevé de nouvelles questions. Il y avait d'autre part des questions sur les couplages entre les différentes variables aux différentes échelles : Il y a-t-il un effet de l'environnement sur le taux de division et d'endoréduplication ? Comment l'endoréduplication affecte-t-elle la croissance cellulaire ? Y a-t-il une compétition entre les cellules pour les ressources ?

Nos résultats permettent de répondre à certaines de ces questions et vont permettre pour la première fois de paramétrer le modèle sur un jeu de données unique, issu d'une seule expérimentation sur un même génotype.

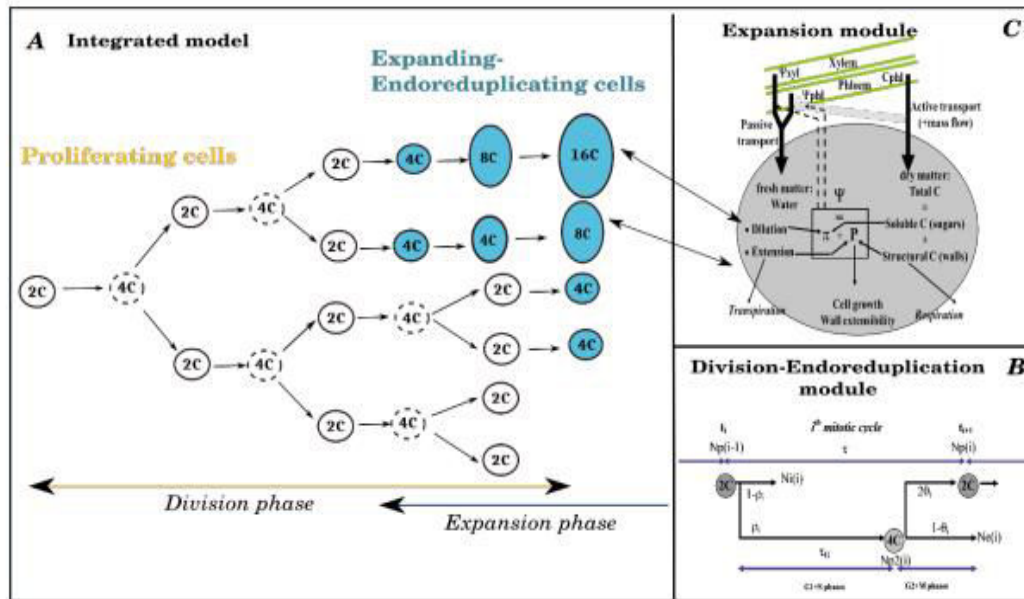


Figure V-5. (A) Schéma du modèle intégratif. (B) Schéma du module d'expansion cellulaire. (C) Schéma du module de prédiction du nombre de cellules en division et de cellules en expansion et en phase d'endoréduplication. (D'après Baldazzi *et al.*, 2017)

La comparaison des résultats obtenus avec les différents protocoles de mesures utilisés lors des deux expérimentations présentées ainsi que les différents scénarios environnementaux apporteront un jeu de données nécessaire à l'amélioration du modèle. Cela permettra de décrire avec plus de précision les relations entre les processus cellulaires en réponse aux variations des facteurs environnementaux à l'échelle du tissu (péricarpe chez le fruit). À plus large échelle, cela permettra aussi de revoir la relation entre le processus d'endoréduplication et la croissance du fruit encore mal comprise. Le modèle permettra à son tour d'avancer dans l'élucidation de la relation complexe entre les processus de division cellulaire, expansion cellulaire, et endoréduplication dans le phénomène d'organogénèse. Du fait de sa structure assez générique, ce modèle pourrait potentiellement être transposé pour prédire la croissance des feuilles. Permettant ainsi une avancée supplémentaire dans la comparaison de la croissance des organes source (feuille) et puits (fruit).

BIBLIOGRAPHIE

- Aguirrezabal L, Bouchier-Combaud S, Radziejwoski A, Dauzat M, Cookson SJ, Granier C (2006).** Plasticity to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana*: Dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant, Cell and Environment* **29**, 2216–2227.
- Albert E, Segura V, Gricourt J, Bonnefoi J, Derivot L, Causse M (2016).** Association mapping reveals the genetic architecture of tomato response to water deficit: focus on major fruit quality traits. *Journal of experimental botany* **67**, 6413–6430.
- Angus JF, & Moncur MW (1977).** Water stress and phenology in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, **28**, 177–181.
- Ariizumi T, Shinozaki Y, Ezura H (2013).** Genes that influence yield in tomato. *Breeding Science* **63**, 3–13.
- Ashby E (1948).** Studies in the morphogenesis of leaves. I. An essay on leaf shape. *New Phytologist* **47**, 153–176.
- Autran D, Jonak C, Belcram K, Beemster GTS, Kronenberger J, Grandjean O, Inzé D, Traas J (2002).** Cell numbers and leaf development in Arabidopsis: A functional analysis of the struwwelpeter gene. *EMBO Journal* **21**, 6036–6049.
- Baerenfaller K, Massonnet C, Walsh S, Baginsky S, Bühlmann P, Hennig L, Hirsch-Hoffmann M, Howell KA, Kahlau S, Radziejwoski A, Russenberger D, Rutishauser D, Small I, Stekhoven D, Sulpice R, Svozil J, Wuyts N, Stitt M, Hilson P, Granier C, Gruissem W (2012).** Systems-based analysis of Arabidopsis leaf growth reveals adaptation to water deficit. *Molecular Systems Biology* **8**
- Bai Y, Guo Z, Wang X, Bai D, Zhang W (2009).** Generation of double-virus-resistant marker-free transgenic potato plants. *Progress in Natural Science* **19**, 543–548.
- Bai Y, & Lindhout P (2007).** Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. *Annals of botany*, **100**, 1085–1094.
- Baker JM, van Bavel CHM (1986).** Resistance of plant roots to water loss. *Agronomy Journal* **78**, 641–644.
- Baldazzi V, Génard M, Bertin N (2017).** Cell division, endoreduplication and expansion processes: Setting the cell and organ control into an integrated model of tomato fruit development. *Acta Horticulturae* **1182**, 257–264.
- Baldazzi V, Pinet A, Vercambre G, Bénard C, Biais B, Génard M (2013).** In-silico analysis of water and carbon relations under stress conditions. A multi-scale perspective centered on fruit. *Frontiers in Plant Science* **4**
- Baldet P, Hernould M, Laporte F, Mounet F, Just D, Mouras A, Chevalier C, Rothan C (2006).** The expression of cell proliferation-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 961–970.
- Bandurska H, Cieślak M (2013).** The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. *Environmental and Experimental Botany* **94**, 9–18.
- Barnes A (1979).** Vegetable plant part relationships. ii. a quantitative hypothesis for shoot/storage root development. *Annals of Botany* **43**, 487–499.
- Bauchet G, Causse M (2012).** Genetic diversity in tomato (*solanum lycopersicum*) and its wild relatives. *Genetic Diversity in Plants*.
- Bauer A, Frank AB, Black AL (1984).** Estimation of spring wheat leaf growth rates and anthesis from

air temperature. *Agronomy Journal* **76**, 829.

Beemster GT, Fiorani F, Inzé D (2003). Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends in plant science* **8**, 154–8.

Beemster GT, Veylder L De (2005). Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of Arabidopsis. *Plant Physiology* **138**, 734–743.

Bergougnoux V (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* **32**, 170–189.

Bertin N (1995). Competition for assimilates and fruit position affect fruit set in indeterminate greenhouse tomato. *Annals of Botany* **75**, 55–65.

Bertin N, Gautier H, Roche C (2002). Number of cells in tomato fruit depending on fruit position and source-sink balance during plant development. *Plant Growth Regulation* **36**, 105–112.

Bertin N, Borel C, Brunel B, Cheniclet C, Causse M (2003a). Do genetic make-up and growth manipulation affect tomato fruit size by cell number, or cell size and DNA endoreduplication? *Annals of Botany* **92**, 415–424.

Bertin N, Génard M, Fishman S (2003b). A model for an early stage of tomato fruit development: Cell multiplication and cessation of the cell proliferative activity. *Annals of Botany* **92**, 65–72.

Bertin N (2005). Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA endoreduplication. *Annals of Botany* **95**, 439–447.

Bertin N, Lecomte A, Brunel B, Fishman S, Génard M (2007). A model describing cell polyploidization in tissues of growing fruit as related to cessation of cell proliferation. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1903–1913.

Bertin N, Martre P, Génard M, Quilot B, Salon C (2010). Under what circumstances can process-based simulation models link genotype to phenotype for complex traits? Case-study of fruit and grain quality traits. *Journal of Experimental Botany* **61**, 955–967.

Bohner J, Bangerth F (2006). Cell number, cell size and hormone levels in semi-isogenic mutants of *Lycopersicon pimpinellifolium* differing in fruit size. *Physiologia Plantarum* **72**, 316–320.

Bouchabke O, Chang F, Simon M, Voisin R, Pelletier G, & Durand-Tardif M (2008). Natural variation in *Arabidopsis thaliana* as a tool for highlighting differential drought responses. *PLoS one*, **3**, e1705.

Boudolf V, Vlieghe K, Beemster GT, Magyar Z, Antonio J, Acosta T (2004). The plant-specific Cyclin-dependent Kinase CDKB1 ; 1 and transcription Factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**, 2683–2692.

Bourdon M, Coriton O, Pirrello J, Cheniclet C, Brown SC, Poujol C, Chevalier C, Renaudin JP, Frangne N (2011). In planta quantification of endoreduplication using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Plant Journal* **66**, 1089–1099.

Boyer JS (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**, 443 LP-448.

Boyer JS (1988). Cell enlargement and growth-induced water potentials. *Physiologia Plantarum* **74**, 882–316.

Bradford KJ, & Hsiao TC (1982). Physiological responses to moderate water stress. In *Physiological plant ecology II* (pp. 263–324). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bray EA (2002). Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Annals of botany*,

89, 803-811.

Bresson J, Vasseur F, Dauzat M, Koch G, Granier C, Vile D (2015). Quantifying spatial heterogeneity of chlorophyll fluorescence during plant growth and in response to water stress. *Plant Methods* **11**, 23.

Breuer C, Ishida T, Sugimoto K (2010). Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 654–660.

Brix H (1962). The effect of water stress on the rates of photosynthesis and respiration in tomato plants and loblolly pine seedlings. *Physiologia Plantarum* **15**, 10–20.

Brouwer R (1962). Nutritive influences on the distribution of dry matter in the plant. *Netherlands Journal of Agricultural Science* **10**, 399–408.

Bünger-Kibler S, Bangerth F (1983). Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regulation* **1**, 143–154.

Burke JJ, Gamble PE, Hatfield JL, & Quisenberry JE (1985). Plant morphological and biochemical responses to field water deficits: I. Responses of glutathione reductase activity and paraquat sensitivity. *Plant physiology*, **79**, 415-419.

Cabrera-Bosquet L, Fournier C, Brichet N, Welcker C, Suard B, Tardieu F (2016). High-throughput estimation of incident light, light interception and radiation-use efficiency of thousands of plants in a phenotyping platform. *New Phytologist* **212**, 269–281.

Cantore V, Boari F, Caliandro A (2000). Effect of split-root-system water stress on physiological and morphological aspects of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Horticulturae* **537**, 321–328.

Casadebaig P, Debaeke P, Lecoeur J (2008). Thresholds for leaf expansion and transpiration response to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. *European Journal of Agronomy* **28**, 646–654.

Causse M, Chaïb J, Lecomte L, Buret M, Hospital F (2007). Both additivity and epistasis control the genetic variation for fruit quality traits in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **115**, 429–442.

Challa H, Schapendonk AHCM (1986). Dynamic optimization of CO₂ concentration in relation to climate control in greenhouses. *Carbon Dioxide Enrichment of Greenhouse Crops Vol. I*, 147–160.

Champagne C, Sinha N (2004). Compound leaves: equal to the sum of their parts? *Development* **131**, 4401–4412.

Chapuis R, Delluc C, Debeuf R, Tardieu F, Welcker C (2012). Resiliences to water deficit in a phenotyping platform and in the field: How related are they in maize? *European Journal of Agronomy* **42**, 59–67.

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório ML, ... & Pinheiro C (2002). How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of botany*, **89**, 907-916.

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003). Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**, 239–264.

Cheniclet C, Rong WY, Causse M, Frangne N, Bolling L, Carde J-P, Renaudin J-P (2005). Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiology* **139**, 1984-1994.

Chevalier C (2007). Cell cycle control and fruit development. In *Annual Plant Reviews Volume 32: Cell*

Cycle Control and Plant Development, pp269–293. Wiley-Blackwell.

Chevalier C, Nafati M, Mathieu-Rivet E, Bourdon M, Frangne N, Cheniclet C, ... & Hernould M (2011). Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. *Annals of Botany* **107**, 1159-1169.

Chevalier C, Bourdon M, Pirrello J, Cheniclet C, Gévaudant F, Frangne N (2014). Endoreduplication and fruit growth in tomato: evidence in favour of the karyoplasmic ratio theory. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2731–2746.

Chiera J, Thomas J, Rufty T (2002). Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. . Oxford University Press *Journal of Experimental Botany* **53**, 473–481.

Ciais P, Reichstein M, Viovy N, Granier A, Ogée J, Allard V, Aubinet M, Buchmann N, Bernhofer C, Carrara A, Chevallier F, De Noblet N, Friend AD, Friedlingstein P, Grünwald T, Heinesch B, Keronen P, Knohl A, Krinner G, Loustau D, Manca G, Matteucci G, Miglietta F, Ourcival JM, Papale D, Pilegaard K, Rambal S, Seufert G, Soussana JF, Sanz MJ, Schulze ED, Vesala T, Valentini R (2005). Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* **437**, 529.

Clauw P, Coppens F, De Beuf K, Dhondt S, Van Daele T, Maleux K, Storme V, Clement L, Gonzalez N, Inzé D (2015). Leaf responses to mild drought stress in natural variants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **167**, 800 LP-816.

Cleveland WS (1979). Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *Journal of the American Statistical Association* **74**, 829–836.

Cookson SJ, Chenu K, Granier C (2007). Day length affects the dynamics of leaf expansion and cellular development in *Arabidopsis thaliana* partially through floral transition timing. *Annals of Botany* **99**, 703–711.

Cookson SJ, Granier C (2006). A dynamic analysis of the shade-induced plasticity in *Arabidopsis thaliana* rosette leaf development reveals new components of the shade-adaptative response. *Annals of Botany* **97**, 443–452.

Cookson SJ, Van Lijsebettens M, Granier C (2005). Correlation between leaf growth variables suggest intrinsic and early controls of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **28**, 1355–1366.

Coupel-Ledru A, Lebon É, Christophe A, Doligez A, Cabrera-Bosquet L, Péchier P, Hamard P, This P, Simonneau T (2014). Genetic variation in a grapevine progeny (*Vitis vinifera* L. cvs GrenachexSyrah) reveals inconsistencies between maintenance of daytime leaf water potential and response of transpiration rate under drought. *Journal of Experimental Botany* **65**, 6205–6218.

Cowan AK, Moore-Gordon CS, Bertling I, Wolstenholme BN (1997). Metabolic control of avocado fruit growth (isoprenoid growth regulators and the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase). *Plant Physiology* **114**, 511 LP-518.

Craufurd PQ, Flower DJ, & Peacock JM (1993). Effect of heat and drought stress on sorghum (*Sorghum bicolor*). I. Panicle development and leaf appearance. *Experimental Agriculture*, **29**, 61-76.

Cuartero J, Fernández-Muñoz R (1998). Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae* **78**, 83–125.

Czerednik A, Busscher M, Bielen BAM, Wolters-Arts M, de Maagd RA, Angenent GC (2012). Regulation of tomato fruit pericarp development by an interplay between CDKB and CDKA1 cell cycle genes. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2605–2617.

- Dale A (1976).** Prospects for breeding higher yielding raspberries. In *Acta Horticulturae*, pp159–168.
- Dambreville A, Griolet M, Rolland G, Dauzat M, Bédiée A, Balsera C, Muller B, Vile D, Granier C (2017).** Phenotyping oilseed rape growth-related traits and their responses to water deficit: The disturbing pot size effect. *Functional Plant Biology* **44**, 35–45.
- Dambreville A, Lauri P-É, Trottier C, Guédon Y, Normand F (2013).** Deciphering structural and temporal interplays during the architectural development of mango trees. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2467–2480.
- Dauzat M, Bresson J, Vile D, Koch G, Desigaux M, Granier C (2016).** PHENOPSIS Quelles évolutions technologiques du premier automate de phénotypage des plantes? *INRA Technical revue* **89**, 1–20.
- De Rouw A, & Winkel T (1998).** Drought avoidance by asynchronous flowering in pearl millet stands cultivated on-farm and on-station in Niger. *Experimental Agriculture*, **34**, 19-39.
- Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacqmard A, Kilby NJ, Murray JAH (2003).** Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-Type Cyclin CYCD3. *The Plant Cell* **15**, 79 LP-92.
- Donnelly P, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG (1999).** Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Developmental biology* **215**, 407–19.
- Dorn LA, Pyle EH, Schmitt J (2000).** Plasticity to light cues and resources in Arabidopsis thaliana: Testing for adaptive value and costs. *Evolution* **54**, 1982–1994.
- Dosio GAA, Tardieu F, Turc O (2010).** Floret initiation, tissue expansion and carbon availability at the meristem of the sunflower capitulum as affected by water or light deficits. *New Phytologist* **189**, 94–105.
- Dreesen FE, De Boeck HJ, Janssens IA, Nijs I (2012).** Summer heat and drought extremes trigger unexpected changes in productivity of a temperate annual/biannual plant community. *Environmental and Experimental Botany* **79**, 21–30.
- De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, De Almeida Engler J, Ormenese S, Maes S, Naudts M, Van der Schueren E, Jacqmard A, Engler G, Inzé D (2002).** Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO Journal* **21**, 1360–1368.
- De Veylder L, Larkin JC, Schnittger A (2011).** Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends in Plant Science* **16**, 624–634.
- Du L, Tian Q, Yu T, Meng Q, Jancso T, Udvardy P, Huang Y (2013).** A comprehensive drought monitoring method integrating MODIS and TRMM data. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* **23**, 245–253.
- Durand J-L, Onillon B, Schnyder H, Rademacher I (1995).** Drought effects on cellular and spatial parameters of leaf growth in tall fescue. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1147–1155.
- Edgar BA, Zielke N, Gutierrez C (2014).** Endocycles: A recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 197–210.
- Eghball B, Maranville JW (1993).** Root development and nitrogen influx of corn genotypes grown under combined drought and nitrogen stresses. *Agronomy Journal* **85**, 147.
- Ehret DL, Ho LC (1986).** The effects of salinity on dry matter partitioning and fruit growth in tomatoes grown in nutrient film culture. *Journal of Horticultural Science* **61**, 361–367.
- Fanasca S, Martino A, Heuvelink E, Stanghellini C (2007).** Effect of electrical conductivity, fruit

pruning, and truss position on quality in greenhouse tomato fruit. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **82**, 488–494.

Ferjani A, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H (2007). Analysis of leaf development in fugu mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *American Society of Plant Biologists Plant physiology* **144**, 988–99.

Fernandez AI, Viron N, Alhaghdow M, Karimi M, Jones M, Amsellem Z, Sicard A, Czerednik A, Angenent G, Grierson D, May S, Seymour G, Eshed Y, Lemaire-Chamley M, Rothan C, Hilson P (2009). Flexible tools for gene expression and silencing in Tomato. *Plant Physiology* **151**, 1729–1740.

Fishman S, Génard M (1998). A biophysical model of fruit growth: Simulation of seasonal and diurnal dynamics of mass. *Plant, Cell and Environment* **21**, 739–752.

Fleming AJ (2007). Cell Cycle Control During Leaf Development. In, *Cell Cycle Control and Plant Development* Ed. Wiley-Blackwell **32**, 203–226.

Foolad MR (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International journal of plant genomics* **2007**, 64358.

Gary C, Bertin N (1992). La surface spécifique foliaire comme indicateur de l'équilibre source-puits chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Bulletin de la société d'écophysiologie* **17**, 121–127.

Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* **37**, 263–285.

Gázquez A, Beemster GT (2017). What determines organ size differences between species? A meta-analysis of the cellular basis. *New Phytologist* **215**, 299–308.

Génard M, Gibert C, Bruchou C, & Lescourret F (2009). An intelligent virtual fruit model focussing on quality attributes. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **84**, 157-163.

Génard M, Bertin N, Borel C, Bussièrès P, Gautier H, Habib R, Léchaudel M, Lecomte A, Lescourret F, Lobit P, Quilot B (2007). Towards a virtual fruit focusing on quality: Modelling features and potential uses. *Journal of Experimental Botany* **58**, 917–928.

Gillaspy G (1993). Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell* **5**, 1439–1451.

Giovannoni JJ (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* **16**, 170-180.

Gonzalez N, Gévaudant F, Hernould M, Chevalier C, Mouras A (2007). The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *Plant Journal* **51**, 642–655.

Gonzalez N, Vanhaeren H, Inzé D (2012). Leaf size control: Complex coordination of cell division and expansion. *Trends in Plant Science* **17**, 332–340.

Gormley TR, Maher M (1990). Tomato fruit quality-an interdisciplinary approach. *Professional Horticulture*, **4**, 107–112.

Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Cookson SJ, Dauzat M, Dauzat M, Hamard P, Hamard P, Thioux J, Thioux J, Bouchier-combaud S, Bouchier-combaud S, Lebaudy A, Lebaudy A, Muller B, Muller B, Simonneau T, Simonneau T (2006). PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *A. thaliana*. *New Phytologist* **169**, 623–635.

Granier C, Inze D, Tardieu F (2000). Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34cdc2 kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water

conditions. *Plant Physiology* **124**, 1393–1402.

Granier C, Massonnet C, Turc O, Muller B, Chenu K, Tardieu F (2002). Individual leaf development in *Arabidopsis thaliana*: A stable thermal-time-based programme. *Annals of Botany* **89**, 595–604.

Granier C, Tardieu F (1998). Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycle in sunflower leaves a common pattern of development for all zones of a leaf and different leaves of a plant. *Plant Physiology* **116**, 991–1001.

Granier C, Tardieu F (1999a). Leaf expansion and cell division are affected by reducing absorbed light before but not after the decline in cell division rate in the sunflower leaf. *Plant, Cell and Environment* **22**, 1365–1376.

Granier C, Tardieu F (1999b). Water deficit and spatial pattern of leaf development. variability in responses can be simulated using a simple model of leaf development. *Plant Physiology* **119**, 609–620.

Gratani L (2014). Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. *Advances in botany*.

Guichard S, Gary C, Leonardi C, Bertin N (2005). Analysis of growth and water relations of tomato fruits in relation to air vapor pressure deficit and plant fruit load. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**, 201.

Guillet C, Aboul-Soud MAM, Menn L Le, Viron A, Pribat N (2012). Regulation of the fruit-specific PEP carboxylase SLPPC2 promoter at early stages of tomato fruit development. *PLoS ONE* **7**, 36795.

Hao X, Papadopoulos AP, Dorais M, Ehret DL, Turcotte G, Gosselin A (2000). Improving tomato fruit quality by raising the ec of nft nutrient solutions and calcium spraying: Effects on growth, photosynthesis, yield and quality. *Acta Horticulturae* **511**, 213–221.

Hareven D, Gutfinger T, Parnis A, Eshed Y, Lifschitz E (1996). The making of a compound leaf: Genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell* **84**, 735–744.

Hemerly A, Engler J de A, Bergounioux C, Van Montagu M, Engler G, Inzé D, Ferreira P (1995). Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *The EMBO Journal* **14**, 3925–3936.

Heuvelink E, Bertin N (1994). Dry-matter partitioning in a tomato crop: comparison of two simulation models. *Journal of Horticultural Science* **69**, 885–903.

Heuvelink E, Buiskool RPM (1995). Influence of Sink-Source Interaction on Dry Matter Production in Tomato. *Annals of Botany* **75**, 381–389.

Heuvelink E, Dorais M (2005). Crop growth and yield in tomatoes. CAB international *Tomatoes* **13**, 85–144.

Higashi K, Hosoya K, Ezura H (1999). Histological analysis of fruit development between two melon (*Cucumis melo L. reticulatus*) genotypes setting a different size of fruit. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1593–1597.

Hisanaga T, Kawade K, Tsukaya H (2015). Compensation: a key to clarifying the organ-level regulation of lateral organ size in plants. **66**, 1–9.

Ho LC (1996). The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1239–1243.

Ho LC, Hewitt JD (1986). Fruit development. In *The Tomato Crop: A scientific basis for improvement* Eds JG Atherton & J Rudich, pp201–239. Springer Netherlands: Dordrecht.

