



HAL
open science

Etat hydrique des tissus végétaux mesuré par IRM

Rodolphe Leforestier

► **To cite this version:**

Rodolphe Leforestier. Etat hydrique des tissus végétaux mesuré par IRM. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1S006 . tel-03246948

HAL Id: tel-03246948

<https://theses.hal.science/tel-03246948v1>

Submitted on 2 Jun 2021

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 596

Matière, Molécules, Matériaux

Spécialité : *Physique*

Par

Rodolphe LEFORESTIER

Etat hydrique des tissus végétaux mesurés par IRM

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 23/04/2021

Unité de recherche : Centre INRAE Bretagne-Normandie, UR 1466 OPAALE

Rapporteurs avant soutenance :

Dominique Petit

Directeur de Recherche – Laboratoire Charles Coulomb Montpellier

Marc Lahaye

Directeur de Recherche – INRAE Nantes

Composition du Jury :

Président :

Giulio Gambarota

Professeur des Universités – Université de Rennes 1

Examineurs : Maude Ferrari

Ingénieure de Recherche – Université de Lorraine Nancy

Giulio Gambarota

Professeur des Universités – Université de Rennes 1

Dir. de thèse : Maja Musse

Chargée de Recherche – INRAE Rennes

Co-dir. de thèse : François Mariette

Directeur de Recherche – INRAE Rennes

REMERCIEMENTS

Ce projet a été réalisé dans les locaux de l'équipe IRM-Food du centre INRAE de Rennes Beaugard et a été financé conjointement par l'institut INRAE et la région Bretagne, j'adresse donc mes remerciements à ces parties pour leur contribution à l'aboutissement de ce projet.

Tout d'abord, je tiens à remercier très chaleureusement ma directrice de thèse Maja Musse ainsi que mon co-directeur François Mariette sans qui la réalisation de ce travail n'aurait été possible. Merci pour votre grande patience, votre implication et votre disponibilité, ainsi que pour la confiance que vous m'avez accordée. Vous avez toujours su me motiver lorsque j'en avais besoin et j'ai toujours pu compter sur votre soutien indéfectible. Vos précieux conseils m'ont énormément apporté tout au long de ces 3 années, je garderai un très bon souvenir de nos nombreux échanges, très enrichissants tant sur le plan humain que scientifique, qui ont permis de sans cesse faire évoluer mon travail et de surmonter les difficultés rencontrées lors de la rédaction de cette thèse.

Ensuite, je remercie Stéphane Quellec pour son éternelle bonne humeur et pour m'avoir familiarisé avec cette machine parfois capricieuse qu'est l'IRM.

J'adresse également mes remerciements à Guylaine Collewet, son expertise sur les problèmes d'ajustements de données expérimentales m'a été d'une aide très précieuse.

Je souhaite remercier Mireille Cambert et Mélanie Hupel pour leur implication dans l'acquisition des données RMN, ainsi que Sylvain Challos pour sa contribution à la résolution des problèmes de segmentation des images 3D.

Merci à Anna, stagiaire du master 2 RIA à Nantes, pour la grande qualité de son travail et la rigueur dont elle a su faire preuve lors de l'acquisition des données relatives à la déshydratation de la tomate, et dans l'application de protocoles expérimentaux parfois très fastidieux.

Un merci tout particulier à Mesdames et Messieurs les membres du jury, qui ont accepté de lire et d'évaluer le fruit de ce travail : Mr. Dominique Petit et Mr. Marc Lahaye en tant que rapporteurs, Mme. Maude Ferrari et Mr. Giulio Gambarota en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe IRM-Food pour l'accueil très chaleureux qui m'a été réservé ainsi que l'ensemble des membres d'INRAE pour la bonne ambiance générale régnant au sein de l'institut, et tout particulièrement à Anne Tremier, directrice de l'unité OPAALE, pour avoir effectué les démarches nécessaires à la prolongation de ma thèse afin de faire face au retard engendré par la situation sanitaire.

Merci à Judicaël, Yves, Julie, Ghina, Elham, Célia, Antoine, Kossigan, Clara, Romain, Younes, Victor pour tous les moments de convivialité et de bonne humeur partagés sur la pause du midi ou autour d'un café.