- Horiguchi G, Fujikura U, Ferjani A, Ishikawa N, Tsukaya H (2006).** Large-scale histological analysis of leaf mutants using two simple leaf observation methods: Identification of novel genetic pathways governing the size and shape of leaves. *Plant Journal* **48**, 638–644.
- Horiguchi G, Tsukaya H (2011).** Organ size regulation in plants: insights from compensation. *Frontiers in Plant Science* **2**, 24.
- Hsiao TC (1993).** Growth and Productivity of Crops in Relation To Water Status. *Acta Horticulture, Irrigation of Horticultural Crops* **335**, 137–148.
- Hu Y, Poh HM, Chua N-H (2006).** The Arabidopsis ARGOS-LIKE gene regulates cell expansion during organ growth. *The Plant Journal* **47**, 1–9.
- Huh SM, Noh EK, Kim HG, Jeon BW, Bae K, Hu HC, ... & Park OK (2010).** Arabidopsis annexins AnnAt1 and AnnAt4 interact with each other and regulate drought and salt stress responses. *Plant and Cell Physiology*, **51**, 1499-1514.
- Hunter C, Sun H, Poethig RS (2003).** The Arabidopsis heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member. *Current Biology* **13**, 1734–1739.
- Ojeda H, Deloire A, Carbonneau A (2001).** Influence of water deficits on grape berry growth. *Vitis* **40**, 141–145.
- John PCL, Qi R (2008).** Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. *Trends in Plant Science* **13**, 121–127.
- Johnson RW, Dixon MA, Lee DR (1992).** Water relations of the tomato during fruit growth. *Plant, Cell & Environment* **15**, 947–953.
- Jordan WR (1982).** Whole plant response to water deficits: An overview. *American Society of Agronomy*, in press.
- Jullien A, Munier-Jolain NG, Malézieux E, Chillet M, Ney B (2001).** Effect of pulp cell number and assimilate availability on dry matter accumulation rate in a banana fruit. *Annals of Botany* **88**, 321–330.
- Kaplan DR (2001).** Fundamental concepts of leaf morphology and morphogenesis: a contribution to the interpretation of molecular genetic mutants. *International Journal of Plant Sciences* **162**, 465–474.
- Kaplan DR (1975).** Comparative developmental evaluation of the morphology of unifacial leaves in the monocotyledons. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* **95**: 1–105.
- Kaplan DR, Hagemann W (1991).** The relationship of cell and organism in vascular plants. *BioScience* **41**, 693–703.
- Katagiri Y, Hasegawa J, Fujikura U, Hoshino R, Matsunaga S, Tsukaya H (2016).** The coordination of ploidy and cell size differs between cell layers in leaves. *Development* **143**, 1120–1125.
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weini S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K (2007).** The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal* **50**, 347–363.
- Kinet JM, Hurdebise D, & Stainer R (1978).** Les régulateurs de croissance peuvent-ils compenser l'effet néfaste des conditions d'éclaircissement hivernales sur la floraison de la tomate?. *Revue de l'agriculture*.

- Koch G, Rolland G, Dauzat M, Bédiée A, Baldazzi V, Bertin N, Guédon Y, Granier C (2018).** Are compound leaves more complex than simple ones? A multi-scale analysis. *Annals of Botany*, 1–13.
- Koch G, Dambreville A, Rolland G, Bertin N, Granier C (2017).** A multi-scale pipeline for reproducible analyses of tomato leaf expansion and its plasticity. *Acta Horticulturae*, 105–112.
- Kramer PJ (1963).** Water Stress and Plant Growth. *Agronomy Journal* **55**, 31–35.
- Kudo N, Kimura Y (2001).** Flow cytometric evidence for endopolyploidy in seedlings of some Brassica species. *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 104–110.
- Lechner L, Pereyra-Irujo GA, Granier C, Aguirrezábal LAN (2008).** Rewatering plants after a long water-deficit treatment reveals that leaf epidermal cells retain their ability to expand after the leaf has apparently reached its final size. *Annals of Botany* **101**, 1007–1015.
- Lecoeur J, Wery J, Turc O, Tardieu F (1995).** Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1093–1101.
- Lee DR (1989).** Vasculature of the abscission zone of tomato fruit: implications for transport. *Canadian Journal of Botany* **67**, 1898–1902.
- Lee H-C, Chiou D-W, Chen W-H, Markhart AH, Chen Y-H, Lin T-Y (2004).** Dynamics of cell growth and endoreduplication during orchid flower development. *Plant Science* **166**, 659–667.
- Leonard M, Kinet JM, Bodson M, & Bernier G (1983).** Enhanced inflorescence development in tomato by growth substance treatments in relation to ¹⁴C-assimilate distribution. *Physiologia Plantarum*, **57**, 85-89.
- Lièvre M, Granier C, Guédon Y (2016).** Identifying developmental phases in the Arabidopsis thaliana rosette using integrative segmentation models. *New Phytologist* **210**, 1466–1478.
- Liu H-F, Génard M, Guichard S, Bertin N (2007).** Model-assisted analysis of tomato fruit growth in relation to carbon and water fluxes. *Journal of experimental botany* **58**, 3567–80.
- Lohmann JU, Weigel D (2002).** Building beauty: The genetic control of floral patterning. *Developmental Cell* **2**, 135–142.
- Lozano R, Giménez E, Cara B, Capel J, Angosto T (2009).** Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Developmental Biology* **53**, 1635–1648.
- Luchaire N, Rienth M, Romieu C, Nehe A, Chatbanyong R, Houel C, ... & Torregrosa L (2017).** Microvine: a new model to study grapevine growth and developmental patterns and their responses to elevated temperature. *American Journal of Enology and Viticulture*, **68**, 283-292.
- Ludlow MM (1989).** Strategies in response to water stress. In *Structural and functional responses to environmental stresses: water shortage*, pp269–281. SBP Academic.
- Lynch J (1995).** Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology* **109**, 7–13.
- Machado S, Paulsen GM (2001).** Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. *Plant and Soil* **233**, 179–187.
- Mahalakshmi V, Bidinger FR, & Raju DS (1987).** Effect of timing of water deficit on pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Field Crops Research*, **15**, 327-339.
- Mahalakshmi V, & Bidinger FR (1985a).** Flowering response of pearl millet to water stress during panicle development. *Annals of applied biology*, **106**, 571-578.

- Mahalakshmi V, & Bidinger FR (1985b).** Water stress and time of floral initiation in pearl millet. *The Journal of Agricultural Science*, **105**, 437-445.
- Mapelli S, Frova C, Torti G, Soressi GP (1978).** Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant and Cell Physiology* **19**, 1281–1288.
- Massonnet C, Tisne S, Radziejwoski A, Vile D, De Veylder L, Dauzat M, Granier C (2011).** New insights into the control of endoreduplication: endoreduplication could be driven by organ growth in Arabidopsis leaves. *Plant Physiology* **157**, 2044–2055.
- Mathieu-Rivet E, Gévaudant F, Cheniclet C, Hernould M, Chevalier C (2010).** The Anaphase Promoting Complex activator CCS52A, a key factor for fruit growth and endoreduplication in Tomato. *Plant signaling & behavior* **5**, 985–987.
- Mazdiyasi O, AghaKouchak A (2015).** Substantial increase in concurrent droughts and heatwaves in the United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 11484–9.
- McAtee PA, Hallett IC, Johnston JW, Schaffer RJ (2009).** A rapid method of fruit cell isolation for cell size and shape measurements. *Plant methods* **5**, 5.
- Melaragno JE (1993).** Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of Arabidopsis. *The Plant Cell* **5**, 1661–1668.
- Mingo DM, Bacon MA, Davies WJ (2003).** Non-hydraulic regulation of fruit growth in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv. Solairo) growing in drying soil. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1205–1212.
- Mitchell JP, Shennan C, Grattan SR, May DM (1991).** Tomato fruit yields and quality under water deficit and salinity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **116**, 215–221.
- Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y (2011).** Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1715–1729.
- Murneek AE (1924).** The effects of fruit on vegetative growth in plants. In *Proceeding of the American Society of Horticultural Science* vol 21, p274.
- Nafati M, Cheniclet C, Hernould M, Do PT, Fernie AR, Chevalier C, Gévaudant F (2011).** The specific overexpression of a cyclin-dependent kinase inhibitor in tomato fruit mesocarp cells uncouples endoreduplication and cell growth. *Plant Journal* **65**, 543–556.
- Najla S, Vercambre G, Pages L, Grasselly D, Gautier H, & Genard M (2009).** Tomato plant architecture as affected by salinity: descriptive analysis and integration in a 3-D simulation model. *Botany*, **87**, 893-904.
- Nakhforoosh A, Bodewein T, Fiorani F, Bodner G (2016).** Identification of water use strategies at early growth stages in durum wheat from shoot phenotyping and physiological measurements. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1155.
- Nelissen H, Gonzalez N, Inzé D (2016).** Leaf growth in dicots and monocots: So different yet so alike.. *Current Opinion in Plant Biology* **33**, 72–76.
- Nuruddin M, Madramootoo C a, Dodds GT (2003).** Effects of water stress at different growth stages on greenhouse tomato yield and quality. *HortScience* **38**, 1389–1393.
- Okello RCO, Heuvelink E, de Visser PHB, Struik PC, Marcelis LFM (2015).** What drives fruit growth? *Functional Plant Biology* **42**, 817–827.

- Paredes M, Quiles MJ (2013).** Stimulation of chlororespiration by drought under heat and high illumination in *Rosa meilandina*. *Journal of Plant Physiology* **170**, 165–171.
- Passioura JB (1983).** Roots and drought resistance. *Agricultural Water Management* **7**, 265–280.
- Pervez M.A., Ayub C.M., Khan H.A., Shahid M.A., Ashraf I. (2009).** Effect of drought stress on growth, yield and seed quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* **46** (3).
- Pigliucci M, Schlichting CD, Whitton J (1995).** Reaction norms of *Arabidopsis*. II. Response to stress and Unordered environmental variation. *Functional Ecology* **9**, 537–547.
- Poethig RS, Sussex IM (1985).** The cellular parameters of leaf development in tobacco: a clonal analysis. *Planta* **165**, 170–184.
- Poorter H, Niinemets Ü, Poorter L, Wright IJ, & Villar R (2009).** Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New phytologist*, **182**, 565-588.
- Price AH, Tomos AD, Virk DS (1997).** Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.): a hydroponic screen. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 132–142.
- Prieto MH, Lavado M, Moñino MJ, García. MI (2000).** Root water absorption pattern in a processing tomato crop under different irrigation strategies. *Acta Horticulturae* **537**, 839–845.
- Prudent M, Causse M, Génard M, Tripodi P, Grandillo S, Bertin N (2009).** Genetic and physiological analysis of tomato fruit weight and composition: Influence of carbon availability on QTL detection. *Journal of Experimental Botany* **60**, 923–937.
- Pyke KA, Marrison JL, Leech AM (1991).** Temporal and spatial development of the cells of the expanding first leaf of *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Journal of Experimental Botany* **42**, 1407–1416.
- Ranc N, Múos S, Santoni S, Causse M (2008).** A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (solanaceae). *BMC Plant Biology* **8**, 1–16.
- Rauf S, Sadaqat H (2008).** Identification of physiological traits and genotypes combined to high achene yield in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under contrasting water regimes. *Australian Journal of Crop Sciences* **1**, 23–30.
- Rawson HM, Turner NC (1982).** Recovery from water stress in five sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars. I. Effects of the timing of water application on leaf area and seed production. *Australian Journal of Plant Physiology* **9**, 437–448.
- Renaudin J-P, Deluche C, Cheniclet C, Chevalier C, Frangne N (2017).** Cell layer-specific patterns of cell division and cell expansion during fruit set and fruit growth in tomato pericarp. *Journal of Experimental Botany* **68**, 1613–1623.
- Reymond M, Muller B, Leonardi A, Charcosset A, Tardieu F (2003).** Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyze the genetic variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiology* **131**, 664-675.
- Ripoll J, Bertin N, Bidet LPR, Urban L (2016a).** A User's view of the parameters derived from the induction curves of maximal chlorophyll a fluorescence: perspectives for analyzing stress. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1–6.
- Ripoll J, Urban L, Brunel B, Bertin N (2016b).** Water deficit effects on tomato quality depend on fruit developmental stage and genotype. *Journal of Plant Physiology* **190**, 26–35.

- Ripoll J, Urban L, Staudt M, Lopez-Lauri F, Bidel LPR, Bertin N (2014).** Water shortage and quality of fleshy fruits—making the most of the unavoidable. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4097–4117.
- Rodríguez NH, Ramírez SM, Varela MTTB, Guillem M, Puig J, Larrotcha E, Flores J (2010).** Re-use of drinking water treatment plant (DWTP) sludge: Characterization and technological behaviour of cement mortars with atomized sludge additions. *Cement and Concrete Research* **40**, 778–786.
- Rodriguez RE, Debernardi JM, Palatnik JF (2014).** Morphogenesis of simple leaves: Regulation of leaf size and shape. *Developmental Biology* **3**, 41–57.
- Roeder AHK, Chickarmane V, Cunha A, Obara B, Manjunath BS, Meyerowitz EM (2010).** Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology* **8**, e1000367.
- Rymen B, Fiorani F, Kartal F, Vandepoele K, Inze D, Beemster GTS (2007).** Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiology* **143**, 1429–1438.
- Salah HBH, Tardieu F (1997).** Control of leaf expansion rate of droughted maize plants under fluctuating evaporative demand (a superposition of hydraulic and chemical messages?). *Plant Physiology* **114**, 893–900.
- Salter PJ (1958).** The effects of different water-regimes on the growth of plants under glass: iv. vegetative growth and fruit development in the tomato. *Journal of Horticultural Science* **33**, 1–12.
- Scholes DR, Paige KN (2015).** Plasticity in ploidy: a generalized response to stress. *Trends in Plant Science* **20**, 165–175.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, ... & Shinozaki K (2001).** Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell*, **13**, 61–72.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002).** Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* **31**, 279–292.
- Sharp RE, Davies WJ (1979).** Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants. *Planta* **147**, 43–49.
- Skirycz A, Inzé D (2010).** More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* **21**, 197–203.
- Skirycz A, Vandenbroucke K, Clauw P, Maleux K, De Meyer B, Dhondt S, Pucci A, Gonzalez N, Hoerberichts F, Tognetti VB, Galbiati M, Tonelli C, Van Breusegem F, Vuylsteke M, Inzé D (2011).** Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal. *Nature Biotechnology* **29**, 212.
- Sonneveld C, Welles GWH (1988).** Yield and quality of rockwool-grown tomatoes as affected by variations in EC-value and climatic conditions. *Plant and Soil* **111**, 37–42.
- Spitters CJT, Van Keulen H, Van Kraalingen DWG (1989).** A simple and universal crop growth simulator: SUCROS87. In *Simulation and systems management in crop protection*, pp147–181.
- Spollen WG, Sharp RE (1991).** Spatial Distribution of Turgor and Root Growth at Low Water Potentials. *Plant Physiology* **96**, 438 LP-443.
- ter Steege MW (2005).** Genetic and Physiological Architecture of Early Vigor in *Aegilops tauschii*, the

D-Genome Donor of Hexaploid Wheat. A Quantitative Trait Loci Analysis. *Plant Physiology* **139**, 1078–1094.

Sugimoto-Shirasu K, Roberts K (2003). ‘Big it up’: Endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 544–553.

Szalonek M, Sierpien B, Rymaszewski W, Gieczewska K, Garstka M, Lichocka M, Sass L, Paul K, Vass I, Vankova R, Dobrev P, Szczesny P, Marczewski W, Krusiewicz D, Strzelczyk-Zyta D, Hennig J, Konopka-Postupolska D (2015). Potato Annexin STANN1 promotes drought tolerance and mitigates light stress in transgenic solanum tuberosum l. plants. *PLOS ONE* **10**, 1–38.

Székely G, Ábrahám E, Cséplő Á, Rigó G, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J, Schmelzer E, Koncz C, Szabados L (2007). Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal* **53**, 11–28.

Tardieu F (2012). Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *Journal of Experimental Botany* **63**, 25–31.

Tardieu F, Granier C, Muller B (2011). Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 283–289.

Tardieu F, Tuberosa R (2010). Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 206–212.

Tardieu F (2003). Virtual plants: Modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends in Plant Science* **8**, 9–14.

Tardieu F, Granier C (2000). Quantitative analysis of cell division in leaves: methods, developmental patterns and effects of environmental conditions. *Plant Molecular Biology* **43**, 555–567.

Tardieu F, Reymond M, Hamard P, Granier C, Muller B (2000). Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: A synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1505–1514.

Tardieu F, Granier C, & Muller B (1999). Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate?. *The New Phytologist*, **143**, 33-43.

Thompson DS (2001). Extensiometric determination of the rheological properties of the epidermis of growing tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1291–1301.

Thornley JHM, Hurd RG, Pooley A (1981). A model of growth of the fifth leaf of tomato. *Annals of Botany* **48**, 327–340.

Tisné S, Barbier F, Granier C (2011). The ERECTA gene controls spatial and temporal patterns of epidermal cell number and size in successive developing leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of botany* **108**, 159–68.

Tisné S, Reymond M, Vile D, Fabre J, Dauzat M, Koornneef M, Granier C (2008). Combined genetic and modeling approaches reveal that epidermal cell area and number in leaves are controlled by leaf and plant developmental processes in Arabidopsis. *Plant physiology* **148**, 1117–27.

Tisné S, Serrand Y, Bach L, Gilbault E, Ben Ameer R, Balasse H, Voisin R, Bouchez D, Durand-Tardif M, Guerche P, Chareyron G, Da Rugna J, Camilleri C, Loudet O (2013). Phenoscope: an automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *The Plant Journal* **74**, 534–544.

Tojo T, Tsuda K, Yoshizumi T, Ikeda A, Yamaguchi J, Matsui M, Yamazaki K (2009). Arabidopsis MBF1s control leaf cell cycle and its expansion. *Plant & cell physiology* **50**, 254–64.

- Tsukaya H (2002).** Leaf Development. *The Arabidopsis Book* **37**, 1.
- Tsukaya H (2003).** Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 57–62.
- Tsukaya H (2008).** Controlling size in multicellular organs: Focus on the leaf. *PLoS Biology* **6**, 1373–1376.
- Tsukaya H (2013).** Does ploidy level directly control cell size? Counterevidence from arabidopsis genetics. *E PLoS ONE* **8**, e83729.
- Tsukaya H (2014).** Comparative leaf development in angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology* **17**, 103–109.
- Tsukaya H, Beemster GTS (2006).** Genetics, cell cycle and cell expansion in organogenesis in plants. *Journal of Plant Research* **119**, 1–4.
- Tuberosa R (2012).** Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Frontiers in Physiology* **3**, 347.
- Turc O, Lecoeur J (1997).** Leaf primordium initiation and expanded leaf production are co-ordinated through similar response to air temperature in pea (*Pisum sativum* L.). *Annals of Botany* **80**, 265–273.
- Turc O, Tardieu F (2018).** Drought affects abortion of reproductive organs by exacerbating developmentally driven processes via expansive growth and hydraulics. *Journal of Experimental Botany* **69**, 3245–3254.
- Urban L, Aarrouf J, Bidel LPR (2017).** Assessing the effects of water deficit on photosynthesis using parameters derived from measurements of leaf gas exchange and of chlorophyll a fluorescence. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1–18.
- Usami T, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H (2009).** The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. *Development* **136**, 955–964.
- Vanhaeren H, Inzé D, Gonzalez N (2016).** PLANT GROWTH BEYOND LIMITS. *Trends in Plant Science* **21**, 102–109.
- Van Ieperen W (1996a)** Consequences of diurnal variation in salinity on water relations and yield of tomato. *Ph.D. Dissertation. Wageningen Agricultural University, Wageningen*: 176
- Van Ieperen W (1996b).** Effects of different day and night salinity levels on vegetative growth, yield and quality of tomato. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **71**, 99–111.
- Varga A, Bruinsma J (1986).** Tomato. In *Handbook of fruit set and development*, pp461–481. 42 .
- Verkest A, Manes C-L de O, Vercruyssen S, Maes S, Van Der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inzé D, De Veylder L (2005).** The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *The Plant cell* **17**, 1723–36.
- Vile D, Pervent M, Belluau M, Vasseur F, Bresson J, Muller B, Granier C, Simonneau T (2012).** *Arabidopsis* growth under prolonged high temperature and water deficit: Independent or interactive effects? *Plant, Cell and Environment* **35**, 702–718.
- Webber H, Ewert F, Olesen JE, Müller C, Fronzek S, Ruane AC, Bourgault M, Martre P, Ababaei B, Bindi M, Ferrise R, Finger R, Fodor N, Gabaldón-Leal C, Gaiser T, Jabloun M, Kersebaum K-C, Lizaso JJ, Lorite IJ, Manceau L, Moriondo M, Nendel C, Rodríguez A, Ruiz-Ramos M, Semenov MA, Siebert S, Stella T, Stratonovitch P, Trombi G, Wallach D (2018).** Diverging importance of drought stress for

maize and winter wheat in Europe. *Nature Communications* **9**, 4249.

Westgate ME, Boyer JS (1985). Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* **164**, 540–549.

Westgate ME, Boyer JS (1986). Reproduction at Low and pollen water potentials in maize. *Crop Science* **26**, 951–956.

Winkel W, & Hudde H (1997). Long-term trends in reproductive traits of tits (*Parus major*, *P. caeruleus*) and pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Journal of avian biology*, 187-190.

Wopereis MCS, Kropff MJ, Maligaya AR, & Tuong TP (1996). Drought-stress responses of two lowland rice cultivars to soil water status. *Field Crops Research*, **46**, 21-39.

Wuyts N, Massonnet C, Dautat M, Granier C (2012). Structural assessment of the impact of environmental constraints on *Arabidopsis thaliana* leaf growth: A 3D approach. *Plant, Cell and Environment* **35**, 1631–1646.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994). A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* **6**, 251-264.

Yegappan TM, Paton DM, Gates CT, Muller WJ (1982). Water stress in sunflower (*helianthus annuus* l.) 2. effects on leaf cells and leaf area. *Annals of Botany*. **49**, 63–68.

Yordanov I, Tsonev T, Goltsev V, Kruleva VV L (1997). Interactive effect of water deficit and high temperature on photosynthesis of sunflower and maize plants. *Photosynthetica*, 391–402.

Zotz G, Wilhelm K, Becker A (2011). Heteroblasty-A Review. *The Botanical Review* **77**, 109–151.

ANNEXES

Are compound leaves more complex than simple ones? A multi-scale analysis

Garance Koch^{1,2}, Gaëlle Rolland¹, Myriam Dauzat¹, Alexis Bédiée¹, Valentina Baldazzi^{2,3,4},
Nadia Bertin², Yann Guédon⁵ and Christine Granier^{1,5,*}

¹LEPSE, Université de Montpellier, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France, ²INRA, UR 1115 PSH, F-84914 Avignon, France, ³ISA, INRA, CNRS, Université Côte d'Azur, France, ⁴BIOCORE, Inria, INRA, CNRS, UPMC Université de Paris 06, Université Côte d'Azur, France and ⁵AGAP, Université de Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France
*For correspondence. E-mail christine.granier@inra.fr

Received: 8 February 2018 Returned for revision: 23 April 2018 Editorial decision: 30 May 2018 Accepted: 6 June 2018

- **Background and Aims** The question of which cellular mechanisms determine the variation in leaf size has been addressed mainly in plants with simple leaves. It is addressed here in tomato taking into consideration the expected complexity added by the several lateral appendages making up the compound leaf, the leaflets.
- **Methods** Leaf and leaflet areas, epidermal cell number and areas, and endoreduplication (co-) variations were analysed in *Solanum lycopersicum* considering heteroblastic series in a wild type (Wva106) and an antisense mutant, the Pro_{35S}:Slccs52A^{AS} line, and upon drought treatments. All plants were grown in an automated phenotyping platform, PHENOPSIS, adapted to host plants grown in 7 L pots.
- **Key Results** Leaf area, leaflet area and cell number increased with leaf rank until reaching a plateau. In contrast, cell area slightly decreased and endoreduplication did not follow any trend. In the transgenic line, leaf area, leaflet areas and cell number of basal leaves were lower than in the wild type, but higher in upper leaves. Reciprocally, cell area was higher in basal leaves and lower in upper leaves. When scaled up at the whole sympodial unit, all these traits did not differ significantly between the transgenic line and the wild type. In response to drought, leaf area was reduced, with a clear dose effect that was also reported for all size-related traits, including endoreduplication.
- **Conclusions** These results provide evidence that all leaflets have the same cellular phenotypes as the leaf they belong to. Consistent with results reported for simple leaves, they show that cell number rather than cell size determines the final leaf areas and that endoreduplication can be uncoupled from leaf and cell sizes. Finally, they re-question a whole-plant control of cell division and expansion in leaves when the Wva106 and the Pro_{35S}:Slccs52A^{AS} lines are compared.

Key words: *Solanum lycopersicum*, compound leaf, leaflet, drought stress, cell division, cell expansion, endoreduplication, tomato.