Je tiens à remercier ma famille, mon père, mes sœurs Eliza et Solveig, Hervé, Romain, et ma grand-mère pour leurs encouragements et leur soutien affectueux et moral.

Un grand merci à mes amis ainsi la grande famille du REC Rugby à laquelle j'appartiens depuis 12 ans qui m'ont permis d'évacuer le stress, sur et en dehors du terrain.

Enfin je ne peux m'empêcher de penser à ma mère à qui j'avais promis de poursuivre mes études, et qui j'en suis sûr, serait fière de moi aujourd'hui.

A ma mère,

ABBREVIATIONS

IRM/MRI: Imagerie par Résonance Magnétique/Magnetic Resonance Imaging

RMN/NMR: Résonance Magnétique Nucléaire/Nuclear Magnetic Resonance

RSB/SNR: Rapport Signal sur Bruit/Signal Noise Ratio

MSE: Multi-Spin Echo

PFGSE: Pulsed-Field Gradient-Stimulated Echo

TE: Temps d'Echo/Echo Time

TR: Temps de répétition/Repetition Time

τ : Espace inter-pulse/Pulse spacing

RD: Délai de récupération/Recovery Delay

ADC: Coefficient de Diffusion Apparent/Apparent Diffusion Coefficient

MEM: Méthode du Maximum d'Entropie/Maximum Entropy Method

L-M: Méthode de Levenberg-Marquardt

C-R: Carver-Richards

FID: Signal de Précession Libre/Free Induction Decay

SAR: Taux d'Absorption Spécifique/Specific Absorption Rate

TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
Abbréviations	7
Table des matières	9
Chapitre 1 : Introduction	15
1.1. Contexte et Objectifs.....	16
1.1.1. IRM et RMN	16
1.2. Objectifs de la thèse	51
Chapitre 2: Matériels et Méthodes.....	53
2.1. Méthodes de mesure IRM.....	54
2.1.1. Dispositif de régulation thermique compatible IRM	54
2.1.2. Estimations des temps de relaxation transversale	55
2.1.3. Mesure du coefficient de diffusion	59
2.1.4. Microporosité apparente	62
2.2. Estimation des paramètres du modèle de Carver-Richard	63

Chapitre 3: Impact of chemical exchange on transverse relaxation at low and moderate magnetic field strengths for sugar solutions representative of fruit tissues analyzed by simulation and MRI experiments	71
3.1. Résumé	72
3.2. Introduction.....	73
3.3. Materials and methods	75
3.3.1. Numerical Simulation	75
3.3.2. Experimental	76
3.3.2.1. Samples	76
3.3.2.3. Estimation of the Carver and Richards NMR parameters	78
3.4. Results and discussion.....	78
3.4.1. Simulated data	78
3.4.2. Effect of magnetic field strength.....	81
3.4.3. Effects of temperature	82
3.4.4. Imaging Experiment at 1.5T	83
3.5. Appendix.....	90
3.5.1. Effects of sugar concentration	90
3.5.2. Effects of sugar structure	91

3.5.3. Effects of pH	92
Chapitre 4: MRI study of temperature dependence of multi-exponential transverse relaxation times in tomato	
4.1. Résumé	96
4.2. Introduction.....	97
4.3. Materials and Methods	99
4.3.1. Plant material and solutions	99
4.3.2. Magnetic Resonance Imaging	100
4.4. Results and discussion.....	103
4.4.1. Changes with temperature in T_2 distributions of tomato pericarp	103
4.4.2. Evaluation of the effects of temperature on bulk transverse relaxation	106
4.4.3. Apparent diffusion coefficient	111
4.5. Discussion.....	114
4.6. Conclusion	117
4.7. Supplementary Material	118
Chapitre 5: Étude IRM de l'impact de la déshydratation de tissus de tomate sur les temps de relaxation transversale multi-exponentiels	
5.1. Introduction.....	122

5.2. Matériels et méthodes	123
5.2.1. Déshydratation et caractérisation de tomates	123
5.2.2. Acquisition des images IRM	125
5.2.3. Mesures de T_2 et ADC dans des solutions modèles	126
5.2.4. Traitement des images IRM	126
5.3. Résultats	128
5.3.1. Impact de la concentration en sucre sur les paramètres de relaxation et le coefficient de diffusion des solutions aqueuses	128
5.3.2. Impact de la déshydratation sur les caractéristiques morphologiques et la composition et des tissus	130
5.3.3. Variation des paramètres de relaxation en fonction des modalités de séchage	134
5.4. Discussion	145
5.4.1. Impact de la composition et des caractéristiques structurales des tissus sur les temps de relaxation	145
5.4.2. Attribution des composantes du signal relaxation aux compartiments cellulaires	148
5.5. Conclusion	150
Chapitre 6: Discussion générale et perspectives	151
6.1. Comment interpréter les informations du signal de relaxation dans les végétaux ?.	152

6.1.1. Relaxation en l'absence de compartimentation	153
6.1.2. Relaxation dans les systèmes compartimentés	155
6.2. Quelles sont les informations accessibles par la mesure du coefficient de diffusion ?	159
6.3. Conclusions et perspectives	161
Valorisation du travail effectué dans le cadre de cette thèse	163
7.1. Publications:	163
7.2. Communications:	163
Références.....	164

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

1.1.1. IRM ET RMN

1.1.1.1. Bases de l'IRM

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie non-invasive, reposant sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN). Si l'on doit la découverte de ce phénomène à Isidor Isaac Rabi en 1938, ce sont les travaux de Felix Bloch et d'Edward Mills Purcell qui poseront les bases des méthodes actuelles de détection du signal RMN. Au cours des années 50, la RMN devient un domaine d'étude à part entière et de nombreuses équipes travaillent pour mettre en évidence ses propriétés.

Dans le domaine biomédical, Raymond Damadian est le premier à pressentir l'intérêt de la RMN en démontrant en 1971, que certains tissus sains et cancéreux possèdent des temps de relaxation T_1 et T_2 différents [1]. Cependant, on doit les premières acquisitions d'images IRM à Paul C. Lauterbur, qui a obtenu en 1973 des images de deux tubes remplis d'eau [2]. Puis en 1976, Peter Mansfield réalise les premières images sur l'homme [3]. On voit apparaître les premiers imageurs commerciaux au début des années 1980. P. Lauterbur et P. Mansfield reçoivent un prix Nobel pour leurs travaux en 2003.

Aujourd'hui, afin de gagner en sensibilité, les constructeurs essaient de proposer des appareils produisant des champs magnétiques de plus en plus intenses (jusqu'à 7 Teslas pour un imageur corps entier en utilisation clinique, 11.7 Teslas en utilisation préclinique).

Si l'utilisation de ces appareils a longtemps été réservée au monde médical, en partie en raison de leur coût élevé, d'autres domaines montrent un intérêt pour l'IRM, notamment la biologie animale [4] mais aussi, la biologie végétale ainsi que l'étude de produits agro-alimentaires [5-9], l'étude des matériaux en génie civil [10], l'étude de la porosité des roches en géologie [11], ou encore pour l'étude de processus chimiques [12].

L'IRM présente différents avantages, cette technologie est non-invasive et non-destructive et permet donc le suivi temporel d'un organisme vivant, et contrairement à la tomographie à rayons X utilisant un rayonnement ionisant, sans danger pour le personnel et les objets d'étude.

1.1.1.1.1. Phénomène de Résonance Magnétique

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un phénomène physique qui se produit lorsque des noyaux placés dans un champ magnétique, absorbent et réémettent un rayonnement électromagnétique. Ce phénomène ne concerne que les noyaux possédant un spin non nul, c'est-à-dire ceux possédant un nombre impair de protons et/ou de neutrons. Le noyau de spin $\frac{1}{2}$ le plus utilisé en RMN étant le proton ^1H en raison de sa forte présence dans l'eau et les lipides contenus dans les tissus vivants, mais d'autres noyaux tels que ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na et ^{31}P peuvent également être utilisés.