INTRODUCTION

The remarkable variation in leaf shape and size among plants and within the same plant fascinates many scientists working in developmental biology. Because the regulation of leaf area expansion has a prominent role in light capture, photosynthesis, transpiration and thus plant biomass production, it has been the focus of many agronomic studies. Control of leaf area expansion at the cellular and molecular levels has been investigated for years in different model plants, providing insights into the complex regulation of leaf morphogenesis (Rodríguez *et al.*, 2014; Vanhaeren *et al.*, 2016). Each individual leaf is made up of cells that divide and expand at different rates and during different periods depending on species, genotypes, environmental conditions, leaf developmental stage, leaf tissue and cell type within a given tissue (Pyke *et al.*, 1991; Donnelly *et al.*, 1999; Tardieu *et al.*, 2000; Rymen *et al.*, 2007; Skirycz *et al.*, 2011; Wuyts *et al.*, 2012). The canonical cell cycle, resulting in cell division, involves a DNA duplication phase followed by mitosis. In some species, leaf cells can enter a cell cycle variant, the endoreduplication cycle, in which mitosis is skipped

and cells repeatedly replicate their DNA, resulting in endopolyploidy (Edgar *et al.*, 2014). Endopolyploid cells are generally larger than others, as shown in the epidermis of different organs such as leaf, stem and sepals in *Arabidopsis thaliana* (Melaragno *et al.*, 1993; Roeder *et al.*, 2010) and the pericarp of tomato fruits (Cheniclet *et al.*, 2005). The correlation between ploidy and cell size depends on cell identity. It is, for example, weaker in the palisade mesophyll cells than in the epidermis of *A. thaliana* leaves (Katagiri *et al.*, 2016).

The respective contributions of cell division and cell expansion to final leaf size and the inter-relationships between these processes have been analysed in both dicot and monocot simple leaves (Horiguchi *et al.*, 2006; Massonnet *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2012; Nelissen *et al.*, 2016). Despite different spatial and temporal organizations of these processes, several molecular mechanisms controlling leaf size are conserved between dicots and monocots (Nelissen *et al.*, 2016). The final leaf size is mainly determined by its cell number rather than the mean cell size. This has been observed in plants of the same genotype grown in various environmental conditions (see Granier *et al.*, 2000 for different species), in populations

of recombinant inbred lines (Ter Steege *et al.*, 2005 in *Aegilops tauschii*; Tisné *et al.*, 2008 in *A. thaliana*) and even for leaf size variation among species (Gazquez and Beemster, 2017). A few studies have shown that the variability in leaf size according to their rank was more related to changes in cell number than in cell size (Ashby, 1948 in *Ipomoea*; Tisné *et al.*, 2011 in *A. thaliana*), revealing that the cell cycle also plays a role in heteroblasty. The relationship between cell number and leaf size is less clear when it is analysed in genotypes affected in cell cycle gene expression. An increase in leaf cell number caused by the upregulation of cell cycle activator genes or by the downregulation of cell cycle inhibitor genes can coincide with an increasing, decreasing or unaffected leaf size (Hemerly *et al.*, 1995; Autran *et al.*, 2002; Cookson *et al.*, 2005, Tojo *et al.*, 2008). These results have cast doubt on the crucial role of the cell cycle as the engine of organ growth, leading to a reconsideration of the organ growth theory in many reviews (Kaplan and Hagemann, 1991; John and Qi, 2008; Sablowski, 2016).

Compound leaves add further complexity with respect to simple leaves. Their morphogenesis is still subject to debate and it is still unclear if they are reduced to the sum of their leaflets, or if they constitute an organ on their own (Champagne and Sinha, 2004). In some studies, they are seen as partially indeterminate structures that share properties with both shoots and simple leaves (Sattler and Rutishauser, 1992). In others, it is suggested that the entire compound leaf is equivalent to a simple leaf and that leaflets arise by sub-divisions of a simple blade (Kaplan, 1975). Tomato leaf is used as a model for studying the genetic control of compound leaf development (Hareven *et al.*, 1996; Champagne and Sinha, 2004). Its organization is odd-pinnate as leaflets develop symmetrically on both sides of the rachis. In contrast to a simple leaf, the contribution of cellular processes to tomato leaf area plasticity and their interactions has not been analysed so far.

The aim of this work was to analyse the respective contributions of epidermal cell number and adaxial epidermal cell size to final area in the compound leaf of tomato, together with the extent of endoreduplication. To provide insights into the cellular organization of the whole leaf area, these traits were analysed in the different leaflets of the successive leaves along a sympodial unit. This experimental protocol extended to compound leaves the standard protocols previously applied to simple leaves in order to facilitate the comparison with previous results (Hemerly *et al.*, 1995; Autran *et al.*, 2002; Cookson *et al.*, 2007; Tojo *et al.*, 2008; Massonnet *et al.*, 2011; Gazquez and Beemster, 2017). To enrich the debate on the different theories about leaf growth control, the same traits were measured in a transgenic line with reduced expression of *CCS52A*, a gene specifically associated with the switch from the mitotic cycle to endoreduplication in different organs (De Veylder *et al.*, 2011). Previous studies in tomato have shown that the reduction in *CCS52A* expression induces the formation of smaller plants delayed in their development, of small fruits with smaller cells and higher cell density in the pericarp and with reduced levels of endoreduplication (Mathieu-Rivet *et al.*, 2010). Finally, variability in leaf areas, leaflet areas and leaf cellular-related traits was analysed in plants subjected to different soil water deficit treatments monitored by the PHENOPSIS automated platform (Granier *et al.*, 2006). This platform has been used to date for studies on *A. thaliana* and was modified here (mechanics and software) to host, weight and adjust soil water content of tomato plants in large pots.

Altogether, our results provide insights into the organization of the tomato compound leaf at the cellular scale. They highlight the importance of considering the leaf rank along the sympodial unit when different traits are compared, and clearly demonstrate that the whole compound leaf at a given rank can be summarized by one of its single leaflets for phenotyping purposes. Thanks to the large variability in tomato leaf area caused either by spatial position on the plant, genetic perturbation or drought treatments, our results provide additional evidence that leaf area is tightly related to epidermal cell number without simple direct links with other leaf size-related traits, namely cell area and endoreduplication.

MATERIALS AND METHODS

Plant material, sowing and seedling pre-culture

Before sowing, 147 seeds of cherry tomato plants (*Solanum lycopersicum*), line West Virginia 106 (Wva106), and nine seeds of an antisense mutant, the Pro_{35S}::*Slccs52A*^{AS} transgenic line (described in Mathieu-Rivet *et al.*, 2010), were sterilized in a solution of Barychlore (0.5 g of Barychlore and 50 mL of 50 % ethanol) for 15 min followed by three rinses with absolute ethanol and drying under a laminar flow hood for at least 15 min. Seeds were sown in sterilized boxes filled with a 1/4 Murashige and Skoog medium (MS including vitamins, Duchefa, MO 222) with 7.5 g sucrose L⁻¹ and 8 g phyto-agar L⁻¹. The pH of the solution was adjusted between 5.8 and 6 with a solution of 2 M KOH and the MS medium was sterilized. Boxes were set up in a growth chamber equipped with the PHENOPSIS automaton (Granier *et al.*, 2006) for 20 d. Light in the growth chamber was provided by a bank of cool-white fluorescent tubes and iodide discharge lamps for 16 h d⁻¹ with a photosynthetic photon flux density of 200 μmol m⁻² s⁻¹ at pot height. Air vapour pressure was maintained at around 0.8 kPa and temperature was set at 25 and 20 °C during the day and night periods, respectively.

Fifty-two pots of 7 L were weighed before and after filling with soil (Klasmann, Substrat SP 15 %). Soil aliquots were dried to estimate the amount of dry soil and the water content in each pot at the time of filling (Granier *et al.*, 2006). Three tomato seedlings were then put in the centre of each pot and immediately irrigated with 30 mL of nutrient solution (Liquoplant rose, Plantin, dilution 4:1000). Day air temperature was set at 23 °C. Seedlings were irrigated manually with 30 mL of nutrient solution twice a day for 1 week. Then, plants were thinned out, considering developmental stage homogeneity, to keep only one plant per pot. Lateral shoots were removed and flowers were shaken three times a week during the whole experiment.

Automatic adjustment of soil water content

The PHENOPSIS automaton, so far used to host and irrigate automatically 504 pots of 250 mL mainly for *A. thaliana* plants (Granier *et al.*, 2006), was modified to manage up to 70 pots of 7 L for larger plants, here tomato. Trays set up in the growth chamber were changed to host larger pots (14 trays with five holes each of 18.6 cm diameter). The weighing/watering station

was modified. The balance was changed to reach a higher weighing capacity (Precisa, Serie 320 XB-Modell XB10200G IP65) and the pneumatic actuator was replaced by an electric one (DS-dynatec, PCDY 136–185°). It was linked to a container filled with nutrient solution (Liquoplant rose, Plantin, dilution 4:1000). The software was modified to adapt the automaton displacements to this new configuration.

The 52 plants were grown at a constant soil water content of $1.4 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ dry soil until the fifth leaf was fully emerged, i.e. when all leaflets were unfolded. From this stage, five different watering regimes, stable over time, were imposed on Wva106 plants until the end of the experiment (seven plants per regime): 0.6, 0.9, 1.2, 1.4 and $1.6 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ dry soil, respectively (Fig. 1). At the same stage, 14 Wva106 plants were submitted to a more severe water deficit induced by cessation of irrigation until the end of the experiment (pots were still weighed daily to follow the decrease in soil water content over time as shown in Fig. 1). The three pots with the transgenic lines were maintained at a soil water content of $1.4 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ dry soil until the end of the experiment.

Measurement of leaf size-related traits

For each individual plant, leaf size-related traits were measured when all compound leaves of the first sympodial unit had reached their final size (as checked by measuring the length of the last emerged leaflet). At the time of harvest, even the most stressed plants did not show any signs of dieback.

For each plant, the first sympodial unit was composed of a maximum of 13 compound leaves (Fig. 2A). The first two compound leaves could not be measured because of senescence for

all watering regimes. For the well-watered Wva106 plants, the third compound leaf was composed of five leaflets, while all the others were composed of seven leaflets (Fig. 2A, B). For the Wva106 plants grown in soil water deficit regimes, the fourth compound leaf was sometimes composed of five leaflets only. For the $\text{Pro}_{355}::\text{Slccs52A}^{\text{AS}}$ transgenic line, the third, the fourth, the fifth and some of the sixth compound leaves were composed of five leaflets, while all others were composed of seven leaflets.

All compound leaves of the first sympodial unit were cut at the base of their rachis and scanned. Then, areas of individual leaflets (cm^2) were measured on the leaf scans with the ImageJ image analysis software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). For each compound leaf, whole leaf area was calculated as the sum of their leaflet areas.

Measurement of adaxial epidermis anatomy

Adaxial epidermal imprints were obtained by drying off a translucent varnish coat spread on the adaxial side of each leaflet from all successive compound leaves (from leaf 3 to leaf 13). The imprint was peeled off and immediately stuck on a microscope slide with one-sided adhesive tape. Imprints were placed under a microscope (Leitz DM RB; Leica, Wetzlar, Germany) coupled to the ImageJ image analysis software (Fig. 2C). Only adaxial epidermal cells were considered in this study and they are referred to hereafter as epidermal cells throughout the text. For each leaflet, at least 75 epidermal cells were drawn manually in a middle zone of the mature leaflet, i.e. considering tip–base but also midrib–margin parts. This zone of the leaflet was selected after a preliminary experiment which showed

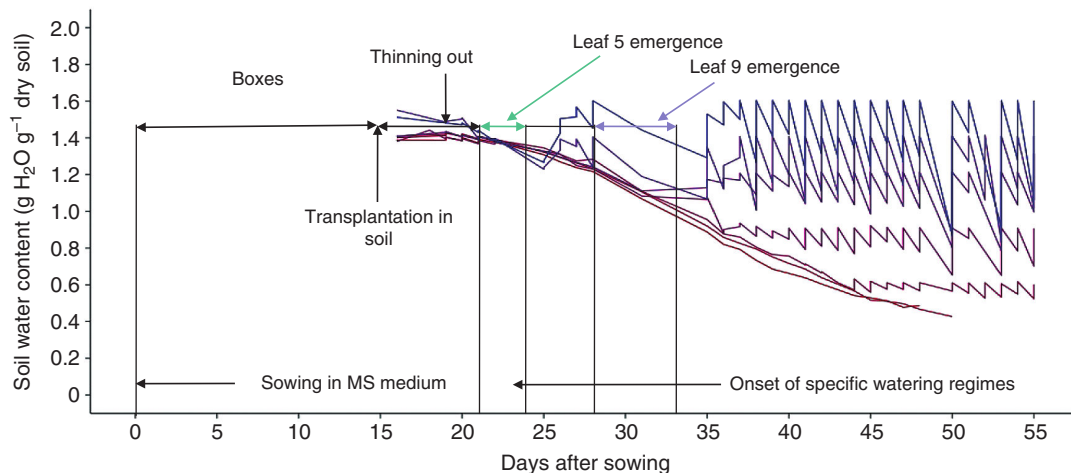


FIG. 1. Experimental set-up from sowing to harvest. Tomato seeds of Wva106 wild type and of the $\text{Pro}_{355}::\text{Slccs52A}^{\text{AS}}$ transgenic line were sown in MS medium. Seedlings were grown for 3 weeks in boxes set up in the growth chamber. Two to three young plants were then transplanted into each of the 52 individual pots filled with soil. Pots were irrigated manually for 1 week. Around 17 d after sowing, plants were thinned out to keep one plant per pot and pots were irrigated by the PHENOPSIS automaton to reach a soil water content of $1.4 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ dry soil. All plants were grown at $1.4 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ dry soil until the emergence of the fifth leaf. At this time (represented by a horizontal green line illustrating the variability of dates depending on plant and genotypes), seven specific watering regimes were set up with seven Wva106 plants per watering regime. The three pots of the transgenic $\text{Pro}_{355}::\text{Slccs52A}^{\text{AS}}$ line were grown at $1.4 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ dry soil only. Among the seven watering regimes, five were stabilized at: 1.6, 1.4, 1.2, 0.9 and $0.6 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ dry soil over time, whereas for the other two regimes, soil water content decreased over time without re-irrigation. These two last treatments were considered together hereafter and called severe water deficit (swd). Treatments are represented by coloured lines with a gradient increasing from the lowest (red) to the highest (blue) soil water content. For each watering regime, data are means of soil water content calculated before and after daily irrigation considering the seven pots in each treatment for Wva106. Depending on plant to plant variability within the same genotype and treatment but also depending on genotypes and drought treatments, leaf 9 emerged between 28 and 33 d after sowing, as shown by the horizontal blue line.

that epidermal cell density does not vary from the tip to the base of mature leaflets (Fig. 2C; Kruskal–Wallis test by ranks, P -value = 0.1313). The distribution of the cell area per leaflet was obtained by pooling data from all cells drawn in the leaflets at the same position in the compound leaf. The mean epidermal cell number per leaflet was calculated as the ratio of mean leaflet area to mean leaflet epidermal cell area. The distribution of cell area per leaf was obtained by pooling data from all cells drawn in the different leaflets within the same compound leaf. The mean epidermal cell number per leaf was calculated as the ratio of leaf area to mean leaf epidermal cell area.

Ploidy levels in leaves and leaflets

Just before leaf scan, discs of leaflets were harvested at the base, middle and tip of the leaflet on the left side of the midvein, using a punch of 8 mm diameter. Discs were immediately put in a 2 mL Eppendorf and frozen in liquid nitrogen. Samples were then stored at -80°C until flow cytometry measurements. Frozen disks were chopped with a razor blade and incubated in 200 μL of extraction buffer for 2 min. Extracted nuclei were fixed with 200 μL of 70 % ethanol for 2 min and stained with 800 μL of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The solutions were filtered to eliminate all structures with a diameter $>30\ \mu\text{m}$. The remaining solutions were analysed by flow cytometry with a C6 BD Accuri system. All reagents were obtained from BD Biosciences.

Ploidy histograms were pooled according to leaflet position, leaf rank, genotype and soil water content treatment. The

positions of the peaks corresponding to the various nuclear classes, i.e. nuclei in 2C, 4C and 8C, were manually identified and windows were positioned according to a reference sample with nuclei extracted from young tomato leaves with a high proportion of dividing cells (Supplementary Data Fig. S1). This manual treatment allowed the removal of noise, i.e. all counts below the 2C peak that can come from different origins (mainly chemicals interacting with DAPI and maybe also some debris resulting from chopping). This manual treatment was impossible for samples harvested from leaves of the antisense mutant mainly because the position of the first peak was not easily detectable and this affected all results. Positions of peaks of 16C and 32C nuclei were deduced from other peak positions assuming that DNA content was additive. Peak positions as identified in Supplementary Data Fig. S1 were conserved for the whole study. Ploidy histograms were quantitatively analysed with the R software (R Development Core Team, 2014) for Wva106 plants under all watering regimes.

Extracting trends for different morphological variables

We applied the LOESS method (Cleveland, 1979), a standard non-parametric regression method, to extract trends (e.g. leaf area as a function of leaf rank) for different morphological variables of interest. The LOESS method depends on two parameters: the smoothing parameter or span that defined the neighbours for fitting local linear regression models and the degree of the polynomial of these linear models. We

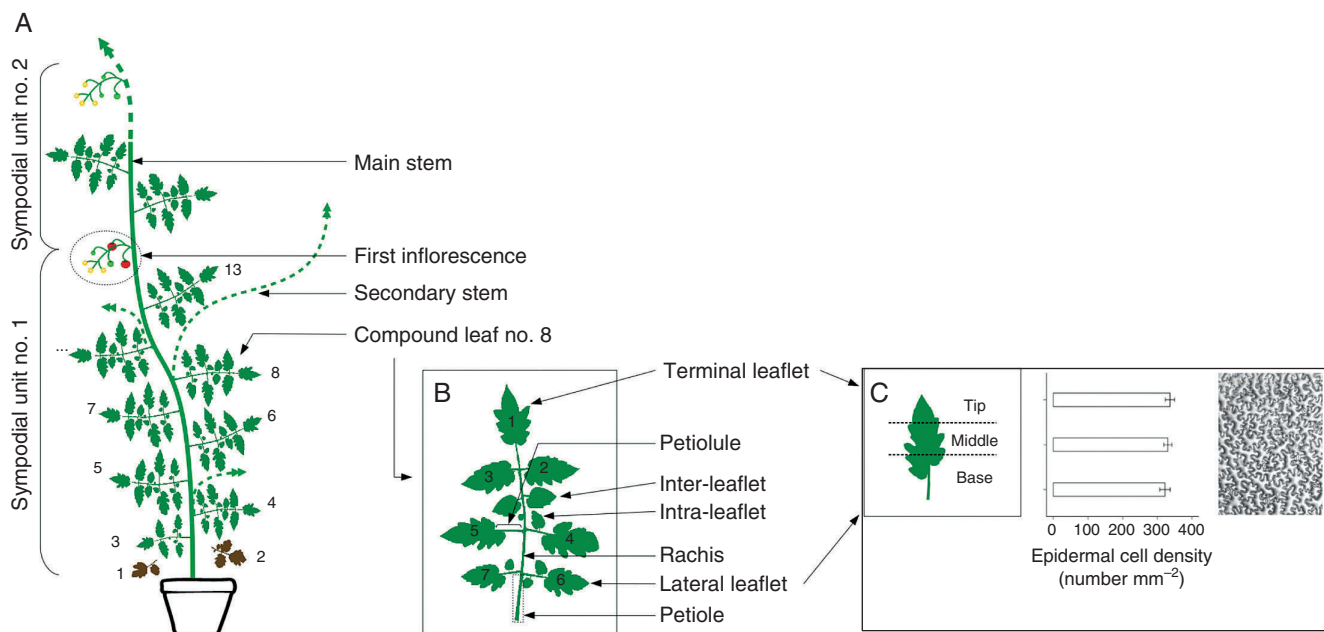


Fig. 2. Layout of the *Solanum lycopersicum* Wva106 aerial architecture in well-watered conditions. (A) The aerial part is composed of successive sympodial units formed by the main stem and successive compound leaves and inflorescences. The number of compound leaves varies from one sympodial unit to the other. In our experiment, the first sympodial unit bears up to 13 compound leaves. (B) Each compound leaf is attached by a petiole to the main stem and is composed of a rachis with a terminal leaflet (numbered 1) and six other leaflets (lateral leaflets) positioned in pairs on the left and right side of the rachis. Leaflets are attached to the rachis by a petiolule. Inter-leaflets that are smaller than regular leaflets are present between successive pairs of leaflets (attached to the rachis), whereas intra-leaflets of small size are attached to the petiolule of leaflets. Inter- and intra-leaflets were not considered in our study. (C) The absence of a gradient in adaxial epidermal cell area within a mature leaflet was previously tested in three zones from tip to base. Mean epidermal cell density and confidence interval are shown for the three zones. A representative image obtained from an imprint of the adaxial epidermis in the middle part of the first leaflet of a mature leaf 8 in well-watered conditions for Wva106 is shown.

systematically used polynomials of first degree partly because of the limited range of the explanatory variable (e.g. 11 successive ranks for the leaves). The span was selected using the corrected Akaike information criterion (AICc), a usual model selection criterion that finds the best trade-off between the parsimony and the prediction capability of the model.

RESULTS

Changes in final leaflet areas and cellular leaflet size-related traits along the rachis of tomato compound leaves

For each Wva106 plant grown in the well-watered condition, leaflet areas were measured on heteroblastic leaf series along the first sympodial unit when all leaves reached their final size (Figs 1 and 2). Most leaves were composed of seven leaflets, except leaves 1, 2 and 3 which had fewer leaflets (3–5 leaflets, not shown).

Leaflet areas varied slightly along the rachis of the same leaf as shown for leaves 5, 7 and 9 (Fig. 3A–C, respectively). Similarly, there were only slight variations in the mean final number of epidermal cells and almost no variation of the epidermal cell area distribution among leaflets within the same leaf (Fig. 3D–I). Considering the variations of leaflet size-related traits with leaf rank, leaflets of leaf 9 were larger than those

of leaf 5, with higher mean epidermal cell number and smaller mean epidermal cell area with a slightly less dispersed distribution (Fig. 3).

For each mature leaflet in the ninth leaf, the distribution of the DNA ploidy level in cells was measured by flow cytometry. C values varied from 2C to 32C, with very low proportions of nuclei in 2C and 32C that were difficult to distinguish from the background (Fig. 4). In contrast, in all leaflets, 4C + 8C nuclei represented >76 % of all nuclei and 16C nuclei varied between 7.2 and 10.8 % (Fig. 4). Ploidy level distributions did not show any specific trend with the leaflet position (Fig. 4).

Changes in final leaf areas and cellular leaf size-related traits along the first sympodial unit

For each Wva106 plant grown in the well-watered condition, leaf area, epidermal cell number per leaf and distribution of epidermal cell areas within the leaf were measured along the first sympodial unit (from leaf 3 until leaf 13), when all leaves reached their final size. Final leaf area increased gradually from leaf 3 to leaf 9, from 115.9 ± 24.7 to 321.6 ± 12.9 cm², and then decreased slightly until leaf 13 (Fig. 5A). The mean final epidermal cell number followed the same trend (Fig. 5B). In

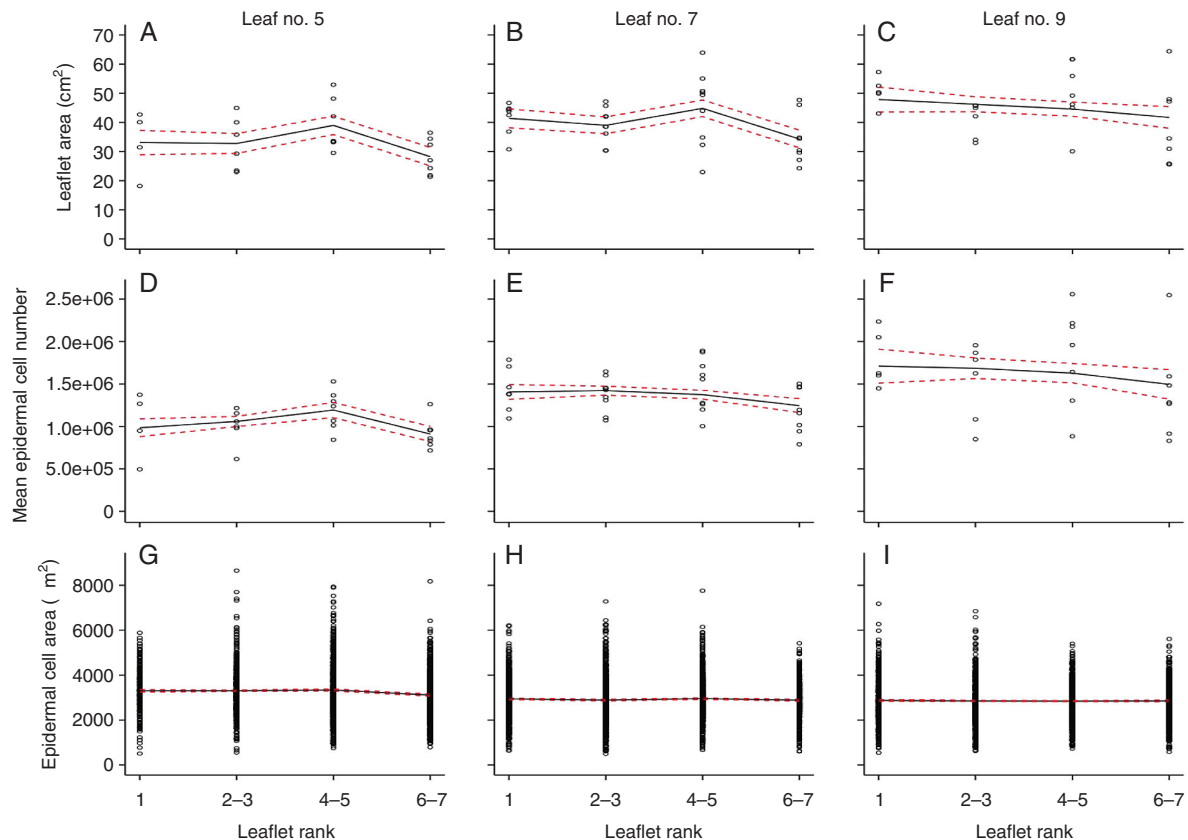


FIG. 3. Profiles of leaflet size-related traits in Wva106 plants grown in the well-watered condition. Data are shown for the successive leaflets numbered from 1 to 7 according to their order of emergence along the fifth, sixth and ninth compound leaf (left, middle and right columns, respectively) of the first sympodial unit. Data were pooled for leaflets emerging by pairs (2–3, 4–5 and 6–7) and data for the terminal leaflet are shown alone (see Fig. 2). Each point represents individual leaflet area (A–C), mean epidermal cell number per leaflet (D–F) and epidermal cell area (G–I). Trends (black full lines) of final leaflet area (A–C, $4 < n < 9$), mean final epidermal cell number per leaf (D–F, $4 < n < 9$) and final epidermal cell area (G–I, $300 < n_{\text{cell}} < 675$) are shown with confidence intervals (red dashed lines).

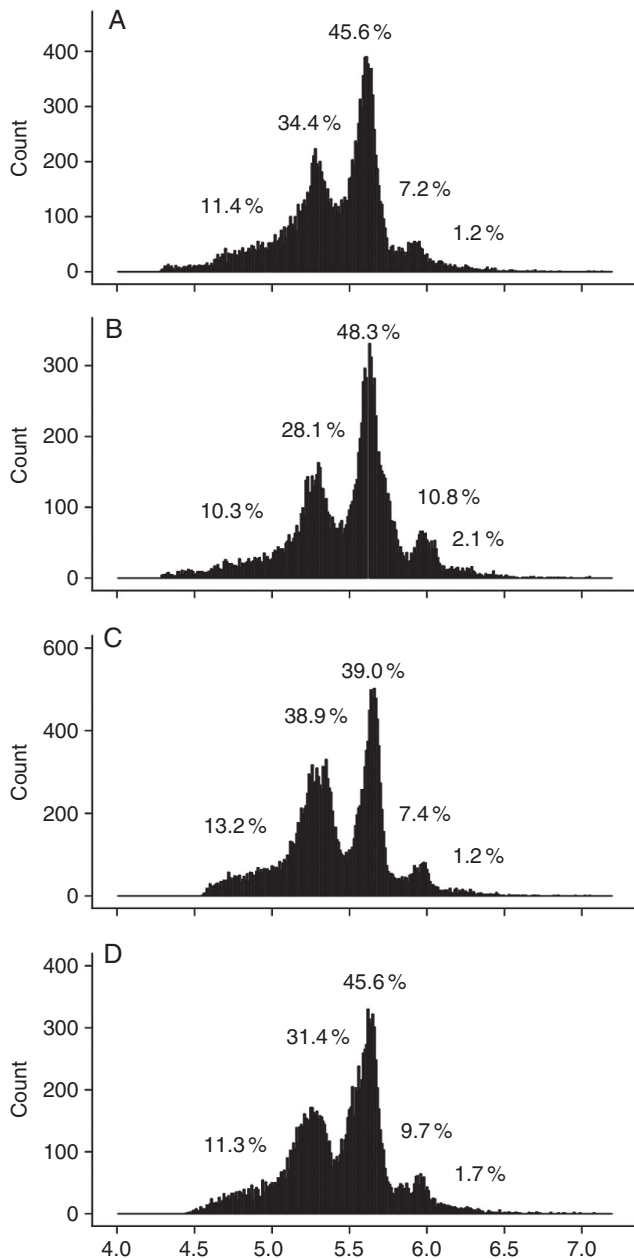


FIG. 4. Ploidy level distribution as measured by flow cytometry in mature tomato leaflets of the ninth leaf of the first sympodial unit of Wva106 plants grown in well-watered conditions. Data are shown for leaflets 1 (A), 2 and 3 (B), 4 and 5 (C), and 6 and 7 (D). Each single distribution was obtained by pooling distributions obtained for three different plants. For each distribution, the percentage of nuclei in 2C, 4C, 8C, 16C and 32C is noted on the distributions.

contrast, the mean epidermal cell area slightly decreased from leaf 3 to leaf 8 where a plateau is reached (Fig. 5C). The epidermal cell area of the lowest leaves was highly variable with right-skewed distributions, due to the presence of large epidermal cells (Fig. 5C). The distribution of the DNA ploidy level in leaf cells showed that C values varied from 2C to 32C in mature leaves (Fig. 6) and did not show any specific trend with the leaf rank as shown for ranks 4, 6, 8 and 12 along the first sympodial unit (Fig. 6). In all leaves, 4C + 8C nuclei represented >74 %

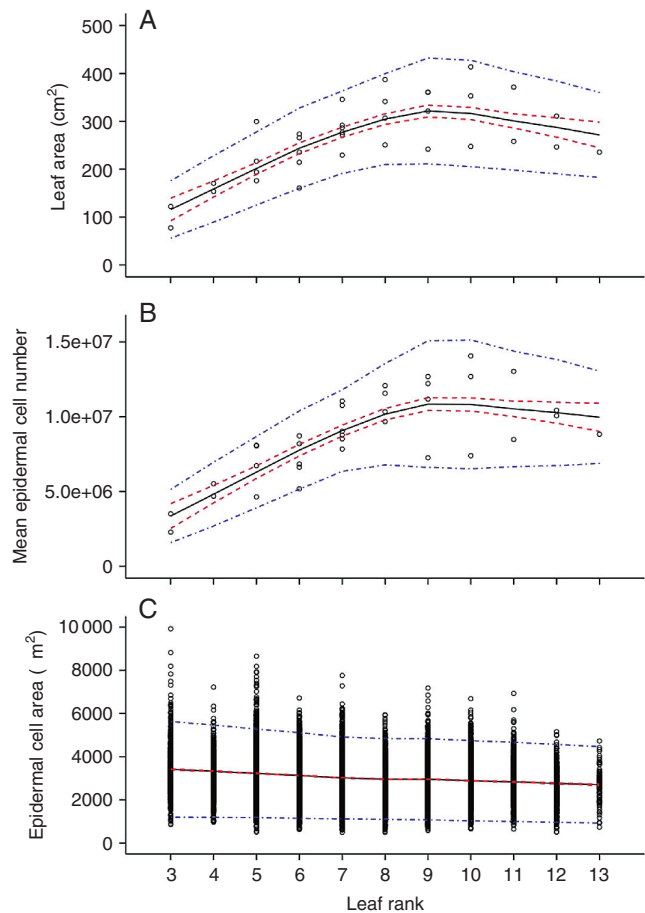


FIG. 5. Profiles of leaf size-related traits considering successive compound leaves of the first sympodial unit in Wva106 plants grown in well-watered conditions. Each point represents the final leaf area (A), mean epidermal cell number per leaf (B) and epidermal cell area distribution (C) that were calculated by pooling all leaflets within each compound leaf. Trends (black full lines) of final leaf area (A, $1 < n < 6$), final mean epidermal cell number per leaf (B, $1 < n < 6$) and epidermal cell area (C, $525 < n_{\text{cell}} < 3150$) are shown with confidence intervals (red dashed lines) and prediction intervals (blue dot-dashed lines).

of all nuclei, whereas 16C nuclei varied between 8.3 and 9.9%. It was still difficult to distinguish the very low proportions of nuclei in 2C and 32C from the background.

Altogether these results suggest that changes in leaf size with leaf rank along the first sympodial unit of Wva106 plants is related (1) to changes in leaflet areas, but not in leaflet numbers (except for leaves 1, 2 and 3 which had a reduced number of leaflets), with common cellular characteristics for all leaflets of a given leaf, i.e. with common epidermal cell area and cellular ploidy distributions; and (2) to changes in epidermal cell number, but not in their size or in the level of endoreduplication.

Changes in final leaf area and cellular size-related traits in the tomato compound leaf upon SICCS52A loss of function

To obtain further insights into the relative contributions of cellular processes to the final leaf size, leaf size-related traits were measured in a transgenic line specifically affected in the cell cycle–endoreduplication transition, namely the SICCS52A

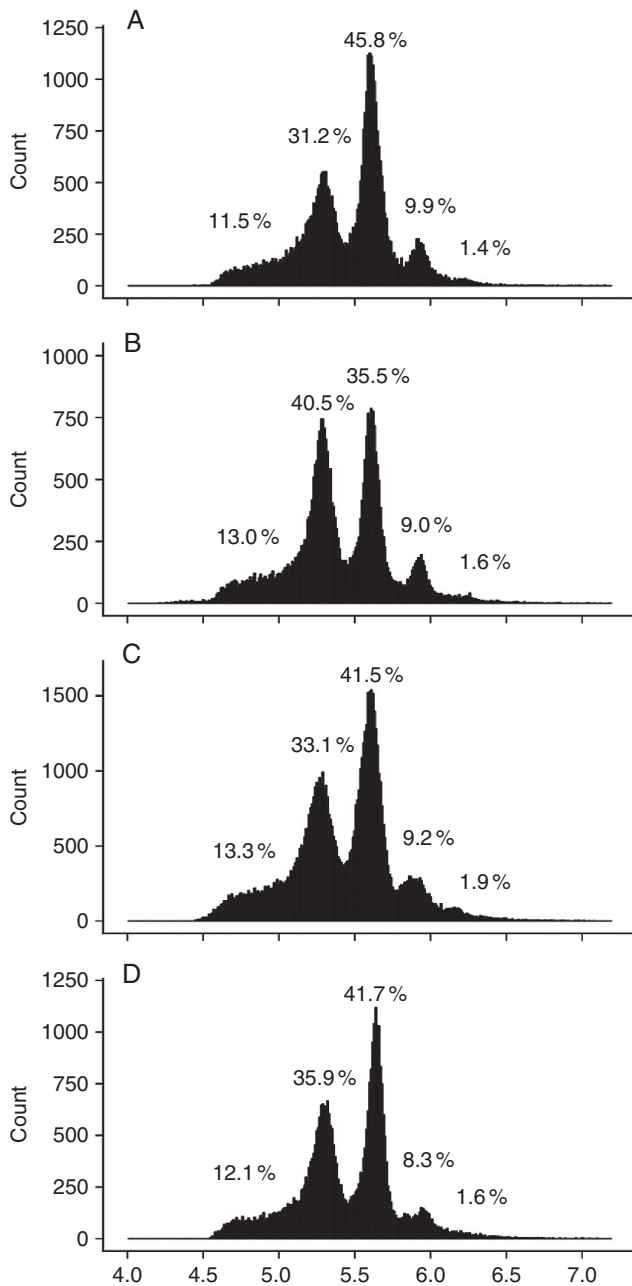


FIG. 6. Ploidy level distribution as measured by flow cytometry in mature tomato leaves considering leaves at rank 4 (A), 6 (B), 8 (C) and 12 (D) on the first sympodial unit of Wva106 plants grown in well-watered conditions. Each single distribution was obtained by pooling distributions of all leaflets within each compound leaf of three different plants. For each distribution, the percentage of nuclei in 2C, 4C, 8C, 16C and 32C is noted on the distributions.

loss-of-function line (referred to as $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$; Mathieu-Rivet *et al.*, 2010) and compared with the wild type (Wva106). This line has a slow developmental rate and produces smaller plants (not shown but observed in our experiment; see also Mathieu-Rivet *et al.*, 2010).

The changes in whole leaf area, area of leaflet 1 and mean epidermal cell number in leaflet 1 with leaf rank along the first sympodial unit were compared between Wva106 and $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ lines (Fig. 7A–C). All studied traits increased

gradually with leaf rank until a maximal value around leaf 9, and slightly decreased or remained stable afterwards depending on the trait (Fig. 7A–C). For the first leaves, values of these three traits were lower in the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line than in the wild type. For example, final leaf area of the fourth leaf reached $32.8 \pm 26.6 \text{ cm}^2$ in the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line whereas it was $158.8 \pm 17.5 \text{ cm}^2$ in the wild type. Final area of leaflet 1 was $5.3 \pm 5.2 \text{ cm}^2$ in the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line whereas it was $21.5 \pm 3 \text{ cm}^2$ in the wild type. Mean epidermal cell number of leaflet 1 was >6-fold less in the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line compared with the wild type ($9.2 \times 10^4 \pm 2.6 \times 10^4$ cells vs. $6.2 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$ cells per leaflet, respectively). In the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line, the increase with leaf rank of these three traits was steeper than in the wild type, so that after leaf 8, leaf area, area of leaflet 1 and mean epidermal cell number were higher in the antisense line than in the wild type (Fig. 7A–C). When the traits were considered at the scale of the whole sympodial unit, the cumulative leaf area of the first sympodial unit did not differ between the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line and the wild type (Fig. 7E). Similarly, both the cumulative leaflet 1 areas and the cumulative epidermal cell number of leaflet 1 of the first sympodial unit did not differ between the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line and the wild type (Fig. 7F, G).

Epidermal cell area in leaflet 1 (Fig. 7D) decreased markedly with the leaf rank in the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line, while it only slightly decreased in the wild type. For leaves 4–7, epidermal cell area was higher in the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line compared with the wild type. After leaf 10, epidermal cell area was lower in the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line compared with the wild type. When the distribution of epidermal cell areas was considered at the scale of the whole sympodial unit, pooling cell area distributions of all first leaflets, mean epidermal cell area did not differ markedly between the two genotypes but the distribution was more dispersed and right-skewed in the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line compared with the wild type (Fig. 7H).

As for the wild type, the distribution of the DNA ploidy level in leaf cells was measured in the first leaflet of leaves at different ranks in the $Pro_{35S}:Slccs52A^{AS}$ line but ploidy level distributions were too noisy to extract quantitative data and draw robust conclusions (not shown).

Altogether, these results show that CCS52A loss of function affected the absolute value of the leaf size-related traits studied here at each leaf rank. For leaf area, epidermal cell number and epidermal cell area, it also affected the trends along the shoot and this caused a total compensation when the traits were considered at the scale of the whole sympodial unit. Here again, cellular size-related traits affected by CCS52A loss of function at the whole leaf level were similarly affected at the single leaflet level of the same leaf as shown for the first leaflet.

Dose response to soil water deficit of final leaf area and cellular size-related traits in the tomato compound leaf

Six soil water deficit treatments were imposed on wild-type plants and started when leaf 5 was fully emerged, i.e. when all leaflets forming leaf 5 were unfolded (Fig. 1). The response of leaf size-related traits to soil water content was studied on leaf 9 which emerged while the different soil water deficit treatments started to be compared (Fig. 1). Final leaf 9 area was maximal

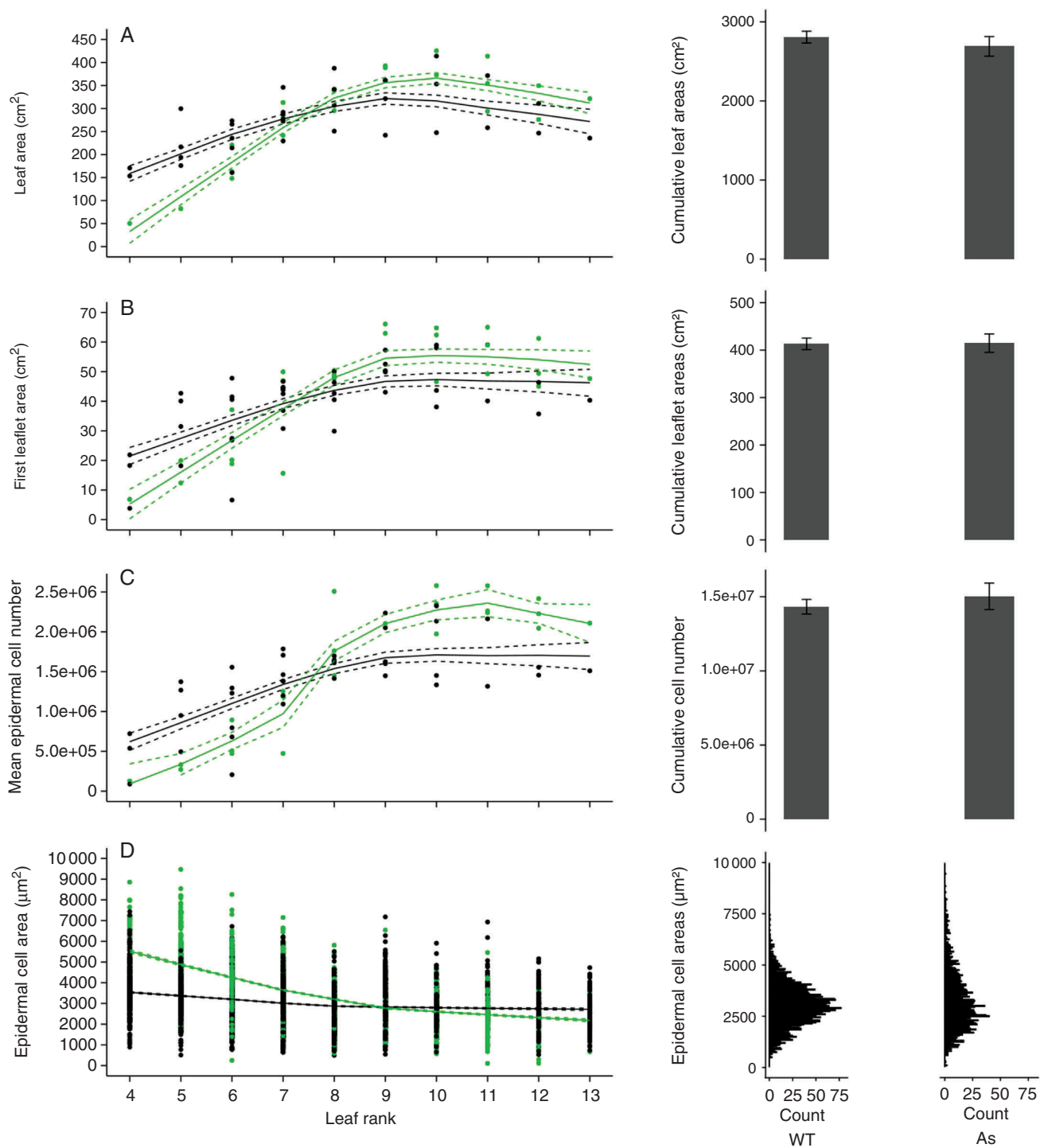


FIG. 7. Profiles of leaf size-related traits considering successive compound leaves of the first sympodial unit in Wva106 (WT; black symbols) and in the transgenic line Pro35S:*Slccs52A*^{As} (As; green symbols) grown in well-watered conditions. Each point represents final leaf area (A), first final leaflet area (B), first leaflet mean final epidermal cell number (C) and first leaflet final epidermal cell area (D). Trends (black full lines) of final leaf area (A, $1 < n < 6$), final first leaflet area (B, $1 < n < 6$), mean final epidermal cell number per leaflet 1 (C, $1 < n < 6$) and final epidermal cell area of the first leaflet (D, $1050 < n_{\text{cell}} < 3150$) are shown with confidence intervals (dashed lines). On the right panels, the mean cumulative leaf area of the first sympodial unit (E), the mean cumulative leaf area of all the first leaflets of the first sympodial unit (F) and the mean cumulative epidermal cell number considering the first leaflets of the first sympodial unit (G) are represented with associated confidence intervals for the two genotypes. The final epidermal cell area distribution considering all leaflets of the first sympodial unit (H) is also shown for the two genotypes.

for the two highest levels of soil water content, i.e. 1.6 and 1.4 g H₂O g⁻¹ dry soil (Fig. 8A), and it decreased with decreasing values of soil water content (Fig. 8A). From 1.4 to 0.6 g H₂O g⁻¹

dry soil, final leaf 9 area was decreased from 321.3 ± 17.1 to 83.9 ± 12.9 cm². The reduction of final leaf 9 area induced by the most severe water deficit treatment (with decreasing soil water

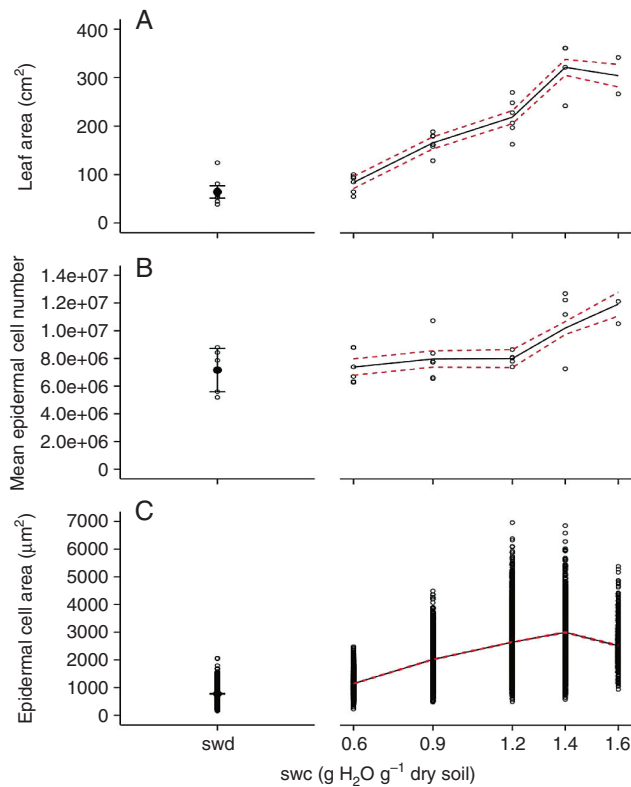


FIG. 8. Soil water content (swc) dose response of leaf size-related traits in Wva106 plants grown at five different soil water contents: 0.6, 0.9, 1.2, 1.4 and 1.6 g H₂O g⁻¹ dry soil and a severe soil water deficit (swd) for which soil water content was never stabilized after cessation of irrigation (this is why the x-axis is broken and soil water content is not quantified by its stable value). Data are shown for the ninth compound leaf of the first sympodial unit. Each point represents final leaf area (A), mean epidermal cell number per leaf (B) and epidermal cell areas (C). They were calculated by pooling all leaflets of each leaf. Trends (black full lines) of final leaf area (A, 3 < n < 6), final mean epidermal cell number per leaf (B, 3 < n < 6) and final epidermal cell area (C, 1575 < n_{cell} < 3150) are shown with confidence intervals (red dashed lines).

content without re-irrigation) (see Fig. 1) was comparable with that induced by the 0.6 g H₂O g⁻¹ dry soil treatment (Fig. 8A). This result is consistent with the time course of soil water depletion (Fig. 1) showing that soil water content did not reach the 0.6 g H₂O g⁻¹ dry soil threshold before 12 d after leaf 9 emergence, suggesting that these two treatments did not really differ during a large part of leaf 9 development. Mean epidermal cell number in leaf 9 was maximal for the highest level of soil water content, i.e. 1.6 g H₂O g⁻¹ dry soil (Fig. 8B), and it decreased with decreasing values of soil water content from 1.6 to 1.2 g H₂O g⁻¹ dry soil. It did not decrease any further with lower values of soil water contents (Fig. 8B). Mean epidermal cell area was maximal for the two highest levels of soil water content, i.e. 1.6 and 1.4 g H₂O g⁻¹ dry soil (Fig. 8C), and it decreased with decreasing values of soil water content (Fig. 8C). The range of epidermal cell area was reduced in leaves of plants grown at the lowest soil water contents (Fig. 8C). Considering each leaflet independently, the dose responses to soil water contents of all these traits were identical to those observed at the whole-leaf scale (Supplementary data Fig. S2).

Reducing the soil water content also induced a shift of the distribution of the DNA ploidy level in leaf cells towards the

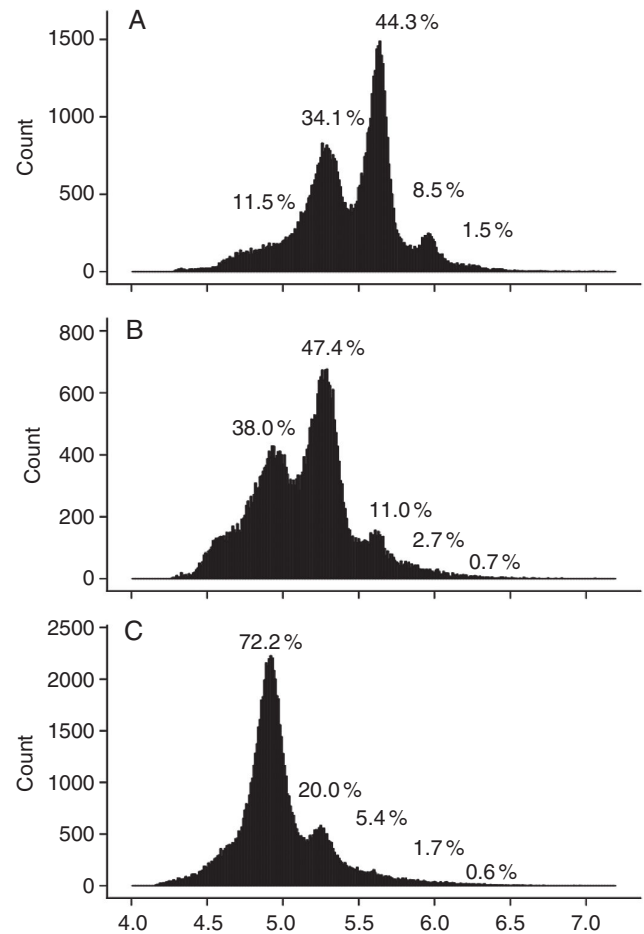


FIG. 9. Ploidy level distribution as measured by flow cytometry in mature tomato leaflets of the ninth leaf of the first sympodial unit of Wva106 plants grown in well-watered conditions (A, soil water content of 1.4 g H₂O g⁻¹ dry soil), in a moderate soil water deficit treatment (B, soil water content of 0.9 g H₂O g⁻¹ dry soil) and in a severe soil water deficit treatment (C, drought without re-irrigation). Each single distribution was obtained by pooling distributions obtained for all leaflets of three different plants. For each distribution, the percentage of nuclei in 2C, 4C, 8C, 16C and 32C is noted on the distributions.

lowest C values (Fig. 9). The highest proportion of cells was found in 8C (44.3%), 4C (47.4%) and 2C (72.2%) for the well-watered condition, the moderate water deficit treatment and the severe water deficit treatment, respectively (Fig. 9).