1.1.1.1.1.1. Approche quantique

Un noyau de spin $\frac{1}{2}$ possède un moment magnétique $\vec{\mu}$ qui peut prendre des orientations aléatoires en l'absence de champ magnétique extérieur. Lorsqu'il est placé dans un champ magnétique uniforme \vec{B}_0 son moment magnétique $\vec{\mu}$ peut alors prendre deux orientations différentes, parallèle ($\|\vec{\mu}_{0p}\| = \gamma\hbar/2$) ou antiparallèle au champ \vec{B}_0 ($\|\vec{\mu}_{0a}\| = -\gamma\hbar/2$). A chacune de ces orientations correspond un niveau d'énergie : $E_1 = -\vec{\mu}_{0p} \cdot \vec{B}_0$ (parallèle) et $E_2 = -\vec{\mu}_{0a} \cdot \vec{B}_0$ (antiparallèle).

$$\boxed{E_1 = -\frac{1}{2}\gamma\hbar B_0} \quad \text{Eq.1-1}$$

$$\boxed{E_2 = \frac{1}{2}\gamma\hbar B_0} \quad \text{Eq.1-2}$$

Avec γ : rapport gyromagnétique (rapport entre le moment magnétique et le moment cinétique d'une particule) et \hbar : constante de Planck réduite ($\hbar/2\pi$).

L'écart entre les deux niveaux est proportionnel à \vec{B}_0 :

$$\boxed{\Delta E = E_2 - E_1 = \gamma \hbar B_0} \quad \text{Eq.1-3}$$

Dans le cas d'un échantillon de matière contenant N noyaux placés dans un champ magnétique \vec{B}_0 , la répartition des spins entre les 2 niveaux d'énergie se fait conformément à la distribution de Boltzmann qui indique que le nombre n_i de spins présents sur le niveau i est proportionnel à $e^{\frac{-E_i}{K_B T}}$:

$$\boxed{\frac{n_1}{n_2} = e^{\frac{\Delta E}{K_B T}}} \quad \text{Eq.1-4}$$

Avec K_B : constante de Boltzmann et T la température de l'échantillon en kelvins.

Il y a donc plus de spins sur le niveau d'énergie le plus faible et il en résulte un moment magnétique macroscopique $\vec{M}_0 = \sum \vec{\mu}$ colinéaire à \vec{B}_0 .

$$\boxed{\|\vec{M}_0\| = (n_1 - n_2)\gamma \hbar} \quad \text{Eq.1-5}$$

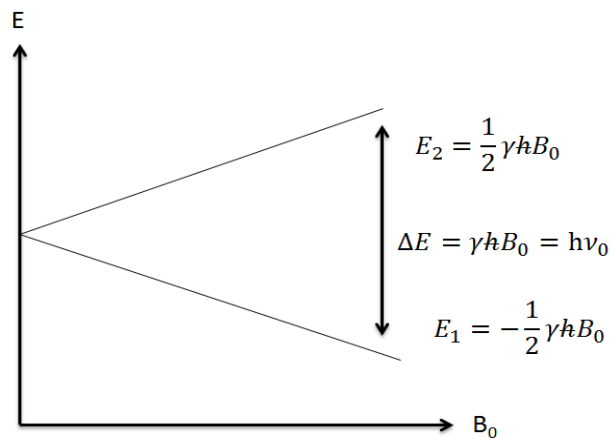


Figure 1-1 : niveaux d'énergie possibles d'un noyau de spin $\frac{1}{2}$.

En fournissant une quantité d'énergie ΔE par le biais d'une onde électromagnétique à la fréquence de résonance ν_0 (aussi appelée fréquence de précession ou fréquence de Larmor), il est possible d'induire des transitions d'un niveau d'énergie à un autre (*Figure 1-1*).

$$\boxed{\nu_0 = \gamma \frac{B_0}{2\pi}} \quad \text{Eq.1-6}$$

L'apport d'énergie par l'onde RF fait passer les spins du niveau d'énergie E_1 vers le niveau d'énergie E_2 (position parallèle vers la position antiparallèle). Le nombre de protons passant au niveau d'énergie supérieur dépend de l'intensité de l'onde RF et de sa durée d'application.