Altogether, these results show that the drought stress effect on tomato leaf area is related to reductions in cell number, cell size and the level of endoreduplication within the leaf. Here again, effects reported at the whole-leaf scale are the same as those reported considering the different leaflets forming the compound leaf.

DISCUSSION

The PHENOPSIS automaton ensured that tomato plants were grown in rigorously controlled and comparable conditions

Plant phenotyping platforms with automatic weighing/watering stations have been developed by many groups over the

past 20 years, both in the greenhouse, where plant microclimate is not precisely controlled, and in the growth chamber, where it is possible to ensure more homogeneous air temperature, air humidity, light quality and light intensity. In most cases, platforms in growth chambers were developed for small plants grown in small pots, ensuring high-throughput analyses (Granier *et al.*, 2006; Skyrycz *et al.*, 2011; Tisné *et al.*, 2011; Flood *et al.*, 2016; Pavicic *et al.*, 2017). In contrast, most platforms in the greenhouse have been developed for larger pots suited for different crops also at high throughput thanks to less space limitation (Sadok *et al.*, 2007; Nagel *et al.*, 2012; Coupel-Ledru *et al.*, 2014). The chamber used for the present study was equipped since 2004 with the PHENOPSIS automaton which allows adjustment of the soil water content per pot as a function of plant transpiration and soil evaporation (Granier *et al.*, 2006). The PHENOPSIS automaton has been used until now for small pots, but it was adapted here to manage larger pots more suitable for tomato plants and avoid the pot size effect on whole-plant development and functioning (as shown recently in Dambreville *et al.*, 2017). The automaton was used to ensure (1) that soil water content was stabilized over time, for five treatments among seven, despite the increase in tomato plant size (Fig. 1); (2) that two tomato genotypes with different developmental rates were grown at the same soil water content over their whole period of development; and (3) that different intensities of soil water contents were imposed during tomato plant development. The number of plants grown together was equal to 52 but the throughput of the analysis can be considered as relatively high considering the number of leaflets (seven) measured on each leaf (ten from leaf 4 to 13) of each plant (52).

Changes in leaf area, leaflet area and cellular size-related traits in heteroblastic series support that leaflets are similar and share common cellular properties

Leaf size-, shape- and morphology-related traits change along plant shoots. Trait changes with leaf rank can be gradual or more abrupt, depending on the trait itself, environmental conditions and genotypes (Zotz *et al.*, 2011). In all cases, leaves can be grouped in successive classes that share common phenotypic properties such as the absence or presence of trichomes (Hunter *et al.*, 2003), or a set of common developmental properties (Lièvre *et al.*, 2016). In simple leaves such as in *A. thaliana*, tobacco or pea, morphological traits such as leaf area that change with leaf rank are accompanied by changes in cellular traits. The increase in whole leaf area with leaf rank is systematically paralleled by an increase in epidermal cell number, whereas epidermal cell area only slightly decreases or is unchanged (Granier *et al.*, 2000; Cookson *et al.*, 2007). This is exactly what is reported here for the tomato compound leaves along the first sympodial unit of the wild-type line. In the Wva106 plants in well-watered conditions, the progression of heteroblasty for the studied traits, i.e. the relative changes in leaf area, epidermal cell number and epidermal cell area from one leaf to another, paralleled the progression reported for Col-0 plants of *A. thaliana* for the same traits (Cookson *et al.*, 2007; Lièvre *et al.*, 2016). In addition, we did not find any changes in endoreduplication with leaf rank. Considering

the individual leaflets of a leaf, it was possible to show that the seven individual leaflets of a given leaf shared the same cellular properties in terms of final area, epidermal cell number and size, and endoreduplication. This supports the theory that leaflets can be considered as sub-divisions of the leaf they belong to (Kaplan, 1975). This is an important result since a single leaflet can be used as representative of the whole leaf for leaf growth phenotyping studies, at least in tomato, thereby greatly simplifying the framework of analyses. The robustness of this result was shown here for different leaves of a plant, comparing two genotypes with different leaf development and plants growing under drought stresses of different intensities.

Epidermal cell number and size contributions to the plasticity of tomato compound leaf area: what about the compensation mechanism described in simple leaves?

The quasi-parallel changes in leaf area and epidermal cell number along the plant shoot in simple leaves and reported here for compound leaves of two different tomato genotypes is consistent with the old traditional view that leaf development could be driven by cell cycle-associated processes. Cells could accumulate by divisions occurring in particular regions of the leaf and would drive morphogenesis and determine the final shape and size of the leaf by cell expansion (Fleming, 2007). Soil water deficit treatments also support this view. The drought treatments were applied here during whole leaf development and reduced both the number of cells produced by division and their subsequent expansion, as shown previously for the simple leaves of both *A. thaliana* and oilseed rape (Baerenfaller *et al.*, 2012; Dambreville *et al.*, 2017).

Over the past 20 years, this picture of plant organ growth theory was disturbed by the observation of the compensation phenomenon in leaf morphogenesis, i.e. an abnormal increase in cell volume triggered by a decrease in cell number. It suggested the existence of integration systems linking levels of cell proliferation and cell expansion (Tsukaya, 2002; Ferjani *et al.*, 2007). In addition, an opposite type of compensation has also been described, i.e. enhanced cell proliferation caused by defective cell expansion (Usami *et al.*, 2009) and has been associated with developmental phase changes at the plant scale (Hisanaga *et al.*, 2015). Both types of balance between cell number and size (compensation and its opposite type) were observed in our study in two different contexts: (1) the heteroblastic changes in leaf cellular components along the sympodial unit, with the increase in cell number accompanied by a decrease in cell size and followed by a plateau for both variables; (2) the SICCS52A loss of function, with the decrease in epidermal cell number in the basal leaves of the sympodial unit accompanied by an increase in epidermal cell area in the same leaves, whereas the reciprocal is observed in the highest leaves.

Total 'balance' between cell number and size would have led to unchanged leaf area along the sympodial unit and/or between both genotypes. At the leaf scale, the spatial variability in final area along the sympodial unit and/or the genetic variability observed when comparing the Pro_{35S}:*Slccs52A*^{AS} line with the wild type both reflect that these balances were partial in our study.

Surprisingly, our results highlighted a total compensation at the scale of the whole sympodial unit when comparing all phenotypic traits between the Pro_{35S}:*Slccs52A*^{AS} line and the wild type. The transgenic line was previously reported to have a slow developmental rate at the whole-plant scale and small fruits (Mathieu-Rivet *et al.*, 2010). The slow aerial developmental rate was observed during our experiment (not shown). When compared per leaf, the leaf size-related traits phenotype was difficult to interpret and depended on leaf rank. For each trait, changes from leaf 1 to the upper leaf were steeper in the Pro_{35S}:*Slccs52A*^{AS} line than in the wild type, i.e. leaf area and epidermal cell number increased more steeply, while epidermal cell area decreased more steeply. Finally, at the scale of the sympodial unit, both genotypes reached the same cumulative leaf area, epidermal cell number and epidermal cell area. A few studies have suggested that leaf size-related traits at the scale of the leaf could be controlled at the whole-plant scale. Negative relationships between the number of leaves produced by a determinate plant and the number of epidermal cells per leaf have been reported in a recombinant inbred line of *Aegilops tauschii* and *A. thaliana* (Ter Steege *et al.*, 2005; Tisné *et al.*, 2008). To our knowledge, the data set presented here is the first one allowing cumulating traits of the different leaves. It is possible that such compensation occurred in other studies, but was not revealed because of the absence of measurement of all leaves along a shoot.

Additional evidence that no simple direct link exists between the endoreduplication-dependent increase in the ploidy level and enhanced cell enlargement

Cell size increase in plants is driven by two independent processes: cell growth, the increase in total cytoplasmic macromolecular mass; and cell expansion, the increase in cell volume through vacuolation (Breuer *et al.*, 2010). As expected, highly polyploid nuclei (resulting from endoreduplication) are often associated with increased cell size via increased cell growth (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003; Lee *et al.*, 2004). In our study, cell size was modified by leaf rank along the first sympodial unit, as previously shown for other plants with simple leaves (Ashby, 1948; Granier and Tardieu, 1998; Cookson *et al.*, 2007; Tisné *et al.*, 2011). However, the distribution of DNA ploidy cell levels did not change from one leaf rank to another along the sympodial unit. In contrast, the systematic decrease in cell size caused by moderate and severe drought treatments imposed here was accompanied by a shift towards a low value of the DNA ploidy cell level, as reported for many environmental factors (Scholes and Paige, 2015). Altogether, our results provide new evidence that the relationship between the level of ploidy and cell enlargement is not direct and that the two processes can be uncoupled to some extent (Tsukaya, 2013, 2014).

Conclusions

Comparing final leaf area, epidermal cell number and epidermal cell size progression along the first sympodial unit of two tomato genotypes with different heteroblastic progressions

highlighted a combination of compensating mechanisms between epidermal cell number and size. These compensations were associated not only with the development of the individual leaf itself but also with whole plant development, as previously suggested for plants with simple leaves (Massonnet *et al.*, 2011). Endoreduplication distributions did not vary between leaves, showing that endoreduplication can be uncoupled from cell expansion as for simple leaves (Tsukaya, 2014). However, the compensation phenomena between cell number and size and the uncoupling of endoreduplication and cell size reported in the heteroblasty context were no longer observed when leaf area variability was caused by soil water deficits with different intensities. In contrast to the gradients reported along the shoot for the different traits studied here, the different leaflets along the rachis of the same leaf are identical in terms of final area, epidermal cell number and size, and distribution of endoreduplication, suggesting that they share common properties, can be representative of the leaf they belong to and can be used as individuals for phenotyping purposes, at least for tomato.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <https://academic.oup.com/aob> and consist of the following. Figure S1: ploidy level distribution as measured by flow cytometry in a young tomato leaf used as a standard. Figure S2: soil water content dose response of leaflet size-related traits in Wva106 plants grown in five different stable soil water contents and one severe water deficit treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank E. Suard for technical assistance during experiments and image analyses. The contribution of Nathalie Gonzalez, Christian Chevalier, Jean-Pierre Renaudin and two anonymous reviewers for comments on the manuscript is gratefully acknowledged. This project is supported by Agropolis Fondation under the reference Project-1403-032 through the 'Investissements d'avenir' programme (Labex Agro: ANR-10-LABX-0001-01). Adaptation of the PHENOPSIS platform to host large pots was supported by the GEPETOs2015 project (Région Languedoc Roussillon-FEDER funds).

LITERATURE CITED

- Ashby E. 1948. Studies in the morphogenesis of leaves. 2. The area, cell size and cell number of leaves of *Ipomoea* in relation to their position on the shoot. *New Phytologist* **47**: 177–195.
- Autran D, Jonak C, Belcram K, *et al.* 2002. Cell numbers and leaf development in Arabidopsis: a functional analysis of the STRUWWELPETER gene. *EMBO Journal* **21**: 6036–6049.
- Baerenfaller K, Massonnet C, Walsh S, *et al.* 2012. Systems-based analysis of Arabidopsis leaf growth reveals adaptation to water deficit. *Molecular Systems Biology* **8**: 606. doi: 10.1038/msb.2012.39.
- Breuer C, Ishida T, Sugimoto K. 2010. Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 654–660.
- Champagne C, Sinha N. 2004. Compound leaves, equal to the sum of their parts? *Development* **131**: 4401–4412.
- Cheniclet C, Rong WY, Causse M, *et al.* 2005. Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiology* **139**: 1984–1994.
- Cleveland WS. 1979. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *Journal of the American Statistical Association* **74**: 829–836.

- Cookson SJ, Chenu K, Granier C. 2007. Day-length affects the dynamics of leaf expansion and cellular development in *Arabidopsis thaliana* partially through floral transition timing. *Annals of Botany* **99**: 703–711.
- Cookson SJ, Van Lijsebettens M, Granier C. 2005. Correlations between leaf growth variables suggest intrinsic and early controls of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **28**: 1355–1366.
- Coupe-Ledru A, Lebon É, Christophe A, et al. 2014. Genetic variation in a grapevine progeny (*Vitis vinifera* L. cvs Grenache × Syrah) reveals inconsistencies between maintenance of daytime leaf water potential and response of transpiration rate under drought. *Journal of Experimental Botany* **65**: 6205–6218.
- Dambreville A, Griollet M, Rolland G, et al. 2017. Phenotyping oilseed rape growth-related traits and their responses to water deficit: the disturbing pot size effect. *Functional Plant Biology* **44**: 35–45.
- De Veylder L, Larkin JC, Schnittger A. 2011. Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends in Plant Sciences* **16**: 624–634.
- Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG. 1999. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Developmental Biology* **215**: 407–419.
- Edgar BA, Zielke N, Gutierrez C. 2014. Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **15**: 197–210.
- Ferjani A, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H. 2007. Analysis of leaf development in fugu mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiology* **144**: 988–999.
- Fleming AJ. 2007. Cell cycle control during leaf development. In: Inzé D, ed. *Annual Plant Reviews Book Series, Volume 32: Cell cycle control and plant development*. Blackwell Publishing, Oxford, 203–226.
- Flood PJ, Kruijer W, Schnabel SK, et al. 2016. Phenomics for photosynthesis, growth and reflectance in *Arabidopsis thaliana* reveals circadian and long-term fluctuations in heritability. *Plant Methods* **12**: 14.
- Gázquez A, Beemster GTS. 2017. What determines organ size differences between species? A meta-analysis of the cellular basis. *New Phytologist* **215**: 299–308.
- Gonzalez N, Vanhaeren H, Inzé D. 2012. Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in Plant Sciences* **17**: 332–340.
- Granier C, Tardieu F. 1998. Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycle in sunflower leaves. A common pattern of development for all zones of a leaf and different leaves of a plant. *Plant Physiology* **116**: 991–1001.
- Granier C, Turc O, Tardieu F. 2000. Co-ordination of cell division and tissue expansion in sunflower, tobacco and pea leaves. Dependence or independence of both processes? *Journal of Plant Growth Regulation* **19**: 45–54.
- Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, et al. 2006. PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytologist* **169**: 623–635.
- Hareven D, Gutfinger T, Parnis A, Eshed Y, Lifschitz E. 1996. The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell* **84**: 735–744.
- Hemerly A, Engler JdA, Bergounioux C, et al. 1995. Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO Journal* **14**: 3925–3936.
- Hisanaga T, Kawade K, Tsukaya H. 2015. Compensation: a key to clarifying the organ-level regulation of lateral organ size in plants. *Journal of Experimental Botany* **66**: 1055–1063.
- Horiguchi G, Ferjani A, Fujikura U, Tsukaya H. 2006. Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* **119**: 37–42.
- Hunter C, Sun H, Poethig RS. 2003. The *Arabidopsis* heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member. *Current Biology* **13**: 1734–1739.
- John PCL, Qi R. 2008. Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. *Trends in Plant Sciences* **13**: 121–127.
- Kaplan DR. 1975. Comparative developmental evaluation of the morphology of unifacial leaves in the monocotyledons. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* **95**: 1–105.
- Kaplan DR, Hagemann W. 1991. The relationship of cell and organism in vascular plants: are cells the building-blocks of plant form? *Bioscience* **4**: 693–703.
- Katagiri Y, Hasegawa J, Fujikura U, Hoshino R, Matsunaga S, Tsukaya H. 2016. The coordination of ploidy and cell size differs between cell layers in leaves. *Development* **143**: 1120–1125.
- Lee HC, Chiou DW, Chen WH, Markhart AH, Chen YH, Lin TY. 2004. Dynamics of cell growth and endoreduplication during orchid flower development. *Plant Science* **166**: 659–667.
- Lièvre M, Granier C, Guédon Y. 2016. Identifying developmental phases in *Arabidopsis thaliana* rosette using integrative segmentation models. *New Phytologist* **210**: 1466–1478.
- Massonnet C, Tisné S, Radziejowski A, et al. 2011. New insights into the control of endoreduplication: endoreduplication is driven by organ growth in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* **157**: 2044–2055.
- Mathieu-Rivet E, Gevaudant F, Sicard A, et al. 2010. Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato. *The Plant Journal* **62**: 727–741.
- Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW. 1993. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **5**: 1661–1680.
- Nagel KA, Putz A, Gilmer F, et al. 2012. GROWSCREEN-Rhizo is a novel phenotyping robot enabling simultaneous measurements of root and shoot growth for plants grown in soil-filled rhizotrons. *Functional Plant Biology* **39**: 891–904.
- Nelissen H, Gonzalez N, Inzé D. 2016. Leaf growth in dicots and monocots: so different yet so alike. *Current Opinion in Plant Biology* **33**: 72–76.
- Pavicic M, Mouhu K, Wang F, Bilicka M, Chovancek E, Himanen K. 2017. Genomic and phenomic screens for flower related RING type ubiquitin E3 ligases in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **8**: 416. doi: 10.3389/fpls.2017.00416.
- Pyke KA, Marisson JL, Leech RM. 1991. Temporal and spatial development of the cells of the expanding first leaf of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Experimental Botany* **42**: 1407–1416.
- R Development Core Team. 2014. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rodriguez RE, Debernardi JM, Palatnik JF. 2014. Morphogenesis of simple leaves: regulation of leaf size and shape. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **3**: 41–57.
- Roeder AHK, Chickarmane V, Cunha A, Obara B, Manjunath BS, Meyerowitz EM. 2010. Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology* **8**: e1000367.
- Rymen B, Fiorani F, Kartal F, Vandepoele K, Inzé D, Beemster GTS. 2007. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiology* **143**: 1429–1438.
- Sablowski R. 2016. Coordination of plant cell growth and division: collective control or mutual agreement? *Current Opinion in Plant Biology* **34**: 54–60.
- Sadok W, Naudin PH, Boussuge B, Muller B, Welcker C, Tardieu F. 2007. Leaf growth rate per unit thermal time follows QTL-dependent daily patterns in hundreds of maize lines under naturally fluctuating conditions. *Plant, Cell and Environment* **30**: 135–146.
- Sattler R, Rutishauser R. 1992. Partial homology of pinnate leaves and shoots: orientation of leaflet inception. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* **114**: 61–79.
- Scholes DR, Paige KN. 2015. Plasticity in ploidy: a generalized response to stress. *Trends in Plant Science* **20**: 165–175.
- Skiryz A, Vandenbroucke K, Clauw P, et al. 2011. Survival and growth of *Arabidopsis* plants given limited water are not equal. *Nature Biotechnology* **29**: 212–214.
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K. 2003. ‘Big it up’: endoreduplication and cell-size control in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 544–553.
- Tardieu F, Reymond M, Hamard H, Granier C, Muller B. 2000. Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1505–1514.
- Ter Steege MW, den Ouden FM, Lambers H, Stam P, Peeters AJM. 2005. Genetic and physiological architecture of early vigor in *Aegilops tauschii*,

- the D-genome donor of hexaploid wheat. A quantitative trait loci analysis. *Plant Physiology* **139**: 1078–1094.
- Tisné S, Reymond M, Vile D, Fabre J, Dauzat M, Koornneef M, Granier C. 2008.** Combined genetic and modeling approaches reveal that epidermal cell area and number in leaves are controlled by leaf and plant developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **148**: 1117–1127.
- Tisné S, Barbier F, Granier C. 2011.** The ERECTA gene controls spatial and temporal patterns of epidermal cell number and size in successive developing leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* **108**: 159–168.
- Tojo T, Tsuda K, Yoshizumi T, Ikeda A, Yamaguchi J, Matsui M, Yamazaki K. 2008.** *Arabidopsis* MBF1s control leaf cell cycle and its expansion. *Plant and Cell Physiology* **50**: 254–264.
- Tsukaya H. 2002.** The leaf index: heteroblasty, natural variation, and the genetic control of polar processes of leaf expansion. *Plant and Cell Physiology* **43**: 372–378.
- Tsukaya H. 2013.** Does ploidy level directly control cell size? Counterevidence from *Arabidopsis* genetics. *PLoS One* **8**: e83729.
- Tsukaya H. 2014.** Comparative leaf development in angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology* **17**: 103–109.
- Usami T, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H. 2009.** The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. *Development* **136**: 955–964.
- Vanhaeren H, Inzé D, Gonzalez N. 2016.** Plant growth beyond limits. *Trends in Plant Science* **21**: 102.
- Wuyts N, Massonnet C, Dauzat M, Granier C. 2012.** Structural assessment of the impact of environmental constraints on *Arabidopsis* leaf growth: a 3D approach. *Plant, Cell and Environment* **35**: 1631–1646.
- Zotz G, Wilhelm K, Becker A. 2011.** Heteroblasty – a review. *The Botanical Review* **77**: 109–151.

PHENOPSIS

Quelles évolutions technologiques du premier automate de phénotypage des plantes ?

Myriam Dauzat¹, Anaëlle Dambreville¹, Justine Bresson^{1,4}, Denis Vile¹, Bertrand Muller¹, Vincent Nègre¹, Garance Koch¹, François Vasseur^{1,3}, Alexis Bédiée¹, Maxence Desigaux², Denis Fourré², Christine Granier¹

Résumé. Afin de répondre aux besoins de phénotypage à haut débit dans le domaine végétal, le LEPSE (Laboratoire d'Ecophysiologie des plantes sous stress environnementaux) et la société Optimalog ont mis au point dès 2002 PHENOPSIS, un des premiers automates de phénotypage des plantes pour cultiver et suivre la croissance en pots de centaines de plantes de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* et ce à des niveaux de déficit hydrique du sol contrôlés. Depuis, PHENOPSIS a été utilisé comme outil de phénotypage dans plusieurs dizaines de publications. En parallèle, l'outil a évolué à la demande des utilisateurs pour élargir la gamme de mesures phénotypiques, accroître la sécurité des utilisateurs et améliorer la traçabilité et la fiabilité des données. Cet article fait le point sur ces évolutions.

Mots clés : automate, écophysiologie, flexibilité, phénotypage haut-débit, sécurités, type de mesures.

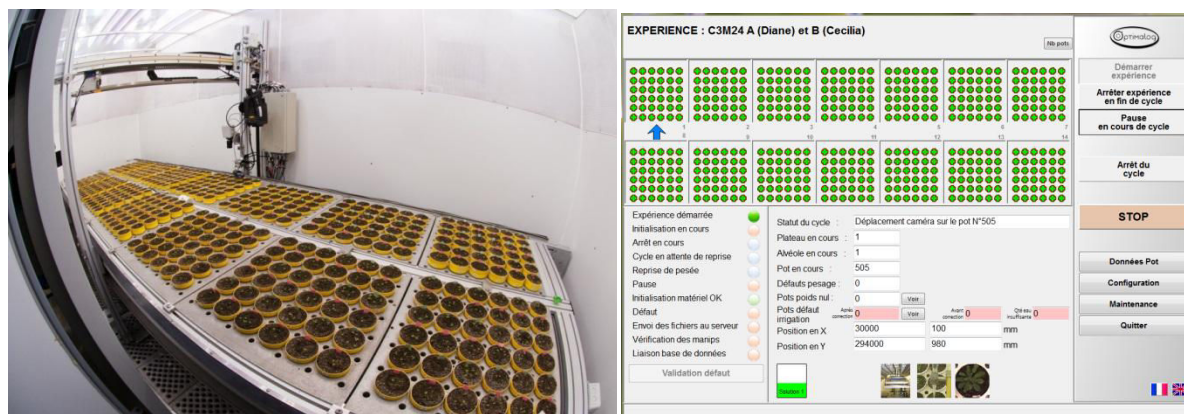


Photo 1. (a) vue générale de PHENOPSIS ; (b) interface de PHENOPSIS (Photos : INRA).

¹ INRA-LEPSE, 2 place Viala, 34060 Montpellier cedex, France
myriam.dauzat@supagro.inra.fr

² OPTIMALOG, SARL, 2 rue de la Fontaine de Mié, 37540 Saint Cyr sur Loire, France

³ adresse actuelle : CEFE, 1919, Route de Mende, 34090 Montpellier, France

⁴ adresse actuelle : Geschwister-Scholl-Platz, 72074, Tübingen, Germany

Introduction

Le Laboratoire d'Ecophysiologie des plantes sous stress environnementaux (UMR INRA-Supagro, LEPSE, Montpellier) s'intéresse particulièrement à la réponse de la croissance foliaire et de la transpiration des plantes aux conditions environnementales, en particulier au déficit hydrique du sol.

Au début des années 2000, le LEPSE a décidé d'investir fortement sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* pour pouvoir accéder à de larges ressources génétiques (populations d'accessions, mutants). Maîtriser l'état hydrique de centaines de plantes dans des conditions contrôlées devenait une nécessité et, en 2002, les techniciens et ingénieurs du LEPSE, associés à l'entreprise APILOGIC (aujourd'hui OPTIMALOG, <http://www.optimalog.com/>) ont mis au point un automate, PHENOPSIS, capable d'ajuster l'humidité du sol dans un dispositif de plus de 500 pots. L'automate repose sur un bras mobile x-y et un vérin pneumatique capable de soulever une balance sous chacun des pots et de commander un arrosage à la carte. Cet automate est installé dans une chambre de culture de 5 m², contrôlée par une centrale d'acquisition de données Campbell CR10X.

Aujourd'hui le LEPSE héberge trois PHENOPSIS dans trois chambres de culture, et la société Optimalog, forte de son expérience sur PHENOPSIS a implanté un PHENOPSIS en Belgique, conçu la plateforme de phénotypage Héliaphen à Toulouse et construit aujourd'hui un nouveau PHENOPSIS à Toulouse. Ce dernier a pu bénéficier des dernières évolutions technologiques de l'outil développées au LEPSE.

Les principales évolutions concernent :

- ✓ de nouveaux outils de gestion des images et données (Fabre et al., 2011, Fabre et al., 2008) ;
- ✓ des dispositifs de sécurité pour assurer la fiabilité des mesures et la tranquillité des utilisateurs ;
- ✓ l'ajout de nouvelles fonctionnalités pour répondre aux besoins des chercheurs.

Cet article vise à faire le point sur les évolutions d'un outil aujourd'hui mondialement reconnu (l'article Granier et al., 2006 est cité 307 fois et 34 articles ont utilisé des données issues de cette plateforme), partie intégrante de l'ensemble Montpellier Plant Phenotyping Platforms (M3P), labélisé IBiSA et membre du réseau PHENOME (<https://www.phenome-fppn.fr/>). Il devrait aider les porteurs de futurs dispositifs de phénotypage et/ou imagerie de plantes à haut débit à établir un cahier des charges le plus complet possible. Il peut aussi susciter des idées d'expérimentations et pourquoi pas d'accueil sur notre plateforme ouverte vers l'extérieur et accessible au travers de projets (voir notre page décrivant les conditions d'accès sur le site <http://www6.montpellier.inra.fr/lepse/M3P>).

Rappel de la description technique et des fonctions primaires de PHENOPSIS (Dauzat et al., 2004)

PHENOPSIS est constitué d'un cadre principal fixe (4,17 x 1,46 m), et d'un portique mobile muni de capteurs se déplaçant en X et Y. Le cadre fixe supporte 14 plateaux en aluminium, amovibles percés de trous pour permettre à un total de 504 pots de prendre place. Cet ensemble est situé dans une chambre de culture dans laquelle l'utilisateur peut entrer (**Photo 2**), mais peut difficilement manipuler pour ses expérimentations puisque seuls quelques centimètres séparent le bord de l'automate des parois de la chambre. Cet automate pourrait être conçu et adaptable dans un autre environnement (serre, chambre plus grande: pouvoir circuler autour de l'automate serait l'idéal pour faciliter les prélèvements, ou les traitements plus fins de chaque pot).



Photo 2. Récolte dans PHENOPSIS (Photos : INRA-Lepse).

PHENOPSIS comportait en 2002 une balance, une pompe péristaltique, un tuyau d'irrigation et une caméra afin de peser, irriguer les pots en fonction d'un poids cible déterminé et permettre la mesure non-destructive de la surface foliaire des plantes au quotidien (voir **Annexe 2**, logigramme d'origine).

De nouvelles fonctionnalités ont été nécessaires

Au cours des années, il est apparu un besoin de plus en plus important de formation, une meilleure fiabilité et traçabilité des mesures. Des sécurités ont ainsi été rajoutées pour permettre aux expérimentateurs une meilleure confiance.

Un accueil personnalisé

Chaque utilisateur reçoit une formation sur le fonctionnement de l'automate à plusieurs niveaux suivant son implication et son degré de présence sur l'outil. Un livret d'accueil lui est délivré avec une validation des points de formation ainsi qu'une liste de contrôles à effectuer au démarrage de l'outil, en début et en cours d'expérimentation. Un accès à la base de données lui est attribué pour son expérimentation.

Sécurités mécaniques

Dès l'ouverture d'une porte de la chambre de culture une sécurité entraîne une interruption immédiate du déplacement du portique mobile. Une action manuelle (déblocage du bouton de sécurité) et une action *via* l'écran de supervision sont alors nécessaires pour réarmer et redémarrer l'automate.

Sécurités logicielles et informatiques

Des alertes sms ou mail peuvent être reçues par les expérimentateurs pour :

- ✓ **le climat des chambres*** : des valeurs maximum et minimum de chaque variable (température, humidité relative, rayonnement) sont définies pour le jour et la nuit et une alerte peut être envoyée en cas de dépassement ou de non atteinte des consignes ;
- ✓ **la qualité des images ***: une image RGB noire signifie qu'un cycle d'imagerie a été programmé la nuit par erreur ou que la caméra est en défaut ou que les lampes sont éteintes par erreur. La taille du fichier image sert de référence pour le déclenchement de cette alerte ;
- ✓ **tout défaut mécanique**** : celui-ci donne lieu à un message d'erreur sur l'écran de supervision de l'automate. Ce même message peut être envoyé par sms et/ou par mail à plusieurs adresses électroniques ou numéros renseignés.

Un message par sms est également envoyé dès la fermeture de l'application, ou si l'ordinateur est éteint (orage, fin d'autonomie de l'onduleur, arrêt volontaire ou non...).

* L'interface pour ces deux points a été conçue en interne par les informaticiens du LEPSE.

** Pour ce dernier type de défaut, les temps de latence avant l'envoi sont définis par l'utilisateur. Deux temps sont disponibles, fonction de l'interruption volontaire ou non de l'automate. Cela permet de limiter l'envoi de messages.

Une maintenance à distance

A tout moment il est possible de se connecter sur l'écran de l'ordinateur dédié à l'automate et de contrôler ce dernier à distance depuis un ordinateur ou un Smartphone distant grâce à un accès OpenVPN. Cette action peut être faite pour un simple contrôle, ou pour constater et visualiser un défaut pour lequel une action corrective pourra être apportée à distance ou nécessitera un déplacement.

La société Optimalog assure aussi la maintenance et la mise à jour logicielle par cet accès.

Sécurités sur les pesées

L'usage initial de PHENOPSIS est de peser chacun des pots afin qu'il soit comparé à un poids cible et arrosé de façon automatique par le déclenchement d'une pompe péristaltique. Si le principe reste simple, l'utilisation au cours du temps nous a montré de multiples sources d'erreurs possibles, le plus souvent bloquantes et décelables à l'exploitation des données. Nous essayons aujourd'hui de les anticiper.

Une première source d'erreur concerne la pesée des pots. Si un pot est mal pesé il sera mal irrigué car l'estimation de la quantité de solution à apporter (poids cible programmé-pesée) sera fausse.

Le Cahier des Techniques de l'INRA 2016 (89)

- ✓ Sous chacun des pots, une tare de la balance a lieu.
- ✓ Un pot physiquement absent mais déclaré présent sera pesé à 0 g ⁽¹⁾. PHENOPSIS contrôlera alors la pesée pour confirmer. Il n'arrosera pas ce pot.
- ✓ On définit également un poids minimal, ou un % du poids cible en dessous duquel il ne pourra pas y avoir d'arrosage.
- ✓ Un temps de stabilisation maximal est aussi paramétrable. Un temps long peut signifier un contact du pot à son alvéole et donc une stabilisation de la balance impossible. Ce temps dépassé, l'automate passera au pot suivant sans apporter d'eau.
- ✓ Un temps minimal de stabilisation de la pesée défini dans des variables est également déterminé si une action s'avère nécessaire en position de pesée (vérification du centrage quelquefois nécessaire pour des pots très lourds ou volumineux).
- ✓ En fin de cycle, un retour (ou non, suivant la consigne) de l'automate sur les pots pesés nuls ou mal pesés pour les raisons précédentes permettra un nouvel essai.

Les poids contrôlés sont enregistrés, donc tracés.

Sécurités sur les irrigations

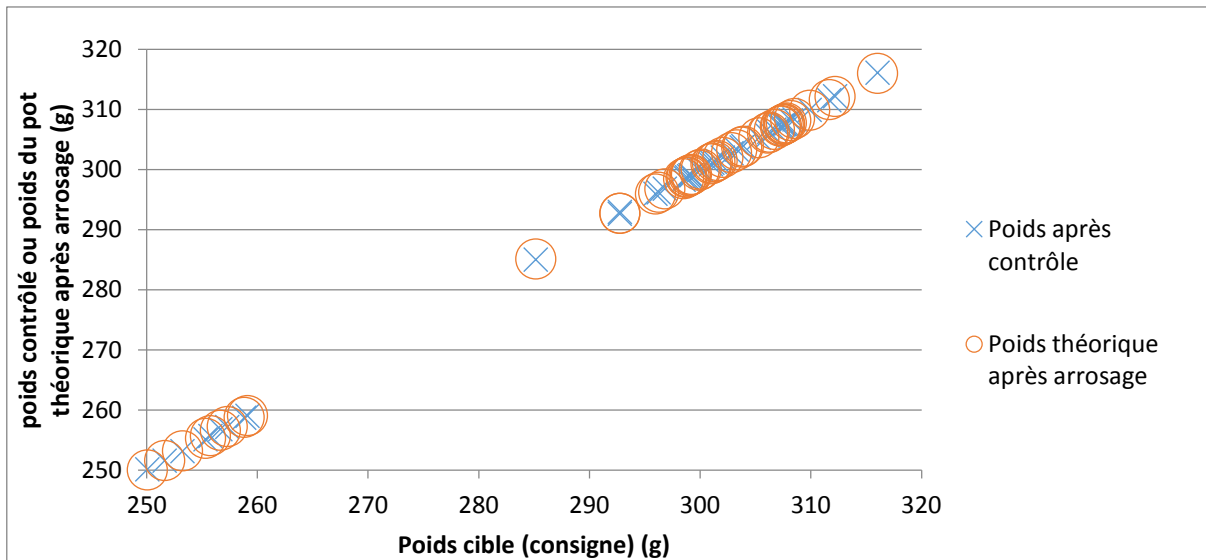
Tout comme sur les pesées, des erreurs sur les apports d'eau peuvent avoir lieu :

- ✓ une masse d'eau maximale à apporter pour chaque pot lors de chaque cycle est définie. Des masses maximales différentes sont programmables en fonction de la pompe utilisée et du type de cycle. Il est possible que cette masse maximale soit inférieure à la masse de solution nécessaire pour atteindre le poids cible du pot. Cela peut être une volonté de l'utilisateur de ne pas sur-arroser une plante trop brutalement ou une erreur d'évaluation des besoins de la plante. Une alerte en cas de limitation de la masse d'eau imposée (calculée) ne permettant pas de répondre à la consigne d'humidité du pot est alors envoyée par message électronique ⁽³⁾.

Les pots peuvent être contrôlés après irrigation :

- ✓ le pourcentage de pots contrôlés est défini par l'utilisateur et le choix des pots à contrôler est aléatoire (**Grphe 1**). Demander un pourcentage de repesée aléatoire après arrosage (0 à 100% des pots) entraîne des temps de cycle d'irrigation plus longs. Si le poids vérifié est toujours incorrect à l'issue des tentatives, un message d'alerte est envoyé ⁽²⁾. Sa validation permet à l'utilisateur de reprendre ou pas l'opération de contrôle sur ce même pot.
- ✓ une option permettant systématiquement de vérifier le poids de chaque premier pot de plateau après arrosage permet sans perte de temps de contrôler si la pompe n'est pas désamorcée.

Grphe 1 page suivante



Grphe 1. Exemple de pots contrôlés après une irrigation. Les ronds représentent le poids théorique du pot après déclenchement de la pompe. Les croix sont les poids réels des pots contrôlés après l'arrosage. Ici, la moyenne des écarts par rapport au poids cible (consigne) est de $-0.033g$, l'erreur la plus grande est de $0,4g$. Nous tolérons une erreur de $0,5g$ pour des pots de $280 g$ en moyenne. (Ici, des pots stressés et des pots témoins bien irrigués figurent sur le même graphe).

Les solutions nutritives sont localisées dans des bidons de 25 L à l'arrière de la chambre de culture. Un suivi du volume de solution disponible est visualisé à l'écran, calculé à partir du volume de solution initiale mise à disposition de l'automate. Une alerte est envoyée automatiquement quand le volume de solution disponible est trop faible (% définissable par l'utilisateur).

Un message est envoyé en fin de chaque cycle à une ou plusieurs adresses électroniques pour faire le bilan des défauts rencontrés en cours de cycle :

```
Pots poids nul(1) : 0
Pots en défaut d'irrigation avant correction : 4
Pots en défaut d'irrigation après correction(2) : 1
Pots en défaut par limitation de la quantité d'eau délivrée(3) : 2
```

Une interface plus conviviale et une utilisation plus souple

Lors d'une consultation à distance et en cours d'un cycle, il était impossible de voir sur l'interface si un utilisateur avait une action de maintenance, présent ou non dans la chambre pour une action corrective. L'interface a été améliorée pour mettre en évidence, par coloration différentielle de la flèche indicatrice de cycle en cours, qu'une maintenance est activée (**Photo 3**) et ainsi informer l'utilisateur à distance qu'un acteur agit sur l'automate et peut être physiquement présent dans la chambre malgré les sécurités.

Il est aussi possible d'écrire un commentaire visible sur l'interface pour informer les autres utilisateurs d'un point ou d'un paramétrage particulier (**Photo 3**).

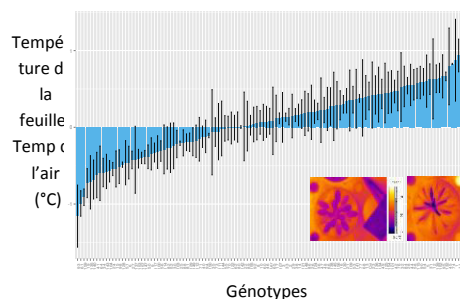
Le fluorimètre par imagerie PAM (Imaging PAM chlorophyll fluorometer, Walz, Germany) a été adapté pour la mesure de la fluorescence de chlorophylle.

Le logiciel de l'instrument Imaging Pam (logiciel Imaging Win, Walz) a été intégré à l'interface pour permettre la sortie et l'enregistrement automatique des images et fichiers acquis par la caméra en fluorescence. Il a fallu un investissement collectif des partenaires (Optimalog, Walz et LEPSE-INRA), pour adapter le système existant en tenant compte des contraintes d'encombrement, mais surtout pour coordonner et sécuriser les mesures entre l'automate et le logiciel Imaging Pam. Afin d'éviter l'illumination des plantes voisines lors du flash nécessaire à la prise d'image en fluorescence, la balance est en position élevée pour maintenir le pot dans un cône opaque. Il est possible de mesurer différents paramètres relatifs à la fluorescence de la chlorophylle comme par exemple le rendement quantique du PS II après adaptation à l'obscurité (**Photo 5**; Bresson et al., 2013, 2015). Des mesures d'autres variables « haut débit » comme l'ETR (electron transport rate), et l'absorbance sont en cours de validation.



Photo 5. Evolution du rapport de fluorescence F_v/F_m chez *Arabidopsis thaliana* au cours d'une phase de dessèchement puis de réhumectation. Imagerie en fausses couleurs (Photos : INRA-Lepse).

L'imagerie dans le spectre infrarouge (FLIR, SC645) permet de quantifier la température de surface des organes de la plante, en particulier des feuilles, et donc de déceler la variabilité des systèmes de régulation de la transpiration dans des populations de génotypes ou dans des conditions environnementales contrastées (**Graphe 2**).



Graphe 2. Différence de température entre la feuille et l'air chez une population de lignées recombinantes *Ler x Cvi* chez *Arabidopsis thaliana* (Vasseur, Vile et al., non publié).

Les mesures obtenues par la caméra reposent sur un système de prise en compte de la variabilité spatiale et temporelle des conditions environnementales par une mesure IR sur papier de cigarette positionné près du pot. Celle-ci a lieu en même temps que la mesure réalisée sur la plante indiquant la température de l'air ambiant (Dauzat et al., 2008).

Le logiciel ThermoCAM Researcher Pro (ThermoCAM Researcher Pro, 2.10) a été intégré au logiciel de PHENOPSIS pour permettre la visualisation des images thermiques. La communication entre optimaPLC et la caméra est assurée par le logiciel OptimaPLC/ThermoCAM, qui constitue le lien avec le logiciel de FLIR en mode OLE.

La connexion à l'ordinateur s'effectuait jusqu'à présent par câble FireWire (FLIR ThermoCAM B20HSV). Le câble étant très fragile, il était très difficile de le faire passer dans une chaîne porte câble soumise à de fortes contraintes sur une durée pluri-annuelle. La caméra IR est aujourd'hui connectée en Ethernet. La connexion est plus robuste, et le câble est aussi utilisé pour les caméras visibles ou de fluorescence. Un même câble peut donc avoir plusieurs utilisations. L'alimentation de la caméra n'est plus sur batterie et nécessite une prise 220 V directement sur le bras.

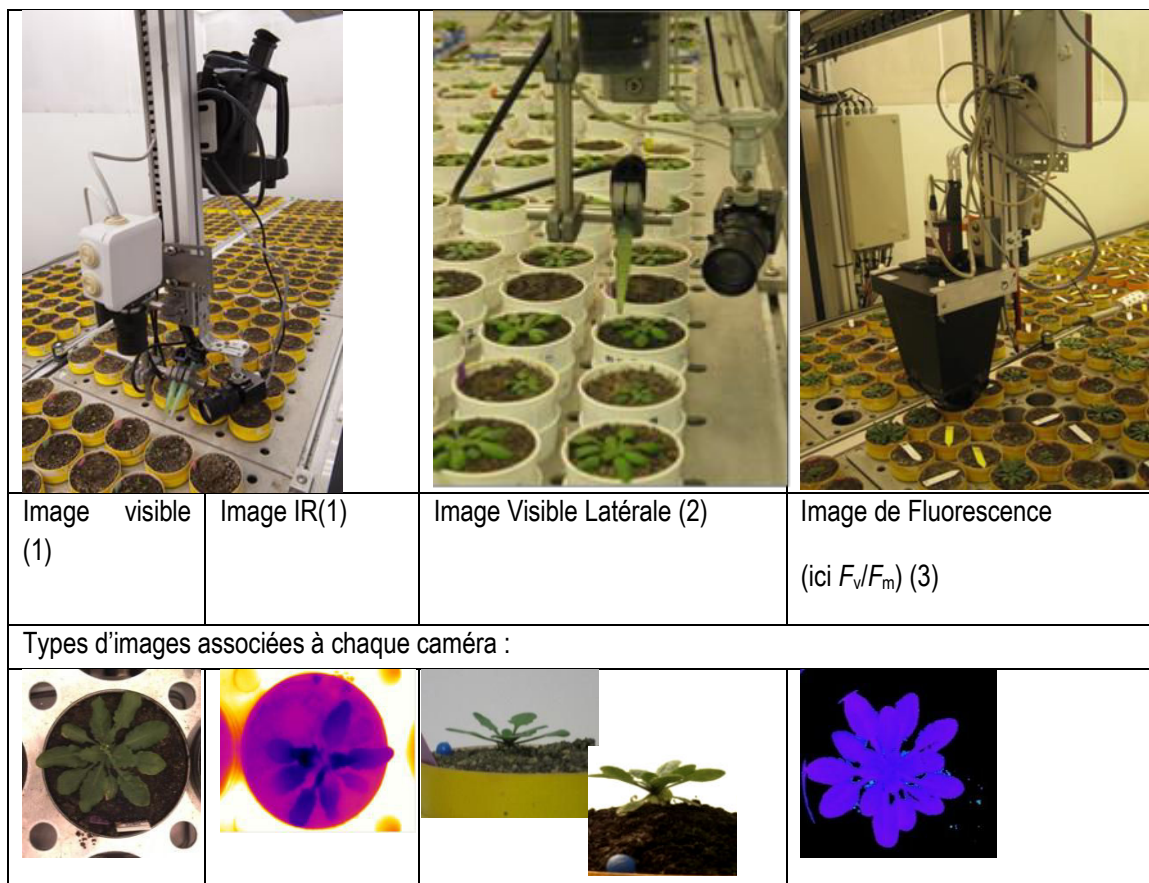


Photo 6. Mesure des quelques types de caméras montées sur PHENOPSIS et leurs images associées (Photos : INRA-Lepse).

Tous ces aménagements ont nécessité le passage de câbles nouveaux (Ethernet, alimentation des caméras, 220V...). Un dimensionnement large de la chaîne porte câble est donc nécessaire dès le départ.

Tous les types d'images sont possibles (**Photo 6**) sur une même expérimentation en même temps, sous réserve de l'ombrage causé par les instruments. Seul le cache pour la mesure de fluorescence s'enlève manuellement après chaque cycle.

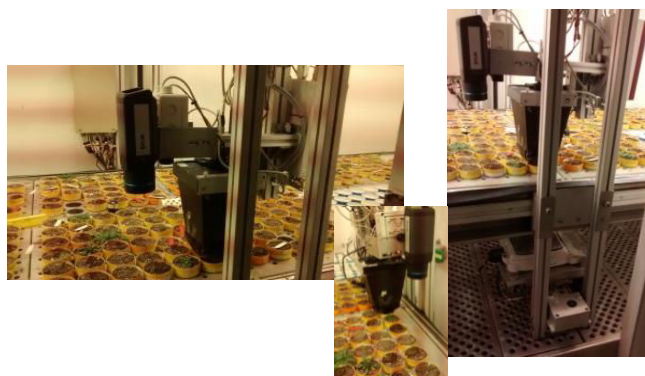


Photo 7. De gauche à droite : Caméra IR, Visible, Fluorescence sur un même portique se déplacent en même temps (Photos : INRA-Lepse).

Pouvoir imposer de nouveaux stress dans le sol

Il est possible d'utiliser deux types de solution pour l'irrigation (**Photo 7**) au cours d'une même expérimentation car le système est maintenant équipé de deux pompes péristaltiques, deux systèmes d'irrigation et deux bidons de réserve indépendants. Des stress minéraux couplés à des stress hydriques ont déjà été réalisés.



Photo 8. Deux solutions nutritives sont possibles
(Photos : INRA-Lepse).

Jusqu'à 10 cycles d'arrosage quotidiens sont programmables, ils sont indépendants : la pesée, l'irrigation, la prise d'images sont des fonctions libres (sélectionnables ou non) par cycle. La programmation s'effectue par cycle et par pot, via un fichier MS Excel, la consigne par pot étant primordiale sur celle du cycle : un pot non sélectionné pour l'arrosage ne sera pas arrosé malgré le cycle validé.

Pouvoir réaliser des traitements différents, ou des expérimentations indépendantes en même temps

Il est possible de séparer les pots d'une même expérience en deux lots pour leur imposer en cours d'expérimentation des conditions d'irrigation différentes : des pots nécessitant seulement d'être pesés plusieurs fois par jour et non arrosés (suivi de transpiration par exemple) auront des types de cycles différents des pots devant être arrosés régulièrement. Chaque pot a aussi ses propres caractéristiques et est géré individuellement: le pot X pourra ne jamais être arrosé ou pourra bénéficier de la solution nutritive 2, contrairement à son voisin.

Plusieurs expériences peuvent être déclarées en même temps, la traçabilité est alors assurée par des identifiants distincts et des fichiers séparés.

Des fichiers de consignes sont téléchargeables automatiquement ou manuellement. Ils permettent de modifier les consignes en cours de journée ou d'imposer des consignes différentes en fonction des jours. La fonction automatisable est un peu délicate à gérer et nécessite beaucoup d'attention.

Des apports de solution en quantité fixe avec ou sans pesée préalable, ou fonction d'un poids cible sont possibles. Les deux types d'apport sont complémentaires. Si les poids cibles ne sont pas encore définis ou si la balance ne peut assurer la pesée, alors on choisira un apport de solution fixe.

	Nombre de plantes	Temps de cycle estimé	Commentaire
Images Infra Rouge	504	30 min	
Irrigation	504	2h30	Dépend du % de contrôle des pots
Pesées	504	1h15	
Images de Fluorescence (Fv/Fm)	504	3h30	
Images Horizontales	504	30 min	
Images Latérales	504	1h15	
Irrigation+ ImagesV+Images IR+Images L	504	3 h	

Tableau 1. Temps d'action pour un cycle dans un PHENOPSIS de type 1 (504 pots)

Les consignes sont gérables pot à pot et/ou sur l'ensemble des pots.