A l'arrêt de l'application de l'onde RF le système va retourner vers son état d'équilibre (niveau d'énergie E_1) en restituant l'énergie progressivement, selon deux phénomènes simultanés :

- la relaxation longitudinale selon un temps caractéristique T_1
- la relaxation transversale selon un temps caractéristique T_2 .

1.1.1.1.2. Phénomène de Relaxation

1.1.1.1.2.1. Relaxation T_1

La relaxation longitudinale, aussi appelée relaxation spin-réseau correspond au retour à l'état initial des spins par transfert d'énergie thermique au milieu moléculaire environnant. Il caractérise le retour à la valeur M_0 de la composante longitudinale M_z selon une loi exponentielle de constante de temps T_1 :

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right) \quad \text{Eq.1-7}$$

La valeur de T_1 est spécifique à chaque tissu et dépend de l'intensité du champ magnétique B_0 .

1.1.1.1.2.2. Relaxation T_2

La relaxation transversale ou relaxation spin-spin, correspond à la disparition progressive de l'aimantation transversale. Celle-ci correspond à un état de cohérence de phase entre les différents spins. La relaxation transversale (spin-spin) est due à des échanges d'énergie entre spins. Ces interactions s'établissent par l'existence d'un champ local qui se superpose au niveau de chaque noyau avec le champ B_0 . Ainsi, chaque noyau ne résonne pas exactement à la même fréquence que ses voisins, ceci entraînant un déphasage progressif des spins entre eux et donc la perte de l'aimantation transversale M_{xy} .

L'aimantation transversale M_{xy} décroît exponentiellement pendant la relaxation spin-spin selon la loi :

$$M_{xy}(t) = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad \text{Eq.1-8}$$

Comme le T_1 , les valeurs de T_2 dépendent de la nature physico-chimique du milieu étudié, cependant elles sont indépendantes de l'intensité du champ magnétique principal B_0 .

En pratique la relaxation transversale observée est plus rapide que la relaxation théorique attendue, on parle alors de décroissance T_2^* . Cela est dû aux inhomogénéités de champ \vec{B}_0 qui accroît le déphasage de spins.

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta B_0 \quad \text{Eq.1-9}$$

1.1.1.1.2.3. Notion de déplacement chimique

En raison de l'environnement moléculaire légèrement différent pour chaque noyau, la fréquence de résonance n'est tout à fait la même pour tous les protons en solution, car les électrons de l'environnement chimique du proton agissent comme un bouclier vis-à-vis de ce dernier. A l'échelle de ces noyaux, le champ magnétique B_{loc} est donc légèrement différent B_0 . Cette différence est appelée déplacement chimique.

Cette fréquence de résonance est déterminée par le champ magnétique appliqué au proton à l'échelle atomique : $B_{loc} = B_0(1 - \sigma)$

- σ : constante de blindage

En pratique le déplacement chimique s'exprime en ppm :

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad \text{Eq.1-10}$$

- ν : fréquence de résonance du proton sondé ($=\gamma \frac{B_{loc}}{2\pi}$)
- ν_{ref} : fréquence de résonance du composé de référence (généralement du tétraméthylsilane)

1.1.1.1.2.4. Détection du signal RMN

Les phénomènes de relaxation longitudinale et transversale apparaissent simultanément après une impulsion RF. Que ce soit en RMN ou en IRM, le signal de relaxation est recueilli grâce à une antenne réceptrice. Cette antenne, consiste en une bobine qui va récupérer par induction, le signal de l'aimantation transversale, sous forme de courant électrique. On obtient alors un courant électrique alternatif décroissant appelé signal de précession libre (ou FID: free induction decay). En reliant les sommets de chaque alternance positive du signal de FID, on obtient la courbe de décroissance T_2^* .

Dans le cas des liquides, le signal de FID ne permet pas d'obtenir des informations sur le T_2 , en raison inhomogénéités du champ magnétique B_0 entraînant un déphasage des spins, de même que les informations sur le T_1 ne sont pas directement accessibles car l'aimantation longitudinale est alignée selon B_0 . Afin de s'affranchir d'inhomogénéités de champ, on emploie une séquence appelée écho de spin (ES), qui consiste à placer une impulsion RF de 180° après une impulsion initiale de 90° (*Figure 1-2*). Dans ce cas, les déphasages dus aux inhomogénéités de B_0 sont compensés. Ce phénomène d'écho a été découvert par Hanh en 1950 [13] après avoir appliqué deux impulsions RF successives de 90° . En appliquant la séquence SE plusieurs fois en incrémentant le délai entre les impulsions d'excitation et de refocalisation, il est possible d'échantillonner la courbe de relaxation transversale et d'estimer ainsi la valeur du T_2 . Cette séquence a par la suite été améliorée par Carr, Purcell, Meiboom et Gill [14], dans ce cas on répète des impulsion de 180° après une impulsion initiale de 90° afin d'échantillonner la courbe de décroissance T_2 en une seule excitation. En plus de réduire le temps de mesure, cette approche permet de limiter le biais induit par la diffusion des molécules dans un champ magnétique inhomogène, car le délai entre les impulsions de refocalisation est relativement court et constant. C'est cette séquence qui est couramment utilisée en RMN pour mesurer le T_2 , connu sous le nom de multi-écho de spin ou CPMG lorsque les impulsions de refocalisation sont déphasées précisément de 90° par rapport à l'impulsion d'excitation.

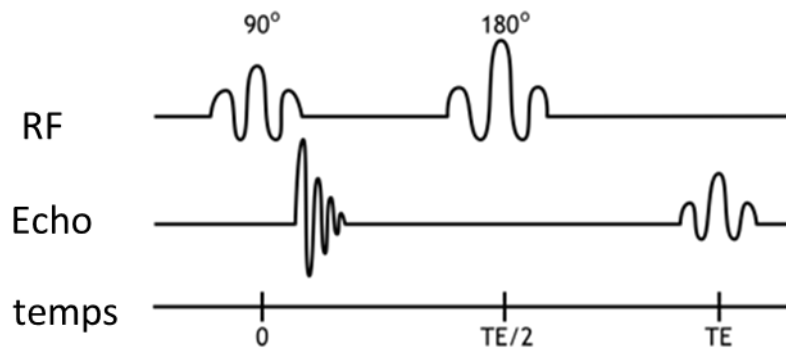


Figure 1-2: Schéma d'une séquence SE [15]

Le temps séparant les impulsions RF de 180° est appelé temps d'écho (TE) en IRM et correspond à la durée 2τ en RMN, où τ est le temps séparant l'impulsion initiale de 90° de l'impulsion de 180°. En pratique cette séquence peut être répétée plusieurs fois afin d'améliorer le rapport signal sur bruit.

Le signal obtenu avec une séquence écho de spin est de la forme:

$$I = I_0 \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \right) e^{-\frac{TE}{T_2}} \quad \text{Eq.1-11}$$

L'équation (Eq.1-11), montre que le signal contient des informations T_1 et T_2 . Pour la mesure de la relaxation T_2 , étudiée dans le cadre de ce travail, la pondération T_1 du signal de relaxation est évitée en fixant le temps de répétition (TR) à environ 5 fois la valeur du T_1 de l'échantillon étudié. Dans ce cas Eq.1-11 peut être approximée par :

$$I \approx I_0 e^{-\frac{TE}{T_2}} \quad \text{Eq.1-12}$$

1.1.1.1.2.5. Détection du signal en IRM

En IRM, le signal de résonance magnétique nucléaire est codé dans le domaine fréquentiel appelé plan de Fourier ou encore espace K. Le passage du domaine fréquentiel au domaine spatial par transformée de Fourier, permet la reconstruction d'une image.