Des besoins en traitement post mesure optimisés

Base de données associée : <http://bioweb.supagro.inra.fr/phenopsis/>

La base de données PHENOPSIS-DB a été conçue au LEPSE sous MySQL pour stocker toutes les informations liées aux expérimentations. Elle évolue régulièrement pour s'ajuster aux nouvelles espèces végétales étudiées ou aux développements techniques (capteurs, modules d'acquisition de données, alertes de sécurité). PHENOPSIS-DB possède une interface Web ergonomique qui établit le lien avec utilisateurs pour l'insertion et la consultation des données.



Figure 1. Interface de la base de données phenopsisDB.

La visualisation des données (météo, mesures sur les plantes, teneur en eau des pots) globales ou spatialisées est en partie automatisée à l'aide de scripts R (<https://www.r-project.org/>) disponibles dans l'interface web de la base de données.

Des macros sous Image J (<http://imagej.net/Welcome>) ont été développées pour le traitement des images et sont à la disposition des utilisateurs de la plateforme. Pour l'instant le traitement des images se fait essentiellement après l'expérimentation et est semi-automatisé. La surface foliaire projetée au cours du temps est une sortie directe des images acquises par PHENOPSIS. Un projet d'automatisation totale du traitement des images en direct avec calcul et insertion directe des surfaces de la plante et estimation du poids de la plante est actuellement à l'étude.

Une évolution de PHENOPSIS pour accueillir d'autres espèces

PHENOPSIS est aujourd'hui fortement sollicité pour permettre de cultiver d'autres espèces et répondre à des besoins plus proches de l'agronomie (espèces cultivées), de l'écologie (culture de mélange d'espèces) ou de la

génétique (autres plantes modèles). Ainsi, nous avons réalisé des expérimentations sur différentes espèces dans PHENOPSIS, telle que *Brachypodium dystachium*, la tomate, le colza, la laitue (Photos 9, 10). Selon les cas, la taille des plantes et la durée de l'expérimentation autorisent la culture dans des pots identiques à ceux utilisés pour *Arabidopsis* ou au contraire imposent de cultiver les plantes dans des pots de plus grand volume.



Photo 9. (a) Culture de *Brachypodium dystachium* dans PHENOPSIS : possible dans de petits pots, mais de plus grands volumes seraient souhaitables. (b) image latérale de *Brachypodium* prise dans phénopsis.
(Photos : INRA-Lepse).

La souplesse du système initial a facilité la réalisation des modifications nécessaires aux nouvelles demandes. En effet, des essais de culture de colza (*Brassica napus*) dans les pots destinés initialement à *Arabidopsis* (250 cm^3) ont montré non seulement un très fort impact mais également une très forte interaction entre taille du pot et réponses au stress (Dambreville et al., 2016, Figures 2 et 3). Une évolution de l'automate a été réalisée permettant l'utilisation de pots d'un diamètre de 19 cm, d'un volume de 7 L et pouvant peser jusqu'à 10 kg. Dans ce cas, 70 pots peuvent être embarqués dans PHENOPSIS.

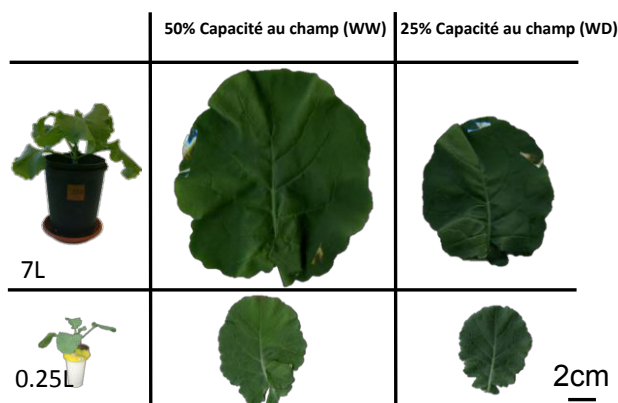


Figure 2. Surface foliaire de la troisième feuille de colza cultivé en petits pots et grands pots dans le même environnement climatique (Dambreville et al., 2016).

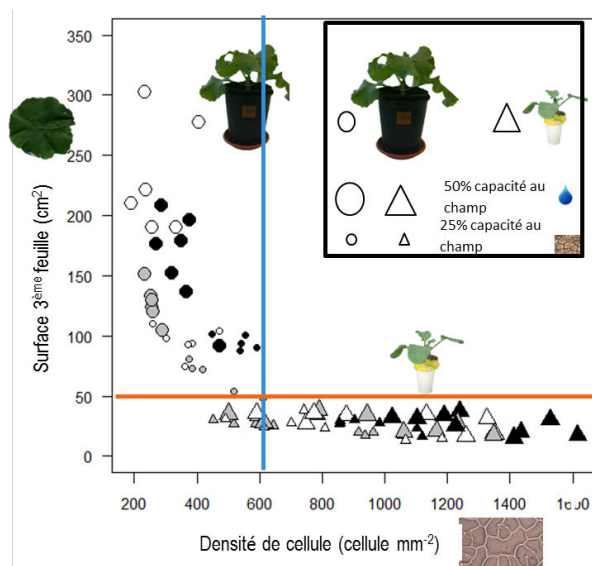


Figure 3. Surface foliaire et densité de cellules de la 3^e feuille de colza cultivé en petits pots et grands pots dans le même environnement climatique (Dambreville et al., 2016). Les différents niveaux de gris (blanc à noir, représentent trois génotypes différents).

Ces deux figures illustrent les différents phénotypes observés en fonction d'une culture en petits pots ou grands pots. L'importance de cette variable doit être prise en compte.

L'ensemble de ces modifications a été apporté et PHENOPSIS est aujourd'hui opérationnel pour fonctionner dans une gamme étendue d'espèces : de nouveaux plateaux, une balance de plus forte capacité, un vérin, et une nouvelle caméra constituent les principales modifications mécaniques pour un budget d'environ 10 k€ (modification du logiciel incluse).

La principale nouveauté est l'évolution du logiciel associé

Toutes les caractéristiques, fonctionnalités et supervision du PHENOPSIS d'origine ont été gardées. Le nouveau logiciel permet non seulement de programmer la taille de pots décrite ci-dessus, mais surtout, plusieurs autres configurations de pots. Cinq types de configurations de pots (taille et disposition) sont actuellement disponibles et modifiables dans le temps et suivant les besoins expérimentaux. Celles-ci sont gérables « en autonomie » par l'utilisateur, sans avoir recours au constructeur. Ainsi, le passage d'une configuration de 70 pots de 7 L à 504 pots de 250 mL est aujourd'hui possible en quelques clics de souris. L'étendue des possibilités est large, y compris des configurations mixtes (plateaux de types différents sur une même expérimentation).

Actuellement une nouvelle géométrie requiert seulement la fabrication de nouveaux plateaux à la dimension des pots choisis. La balance doit être adaptée au poids des pots et à la précision souhaitée. De même, le vérin et la géométrie du système de pesée doivent être dimensionnés pour s'adapter au volume et au poids des pots.

Photo 10 page suivante



Photo 10. Ici, les cultures de tomates (gauche) et de salade (droite) sont aujourd'hui possibles (Photos : INRA-Lepse).

Quelles évolutions futures ?

La recherche scientifique est soumise aux exigences sociétales et s'appuie sur les évolutions technologiques très rapides. Nous avons vu que PHENOPSIS était suffisamment flexible pour s'adapter à diverses demandes (augmentation de la taille des pots pour analyser le phénotype d'espèces végétales d'intérêt agronomique) et de nouveaux besoins (évolution/obsolescence des outils d'acquisition de données). Avec la diversification des espèces végétales d'architectures contrastées, il devient urgent de considérer la plante dans ses trois dimensions. L'addition de caméras latérales nous a déjà permis d'appréhender la croissance verticale et le mouvement des feuilles. Avec le développement des nouvelles technologies, il devient envisageable de scanner les plantes en 3D en conservant la structure initiale.

L'analyse en temps réel des données acquises pourrait permettre d'améliorer le pilotage de l'automate. Par exemple, chez les plantes en rosette comme *A. thaliana*, la surface foliaire donne une bonne estimation de la masse des plantes qui devrait être prise en compte pour ajuster l'irrigation. Cependant, l'analyse d'images en temps réel est contrainte par la qualité d'acquisition. Plusieurs méthodes (par exemple la combinaison d'images dans différents spectres lumineux, le développement de procédures informatisées) sont actuellement à l'étude pour réaliser ces développements dans les meilleures conditions.

La germination des graines reste une étape critique. Une attention particulière et une présence humaine régulière est nécessaire pour maintenir un environnement constamment humide à proximité des graines puis des plantules. L'automatisation de la brumisation au plus proche des graines est à l'étude.

Les plateaux à grands pots entraînent des effets de bordure et cet élément pourrait être amélioré. La mixité des types de plateaux implique ici une contrainte de gestion de balance due à la présence d'une poutre centrale. Celle-ci sera éliminée sur la prochaine évolution de PHENOPSIS. De plus, la balance sera soulevée par un vérin électrique et non plus pneumatique, ce qui permettra d'adapter sa course sous chacun des pots en fonction de leur dimension.

Conclusion

La conception, la sécurisation, la fiabilisation et enfin l'évolution de PHENOPSIS, ont été permis grâce à une volonté du LEPSE de conserver un outil au plus proche des questionnements scientifiques tout en s'appuyant sur

des avancées technologiques. Une attention particulière a été portée i) à la communication entre les différents acteurs, c'est-à-dire les utilisateurs, les développeurs et les constructeurs/fournisseurs, et ii) à l'anticipation des besoins futurs. Pendant les quinze années d'existence de l'automate, le constructeur est resté à disposition pour le développement des demandes successives ce qui a été et reste un facteur déterminant dans la réussite des évolutions de l'outil.

Remerciements

Nous remercions tous les utilisateurs qui ont, de près ou de loin contribué à faire de PHENOPSIS un outil efficace, simple et fiable. Toutes les idées émises ont été étudiées et le plus souvent mises en place avec l'aide d'Optimalog.

Merci à Yves Primault (www.bionef.fr) pour la société Walz pour l'application Fluorescence développée en lien avec Optimalog, ainsi que la société AM Froid pour la partie Climatisation.

Merci à Florent, Anthony, Gaëlle, Crispulo, Nicolas, Frédéric, Nathalie qui ont très largement contribué aux améliorations décrites dans cet article.

Les évolutions de PHENOPSIS décrites dans cet article ont été réalisées grâce au soutien du projet FP7-EPPN (European Plant Phenotyping Network, contrat no. 284443) dans le cadre du programme des infrastructures de recherches, du projet AgWaterBreed dans le cadre de l'EIT Climate-KIC.

Durant ce travail, François Vasseur était soutenu par un contrat CIFRE (cofinancé par l'ANRT, ministère Français de la Recherche et la société BAYER Crop Science, contrat 0398/2009 - 09 42 008), Justine Bresson était soutenue par le ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Garance Koch était soutenue par le Labex AGRO (ANR-10-LABX-001-01) et Anaëlle Dambreville était soutenue par le projet AgWaterBreed dans le cadre de l'EIT Climate-KIC.

PHENOPSIS fait partie de 'Montpellier Plant Phenotyping Platforms' (M3P, http://www6.montpellier.inra.fr/lepse_eng/M3P), composante du Projet d'Investissement d'Avenir PHENOME, labélisée IBiSA (<http://www.ibisa.net/>).

Références bibliographiques

Bresson J et al. (2013) The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytol* **200** : 558-569.

Bresson J, Vasseur F, Dauzat M, Koch G, Granier C, Vile D (2015) Quantifying spatial heterogeneity of whole-plant chlorophyll fluorescence during growth and in response to water stress. *Plant Methods* : 11:23.

Dambreville A, Giolet M, Rolland G, Dauzat M, Bédiée A, Balsera C, Muller B, Vile D, Granier C (2016) Phenotyping oilseed rape growth-related traits and their responses to water deficit: the disturbing pot size effect. *Funct Plant Biol*. DOI: 10.1071/FP16036

Dauzat M, Simon E, Granier C, Hamard P, Muller B, Christophe A, Combes D, Tardieu F, Simonneau T (2004) Un automate de phénotypage pour cultiver des plantes à des états hydriques du sol contrôlés : un outil d'aide à la caractérisation de la réponse de la croissance et de la transpiration à la sécheresse. *Cahier Tech INRA*, n° 53 ; https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/Les-Cahiers-parus/Les-N-reguliers/2004/Cahier-N-53/Art5-ct53-2004

Dauzat M, Dominique Flura D (2008) Pratiques et outils de mesure des rayonnements naturels dans les domaines visible, solaire et infrarouge. *Cahier Tech INRA*, n°thématique

M. Dauzat, A. Dambreville, J. Bresson, D. Vile, B. Muller, V. Nègre, G. Koch, F. Vasseur, A. Bédiée, M. Desigaux, D. Fourré, C. Granier

https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/Les-Cahiers-parus/Les-N-themathiques/Rayonnements-naturels. La mesure des rayonnements de grande longueur d'onde, p. 59.

Fabre J, Tireau A, Dauzat M, Granier C (2008) Développement d'une base de données de phénotypage *Arabidopsis thaliana* accessible via une interface web. Cahier Tech INRA, 65 ; https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/Les-Cahiers-parus/Les-N-reguliers/2008/cahier-65-decembre-2008,

Fabre J, Dauzat M, Nègre V, Wuyts N, Tireau A, Gennari E, Neveu P, Tisé S, Massonnet C, Hummel I, Granier C (2011) PHENOPSIS DB: An Information System for *Arabidopsis thaliana* phenotypic data in an environmental context. *BMC Plant Biol* :11.

Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dauzat M, Hamard P, Simonneau T, Tardieu F ,et al., (2006) PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytologist* **169** : 623-635.

Annexes pages suivantes

ANNEXE 1

Liste des matériels utilisés dans PHENOPSIS

Liste récapitulative des **partenaires et fournisseurs** de matériel ayant servi à la réalisation de la chambre de culture et de l'automate.

La CHAMBRE de CULTURE

	Adresse fournisseur	Tél, email ou site internet
AM Froid	Montpellier, France	0467871578
Campbell	Campbell Scientific, Shepshed, Leicester-shire, UK	http://www.campbellsci.co.uk/fr
Lampes : Philips HPI-T Plus 400W Et néons : grolux T8 36W		https://www.lampesdirect.fr/
Li-Cor	Lincoln, Ne , USA	Http://www.licor.com
Skye Instruments	Powys.LD1 6 DF U.K	http://www.skyeinstruments.com
Vaisala	Oy, Helsinki, Finlande	http://www.vaisala.com
Groupe froid	Danfoss Maneurope SA	
Humidificateur	Ambrumesnil 76550 France	http://www.devatec.com
Caillebotis	Manutan	http://www.manutan&é.com

L'AUTOMATE

Optimalog	2 rue de la Fontaine de Mié F-37540 Saint Cyr sur Loire	http://www.optimalog.com
Moteurs servomoteurs	Sanyo Denki 95958 Roissy	www.sanyodenki.co.jp
Sartorius	37075 Gottinghen, Allemagne	http://www.sartorius.com
Allied Vision: camera GC1600C	„Le Quadral“ 23 bis, rue Edouard Nieuport 92150 Suresnes France	http://www.stemmer-imaging.fr/ https://www.alliedvision.com
Electro finish (pompe)	Fontaine, France 95130 Franconville, France	Electro.finish@freesbee.fr

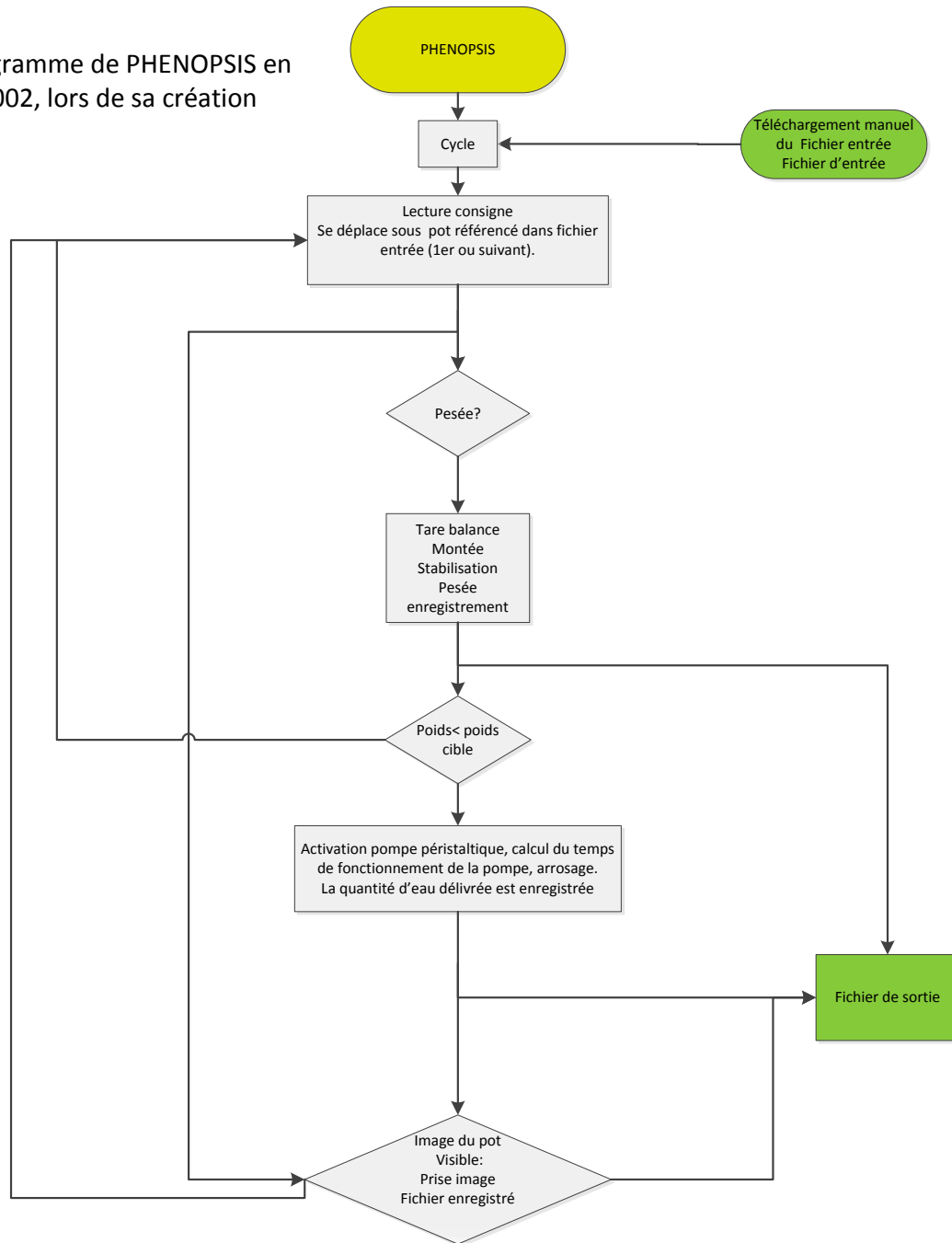
Caméras supplémentaires sur le bras ayant demandé une adaptation mécanique et logicielle particulière

Caméra IR SC645 : plage spectrale : 7,5–13 µm		http://www.flir.fr
Imaging pam, Chlorophyll Fluorescence System		http://www.walz.com http://www.bionef.fr
Camera latérale: camera Allied Vision GC1600C		http://www.stemmer-imaging.fr

ANNEXE 2

Logigramme initial de PHENOPSIS et logigramme actuel simplifiés

Logigramme de PHENOPSIS en 2002, lors de sa création



A multi-scale pipeline for reproducible analyses of tomato leaf expansion and its plasticity

G. Koch¹, A. Dambreville¹, G. Rolland¹, N. Bertin² and C. Granier¹

¹INRA-SUPAGRO, UMR 759 LEPSE, Place P. Viala, F-34060 Montpellier, France; ²INRA, UR 1115 PSH, Domaine St Paul Site Agroparc, F-84914 Avignon, France.

Abstract

Robust relationships between organ size and their cell number have been reported for different plant species and many environmental scenarios, suggesting that a large part of plant development plasticity is related to changes in cell cycle activity. Endoreduplication is a variant of the cell cycle during which DNA replication occurs without mitosis. The role of endoreduplication in plant functioning is not yet fully elucidated. However, it results in the multiplication of nuclear ploidy and interacts with cell growth as a positive correlation is often reported between cellular ploidy and cell area. The functional links between cell division, cell expansion and endoreduplication during organ development remain unclear. The relative contribution of these three processes to the final size of plant organs has been considered only in a few studies, for instance on tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) fruit or *Arabidopsis thaliana* leaf. In this study, the extent of endoreduplication, epidermal cell area and number, were measured on successive compound leaves of a common tomato genotype (WVA 106). Neither the cell area, nor the endoreduplication factor differed significantly from one leaflet to another within a leaf at a given node. In addition, these two variables did not differ spatially in a mature leaflet, from tip to base. In contrast, both variables decreased from one leaf to another, i.e. from the most mature to the youngest without correlation with final leaf size. Results are discussed in terms of the respective role of endoreduplication and cell division in individual tomato leaf expansion. They give new insights into compound leaf formation at the cellular scale.

Keywords: growth, cell division, cell expansion, endoreduplication, compound leaves, *Solanum lycopersicum*

INTRODUCTION

Tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) is the most studied fleshy fruit, and the second vegetable consumed worldwide (<http://faostat.fao.org>). This is a fully suitable model plant for integrative interdisciplinary researches as it has been investigated in many research areas. A wide range of genetic resources (cultivars, mutants, transgenic lines, segregating populations) and several genomic tools are available, among them the fully sequenced genome (The Tomato genome consortium, 2012). As in other multi-cellular organisms, growth and development of tomato fruit are characterized by a complex coordination of cell division and cell expansion (Gillaspy et al., 1993). Cell division, cell expansion and endoreduplication are prevailing growth processes, which strongly interact during tomato fruit life in relation with carbon and water fluxes. Understanding the link between cell division and expansion processes is a long standing question in plant biology (de Veylder et al., 2011; John and Qi, 2008; Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003) and a real challenge for mathematical modeling. Models of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit growth integrating cell division, cell growth and endoreduplication have been developed (Baldazzi et al., 2012; Fanwoua et al., 2013). They can predict changes in cell number, size and age over time during fruit development, under different environmental conditions. The development of fleshy pericarp tissue is characterized by numerous rounds of endoreduplication inducing a spectacular increase in DNA ploidy and mean cell size.



Although a clear relationship exists between endoreduplication and cell growth in plant organs, the exact role of endoreduplication has not been clearly elucidated (Nafati et al., 2011; Scholes and Paige, 2015). Regular cell cycle involves a DNA duplication phase followed by a division phase, i.e. mitosis. Endoreduplication is a cell cycle variant of multicellular eukaryotes in which mitosis is skipped and cells repeatedly replicate their DNA, resulting in cellular polyploidy. Endoreduplicated cells are uninucleate cells having multiplicative DNA contents. In tomato fruit, cell nuclei contain a 2C DNA amount which can reach 128C after 6 successive endoreduplication cycles (Bourdon et al., 2011). In vivo ploidy maps showed that in *Arabidopsis thaliana* leaf epidermis, this gain in DNA content is positively correlated with epidermal cell size (Boudolf et al., 2004; Melaragno et al., 1993). In agreement with these observations, numerous studies highlighted a positive correlation between these two variables (Dewitte et al., 2007; Roeder et al., 2010; Tojo et al., 2009; Vlieghe et al., 2005).

Similar observations have been reported on tomato fruit (Cheniclet et al., 2005). However, the contribution of cell division, cell expansion and endoreduplication to tomato leaf expansion has not been explored so far mainly because of the complex architecture of tomato leaves. Using tools and knowledge recently acquired for the high throughput analysis of cell division, cell expansion and endoreduplication during leaf development in *A. thaliana*, the contribution of these 3 processes to tomato leaf expansion was studied here, taking into account the complexity of compound leaf architecture. The aim of our study was to test to which extent tools and knowledge issued from multi-scale analyses of *A. thaliana* leaf expansion could be applied to the analysis of tomato leaf expansion despite its more complex architecture.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

The experiment was carried out in a growth-chamber, at Domaine St Paul Site Agroparc, in Avignon France between December 2014 and March 2015. Plants of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* 'WVA 106') were grown in 4l pots, in humus. Pots were placed in a greenhouse with a mean temperature of 23°C during the day and 20°C during the night. Air humidity varied between 60 and 70%. Plants were watered at regular intervals with a nutrient solution to avoid soil water deficit and keep the soil humidity around 60% (Liquoplant rose, Plantin).

Measurement of leaf traits at different scales

All leaf traits were measured on two representative plants, 2 months after sowing, on the first sympodial unit which had finished its vegetative development (Figure 1).