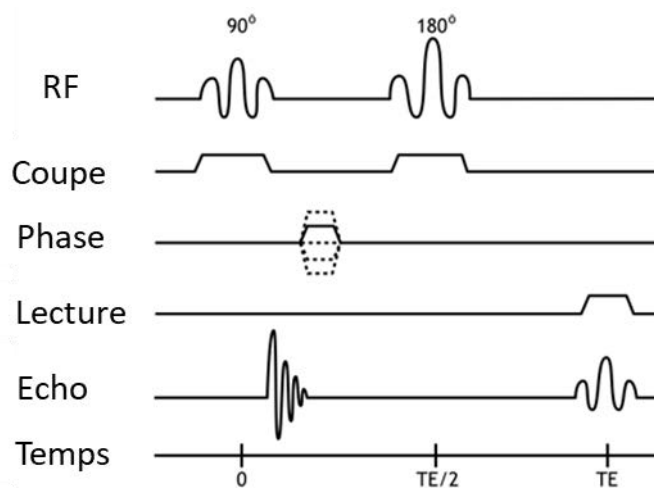


Figure 1-3: Schéma d'une séquence écho de spin en IRM faisant figurer les différents gradients nécessaires à l'obtention d'une image. [16]

Ce codage est obtenu grâce à l'application de différents gradients de champ magnétique (Figure 1-3) qui permettent, par addition, une variation linéaire du champ B_0 . La conséquence de l'application d'un gradient de champ G est la variation linéaire de la fréquence de précession des spins le long de l'axe d'application. Pour une application suivant l'axe z la fréquence de résonance devient:

$$\nu(z) = \gamma \frac{B_0 + G(z)}{2\pi} \quad \text{Eq.1-13}$$

Une première partie du codage du signal consiste à appliquer un gradient de sélection de coupe dans une direction perpendiculaire au plan d'intérêt. L'application de ce gradient se fait pendant l'application des impulsions radiofréquences. Un gradient de codage de phase est appliqué entre l'impulsion RF initiale et l'écho et son amplitude est modifiée à chaque TR.

Ce gradient permet le codage des fréquences spatiales selon l'axe des lignes dans l'espace K ; les protons situés sur une même ligne, perpendiculaire à la direction du gradient, auront tous la même phase. Enfin, lors de la réception du signal un dernier gradient est appliqué ; le gradient de lecture qui permet le codage des fréquences spatiales selon l'axe des colonnes de l'espace K. Il modifie les fréquences de précession pendant toute la durée de son application. Chaque colonne de l'espace K, correspond à des protons, ayant une vitesse de précession identique. Comme ce gradient est appliqué simultanément au recueil du signal, l'information en fréquence y est incluse.

En raison des contraintes de temps nécessaire à l'application des différents gradients et des impulsions RF sélectives lors d'une expérience en IRM, les temps d'écho ne peuvent être aussi courts qu'en RMN : environ dix ms en IRM avec une séquence multi-écho de spin contre quelques dixièmes de ms en RMN. L'échantillonnage de la courbe de décroissance T_2 est donc effectuée avec un nombre de points moindre en IRM qu'en RMN, ce qui peut impacter la précision de la mesure du T_2 .

1.1.1.1.3. Mécanismes de relaxation

1.1.1.1.3.1. Mobilité moléculaire

La théorie de Bloembergen, Purcell et Pound [17] a été proposée pour expliquer les résultats expérimentaux obtenus sur la relaxation d'une substance chimique pure (l'eau par exemple). Les temps de relaxation dépendent de l'intensité des interactions magnétiques entre les molécules du milieu modulé par les mouvements moléculaires (Figure 1-4).

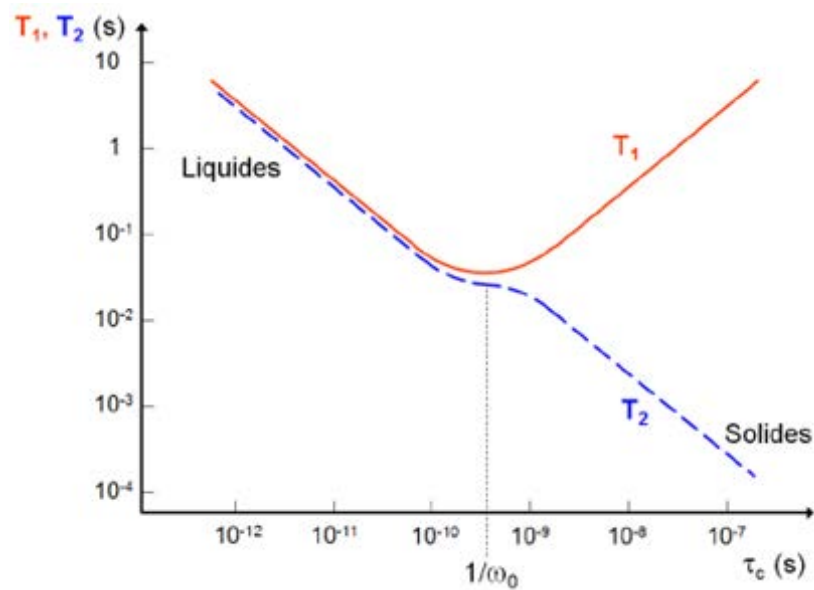


Figure 1-4: Relation entre les temps de relaxation T_1 et T_2 et la dynamique moléculaire.

Dans le cadre de cette théorie on peut décrire T_1 et T_2 en fonction des mouvements moléculaires grâce aux équations suivantes :

$$\frac{1}{T_1} = K \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \cdot \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \cdot \tau_c^2} \right) \quad \text{Eq.1-14}$$

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{K}{2} 3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right) \quad \text{Eq.1-15}$$

Avec :

- τ_c : temps de corrélation, nécessaire pour que une molécule effectue une rotation de 1 radian.

- $\omega_0 = 2\pi\nu_0$ =: pulsation de Larmor

- K : constante exprimée comme:

$$K = \frac{3\mu_0^2 \hbar^2 \gamma^4}{160\pi^2 r^6} \quad \text{Eq.1-16}$$

- μ_0 : perméabilité magnétique du vide
- \hbar : constante de Planck réduite
- r : distance entre deux molécules portant un moment magnétique

Dans l'eau pure sous forme liquide, les molécules sont animées d'un mouvement de rotation et de translation (mouvement brownien). D'après les équations ci-dessus (Eq.1-15 et Eq.1-16), on remarque que les temps de relaxation spin-réseau (T_1) et spin-spin (T_2) dépendent du temps de corrélation τ_c , donc de la mobilité moléculaire. Pour des valeurs élevées du temps de corrélation τ_c (faible mobilité), le T_2 est très court tandis que le T_1 est long. A l'inverse, pour des faibles valeurs de τ_c (forte mobilité), les temps de relaxation T_1 et T_2 sont longs et leurs valeurs sont proches ; cette situation est caractéristique de l'état liquide. On remarque que la valeur de T_1 passe par un minimum lorsque $\tau_c\omega_0$ est proche de 1, la valeur de τ_c correspondant à ce minimum dépend donc de l'intensité du champ B_0 [18].

Si la fréquence des rotations est proche de la fréquence de résonance ω_0 , alors certains noyaux peuvent changer d'orientation en cédant de l'énergie au milieu environnant et le retour à l'équilibre sera rapide [19].

De manière générale, la mobilité des molécules dépend de la température, de la concentration et de la viscosité d'une solution à travers le temps de corrélation τ_c .

La température est directement reliée à la vitesse d'agitation moléculaire. Les molécules peuvent effectuer trois types de mouvement : la translation, la rotation et la vibration. Les mouvements de vibrations sont trop rapides pour affecter le signal RMN et les mouvements de translation dans un champ magnétique homogène (en l'absence de gradients) auront peu d'effet sur le signal T_2 . Cependant, les mouvements de rotation se produisent à des fréquences de l'ordre du MHz et peuvent donc avoir un impact significatif sur la relaxation RMN.

Dans le cas de l'eau liquide, si l'on considère les molécules comme étant sphériques, d'après la loi de Stokes [22] :

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta a^3}{3K_bT} \quad \text{Eq.1-17}$$

Avec :

- a : rayon de la molécule
- η : viscosité du solvant

D'après l'équation précédente (Eq.1-17), on remarque que le temps de corrélation dépend également du rayon de la molécule considérée, plus le rayon est important, plus la mobilité de la molécule est réduite et donc plus court est le T_2 .

La dépendance du τ_c avec la température peut également s'écrire sous la forme d'une loi d'Arrhenius :

$$\tau_c = \tau_0 e^{\frac{E_a}{K_bT}} \quad \text{