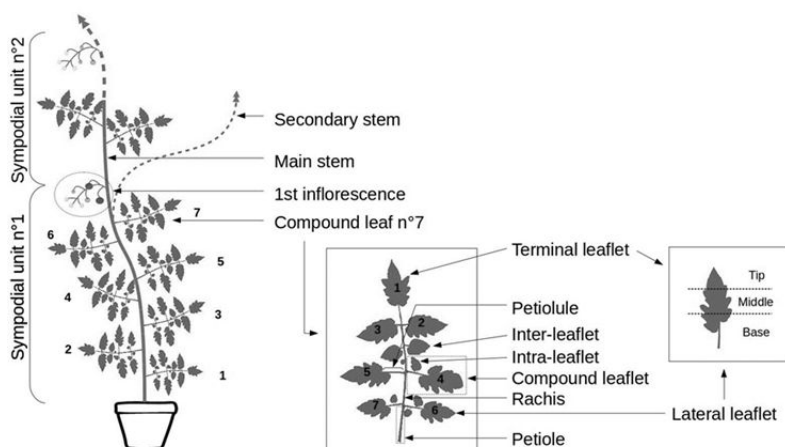


Figure 1. Layout of tomato aerial architecture.

1. Whole leaf and leaflet areas.

For both plants, successive leaves of the first sympodial unit were cut at the basis of their rachis and scanned. Whole leaf area (mm²) and individual leaflet area (mm²) were measured on the leaf scans with an image analysis software (ImageJ 1.45S, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). The terminal leaflet emerges first and the successive pairs of lateral leaflets appear in basipetal order. Small leaflets (inter-leaflet and intra-leaflet) that appear occasionally between main leaflets along the rachis or on either side of the petioles were not considered in our analyses.

2. Epidermal cell area.

Adaxial epidermal imprints were obtained by drying off a translucent varnish coat spread on the adaxial side of each leaflet for all successive leaves. The imprint was peeled off and immediately stuck on a microscope slide with one sided adhesive. Imprints were placed under a microscope (Leitz DM RB; Leica, Wetzlar, Germany) coupled to an image analyzer (ImageJ 1.45S, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). The spatial variability in mean epidermal cell area within a leaflet was analyzed by drawing non-truncated epidermal cells in a given area in three zones selected at the base, the middle and the tip of the leaflet, on the right side of the midvein. For each zone, areas of 25 cells are measured. Mean values are calculated within the 75 measurements.

3. Epidermal cell number per leaflet.

The epidermal cell number per leaflet was calculated as the ratio between leaflet area and mean epidermal cell area measured in the middle zone of the leaflet.

4. Endoreduplication factor (EF).

As soon as the mature leaves were cut, three samples of each leaflet were harvested using a punch of 8 mm diameter. They were harvested at three positions within each lamina, on the left side of the midvein: at the basis, at the middle and at the tip of the leaflet. They were immediately put in a 2ml ependorf and immediately frozen in liquid nitrogen. Samples were then stored at -80°C until flow cytometry measurements. Freezing plant material before flow cytometry analyses helped to have sharper peaks for further analyses (perhaps by compacting the nuclei that show less variation afterwards, L. de Veylder, personal communication, VIB Gent, Belgium). Frozen disks were chopped with a razor blade and incubated in 200 µL extraction buffer for 2 minutes. Extracted nuclei were fixed with 200 µL of 70% ethanol for 2 minutes and colored with 800 µL DAPI. The solutions were finally filtered to eliminate all structures with diameter higher than 30 µm. Remaining solutions were analyzed by flow cytometry with a C6 BD Accuri system. All reagents were also obtained from BD Biosciences. For each sample, 500000 nuclei (including also but to a lesser extent a few nuclei fragments) were counted and the percentage of cells with nuclei in 2C, 4C, 8C, 16C and 32C was calculated. The EF was calculated from the percentage values as follows: $EF = (0 \times \%2C) + (1 \times \%4C) + (2 \times \%8C) + (3 \times \%16C) + (4 \times \%32C)/100$ (as in Cookson et al., 2006).

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, several cellular growth traits were measured systematically at different positions within a leaflet (at the basis, the middle and the tip), in all leaflets that arose on a given leaf and on successive leaves of the first sympodial unit. To our knowledge, such spatial variability in epidermal cell area and endoreduplication had never been documented before as most studies considering these two variables together have been usually performed on simple-leafed species and in most cases comparing these variables in the middle of a leaf at a given node.

Within-leaflet variability of epidermal cell area and endoreduplication

The spatial variability in the extent of endoreduplication was assessed in the 7 leaflets of both leaves 4 (Figure 2A) and 6 (Figure 2B). The endoreduplication factor did not differ

significantly when measured at the base, the middle or the tip of each leaflet. In leaf 6, a higher endoreduplication factor was found in the middle of the 1st leaflet and both at the tip and base of the 6th leaflet. However, these observations did not reveal any consistent trends across the leaflets. Consistently, epidermal cell area did not vary significantly across a leaflet from its base to its tip (base $1542 \pm 356 \mu\text{m}^2$, middle $1470 \pm 364 \mu\text{m}^2$, tip $1430 \pm 299 \mu\text{m}^2$). These results are consistent with what is known on the spatial dynamics of cell division and cell expansion for dicotyledonous with simple leaves (Granier and Tardieu, 1998). In the 8th sunflower leaf, it was shown that both cell division and cell expansion follow a tip-to-base gradient during leaf expansion. Both processes slow down and subsequently stop their activities first at the tip of a leaf and then gradually to the base (Granier and Tardieu, 1998). As a consequence, during leaf expansion, epidermal cells are larger at the tip of the leaf than at the base, but this gradient disappears at the end of the leaf expansion period. Such patterns have also been described in *A. thaliana* (Donnelly et al., 1999; Tisné et al., 2011). Because epidermal cell area was homogeneous along the mature leaflet, mean epidermal cell area was determined by drawing non-truncated epidermal cells in a given area in three zones selected in the middle part of the lamina for each leaflet afterwards on the right side of the midvein.

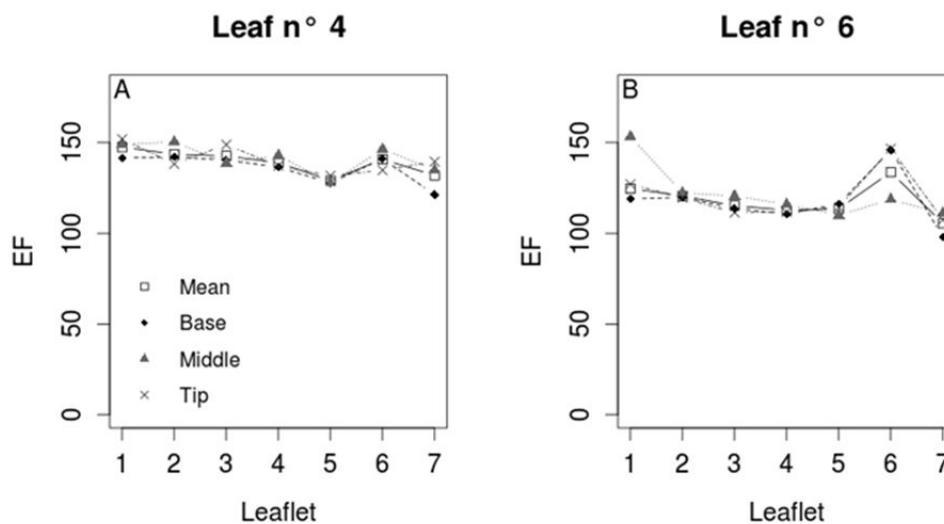


Figure 2. Effect of leaflet position on endoreduplication factor (EF) for two leaf positions (A: leaf n°4 and B: leaf n°6). EF has been calculated in three leaflet zones at the base (black diamond), middle (dark gray triangle) and the tip (light gray cross) of the leaflet. Mean values in white square are means of the three positions within the leaflet.

Between-leaflets (or within-leaf) variability of areas and cellular growth traits

Leaflet areas varied substantially within a given leaf. Leaflets 6 and 7 tended to be smaller than the other ones in all 4 leaves studied here (Figure 3A). In contrast, epidermal cell size did not differ among leaflets of a same tomato leaf, except maybe for the first leaflet which tended to have larger epidermal cells than the others (Figure 3B). This result contrasts with what is reported in other plant species when cell area is compared among successive leaves of a same plant. Size of epidermal cells in successive leaves decreases from node to node in many plant species as shown in sunflower (Granier and Tardieu, 1998), *A. thaliana* (Cookson et al., 2007; Tisné et al., 2011), or in *Ipomea* (Ashby, 1948). At the cellular scale, our analysis suggests that leaflets of a mature compound leaf can be considered as zones of a mature single leaf.

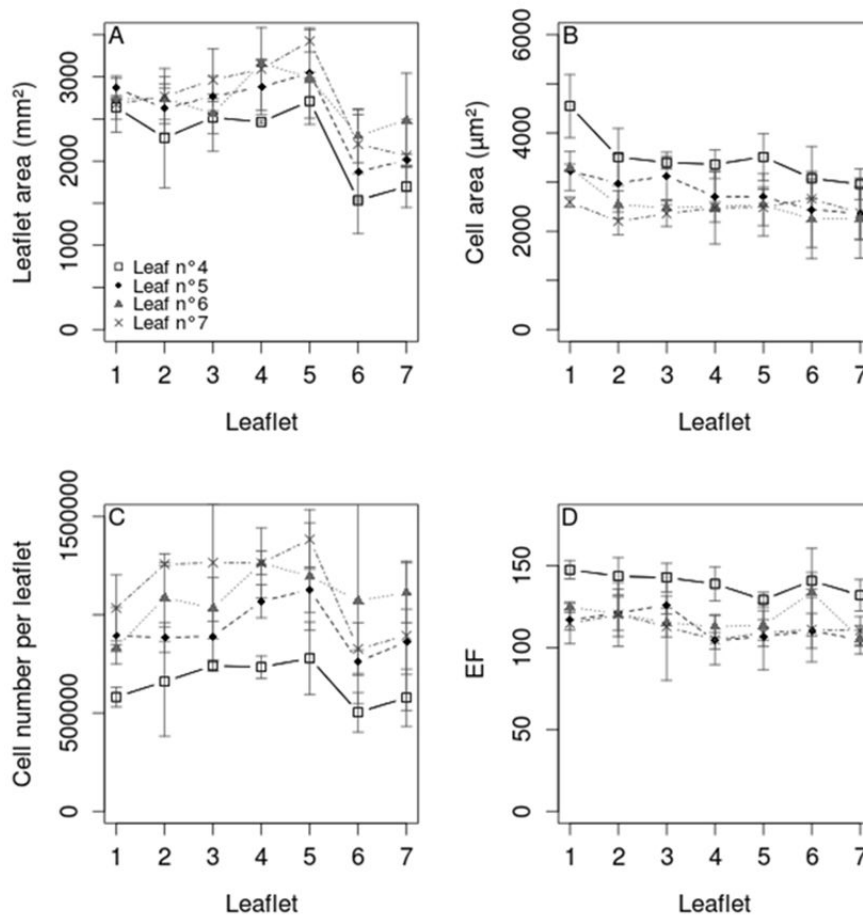


Figure 3. Effect of leaflet position on individual leaflet area (A), mean epidermal cell area in the leaflet (B), mean epidermal cell number per leaflet (C) and mean endoreduplication factor (D). Symbols and colors represent different leaf positions along the plant main axis, from the fourth to the seventh leaf, see legend in the left bottom corner in A). Bars are means \pm confidence intervals of two plants ($\alpha=0.05$).

Between-leaves (or within-sympodial unit) variability of cellular growth traits

Total leaf area, i.e. the sum of all individual leaflet areas, increased with increasing node position as shown for leaves 4 to 7 (Figure 4A). Consistently, the number of epidermal cells per leaf, i.e. the sum of epidermal cells of the 7 leaflets of the leaf, followed the same trend and increased with increasing node position (Figure 4C). In contrast, both mean epidermal cell area and endoreduplication factor decreased in the leaf from one node to another (Figure 4B, D). Such patterns are consistent with what is reported in other species such as *A. thaliana* or sunflower (Granier and Tardieu, 1998; Cookson et al., 2007; Tisné et al., 2011).

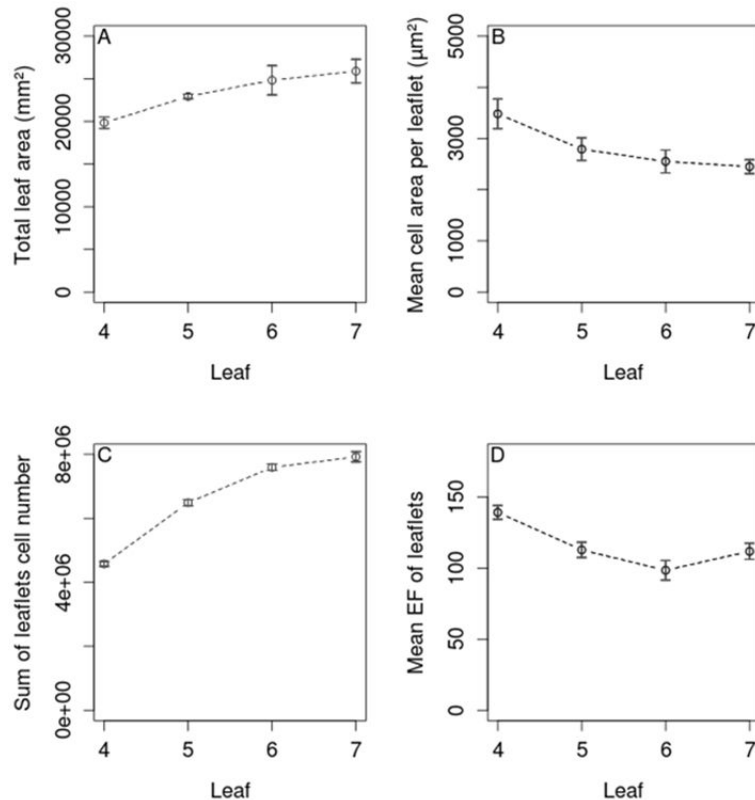


Figure 4. Effect of leaf position on total leaf area (A), mean epidermal cell area of the constitutive leaflets (B), leaf epidermal cell number (C, sum of the individual leaflet epidermal cell numbers) and mean endoreduplication factor (EF) in the leaflets (D). For mean values, bars are means \pm confidence intervals of the seven leaflets ($\alpha=0.05$).

CONCLUSIONS

The complex leaves of tomato presented an opportunity to study a multitude of gradients in the leaf from the base-to-tip zones forming a leaflet, successive single leaflets forming a compound leaf to the successive leaves forming a sympodial unit. All together our results suggest that a mature compound leaf can be considered as a single leaf at the cellular scale without any gradient in cell size within a leaflet or even among leaflets. We also reported here that the variability in leaf area along the shoot is related to the variability in epidermal cell number per leaf, but not to that of cell area as shown for other plant species. At all spatial scales, epidermal cell area and the endoreduplication factor followed similar tendencies whereas leaf or leaflet areas were related to epidermal cell number.

ACKNOWLEDGEMENTS

M. Dauzat, C. Balsera, C. Check, T. Laisné and A. Bédiée are thanked for their help during leaf harvest at different scales and image analyses. This work has been supported by a public aid from ANR as part of the program "*Investissements d'avenir*" ANR-10-LABX-001-01 Labex Agropolis.

Literature cited

Ashby, E. (1948). Studies in the morphogenesis of leaves. 2. The area, cell size and cell number of leaves of *Ipomoea* in relation to their position on the shoot. *New Phytol.* 47 (2), 177-195 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1948.tb05099.x>.

Baldazzi, N., Bertin, N., and Génard, M. (2012). A model of fruit growth integrating cell division and expansion

- processes. *Acta Hort.* 957, 191–196 <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.957.21>.
- Boudolf, V., Vlieghe, K., Beemster, G.T.S., Magyar, Z., Torres Acosta, J.A., Maes, S., Van Der Schueren, E., Inzé, D., and De Veylder, L. (2004). The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16 (10), 2683–2692. PubMed <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.024398>
- Bourdon, M., Coriton, O., Pirrello, J., Cheniclet, C., Brown, S. C., Poujol, C., Chevalier, C., Renaudin, J.-P. and Frangne, N. (2011). In planta quantification of endoreduplication using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Plant J.* 66 (6), 1089–1099.
- Cheniclet, C., Rong, W.Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.P., and Renaudin, J.P. (2005). Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol.* 139, 1984–1994.
- Cookson, S.J., Radziejewski, A., and Granier, C. (2006). Cell and leaf size plasticity in *Arabidopsis*: what is the role of endoreduplication? *Plant Cell Environ.* 29 (7), 1273–1283. PubMed <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01506.x>
- Cookson, S.J., Chenu, K., and Granier, C. (2007). Day length affects the dynamics of leaf expansion and cellular development in *Arabidopsis thaliana* partially through floral transition timing. *Ann. Bot.* 99 (4), 703–711. PubMed <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcm005>
- De Veylder, L., Larkin, J.C., and Schnittger, A. (2011). Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends Plant Sci.* 16 (11), 624–634. PubMed <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2011.07.001>
- Dewitte, W., Scofield, S., Alcasabas, A.A., Maughan, S.C., Menges, M., Braun, N., Collins, C., Nieuwland, J., Prinsen, E., Sundaresan, V., and Murray, J.A. (2007). *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (36), 14537–14542. PubMed <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0704166104>
- Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E., and Dengler, N.G. (1999). Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* 215 (2), 407–419. PubMed <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.1999.9443>
- Fanwoua, J., De Visser, P.H.B., Heuvelink, E., Yin, X., Struik, P.C., and Marcelis, L.F.M. (2013). A dynamic model of tomato fruit growth integrating cell division, cell growth and endoreduplication. *Func. Plant Biol.* 40, 1098–1114.
- Gillaspy, G., Ben-David, H., and Gruissem, W. (1993). Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* 5 (10), 1439–1451. PubMed <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.5.10.1439>
- Granier, C., and Tardieu, F. (1998). Spatial and temporal analyses of expansion and cell cycle in sunflower leaves. A common pattern of development for all zones of a leaf and different leaves of a plant. *Plant Physiol.* 116 (3), 991–1001. PubMed <http://dx.doi.org/10.1104/pp.116.3.991>
- John, P.C.L., and Qi, R. (2008). Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. *Trends Plant Sci.* 13 (3), 121–127. PubMed <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.004>
- Melaragno, J.E., Mehrotra, B., and Coleman, A.W. (1993). Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5 (11), 1661–1668. PubMed <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.5.11.1661>
- Nafati, M., Cheniclet, C., Hernould, M., Do, P.T., Fernie, A.R., Chevalier, C., and Gévaudant, F. (2011). The specific overexpression of a cyclin-dependent kinase inhibitor in tomato fruit mesocarp cells uncouples endoreduplication and cell growth. *Plant J.* 65 (4), 543–556. PubMed <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04446.x>
- Roeder, A.H.K., Chickarmane, V., Cunha, A., Obara, B., Manjunath, B.S., and Meyerowitz, E.M. (2010). Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* 8 (5), e1000367. PubMed <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000367>
- Scholes, D.R., and Paige, K.N. (2015). Plasticity in ploidy: a generalized response to stress. *Trends Plant Sci.* 20, 165–175.
- Sugimoto-Shirasu, K., and Roberts, K. (2003). "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Cur. Op. Plant Biol.* 6, 544–553.
- Tisné, S., Barbier, F., and Granier, C. (2011). The ERECTA gene controls spatial and temporal patterns of epidermal cell number and size in successive developing leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 108 (1), 159–168. PubMed <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcr091>
- Tojo, T., Tsuda, K., Yoshizumi, T., Ikeda, A., Yamaguchi, J., Matsui, M., and Yamazaki, K. (2009). *Arabidopsis* MBF1s control leaf cell cycle and its expansion. *Plant Cell Physiol.* 50 (2), 254–264. PubMed <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcn187>

Vlieghe, K., Boudolf, V., Beemster, G.T.S., Maes, S., Magyar, Z., Atanassova, A., de Almeida Engler, J., De Groot, R., Inzé, D., and De Veylder, L. (2005). The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endocycle in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 15 (1), 59–63. PubMed <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.038>

Substrat SP 15 %

Composition :

Code : 532



Structure : fibreuse

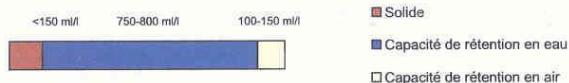
Données chimiques :




Fertilisation : 1,5 kg de 14-16-18

pH (H₂O) * : 6 +/- 0,3

*Selon la norme EN 13 037 (dilution 1/5)

Propriétés physiques : analyse selon la méthode NF EN 13041

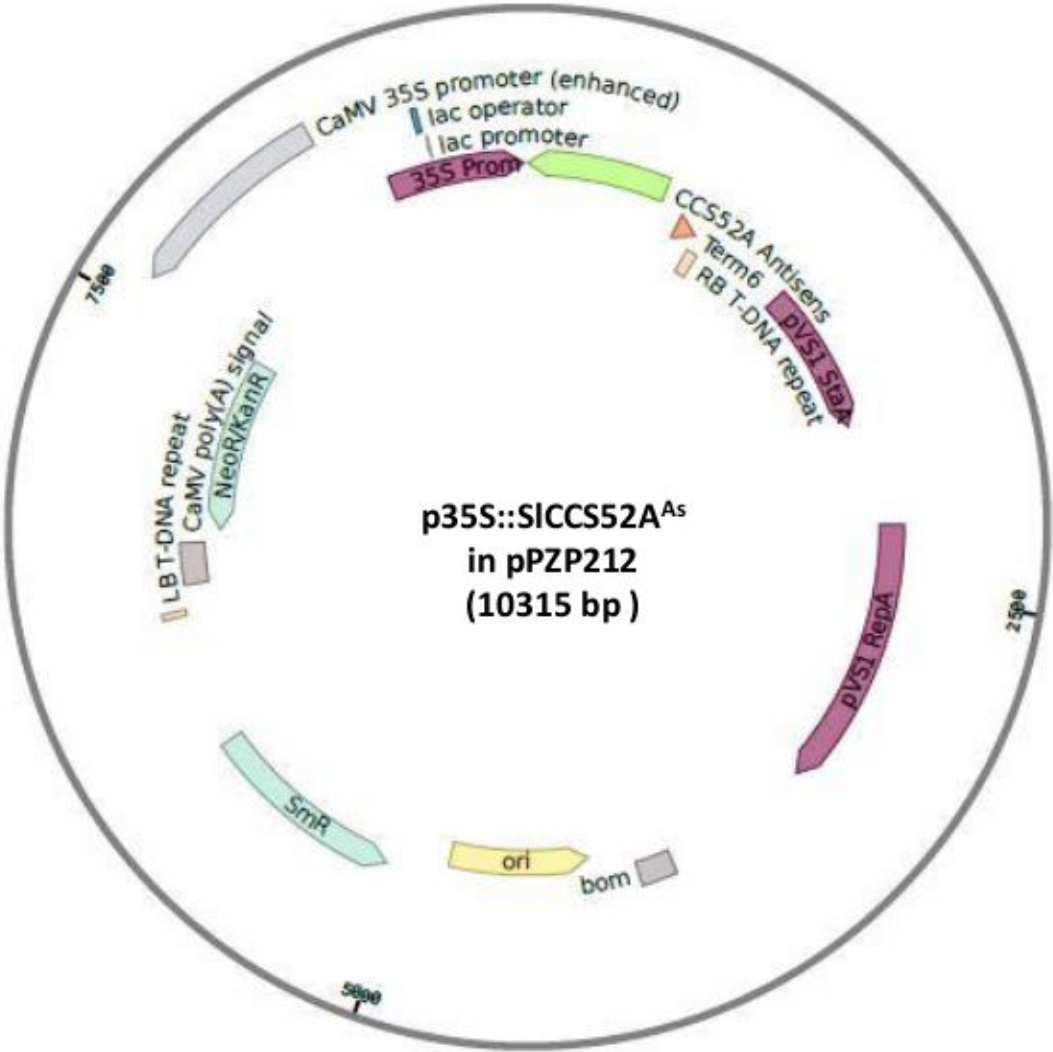


Taille de pot	Commentaires	Utilisation
 pots de 10 et plus	 Les tourbes de sphaigne de haute qualité assurent rétention en air, eau et éléments nutritifs du substrat. Présence de fibres de tourbe pour l'aération. Associée à l'argile fine, elle améliore les qualités de ré-humectation du substrat. L'argile permet également d'alourdir la potée de chrysanthème et de la stabiliser. Bonne tenue sur le sec.	 chrysanthèmes

Toute information relative aux produits que nous fournissons a été établie selon nos connaissances actuelles.
 Ainsi notre documentation ne prétend être ni exhaustive ni exacte en toutes circonstances.
 Nous nous réservons donc le droit d'y apporter des modifications.
 Toutes nos recommandations d'emploi ne sont pas directives, elles doivent être adaptées aux conditions locales et aux règles de l'art.

Klasmann-Deilmann France S.a.r.l.
 1179 chemin de Bessey - Ruy - BP 391 38309 Bourgoin Jallieu cedex - France
 Tél. +33 4 74435230. Telefax +33 4 74439862 - info@klasmann.fr - www.klasmann.fr
 S.a.r.l. au capital de 250 000 Euros - R.C.S. Bourgoin Jallieu B - SIRET 319 740 171 00016.515 L

Représentation schématique de la construction plasmidique utilisée pour effectuer la transformation (protocole décrit dans Mathieu-rivet *et al.*, 2010) à l'origine de la lignée transgénique Pro35S::SICCS52AAs.



Représentation schématique de la construction plasmidique utilisée pour effectuer la transformation (protocole décrit dans Mathieuvivet *et al.*, 2010) à l'origine de la lignée transgénique ProPEPC2::CCS52A_{OE}.

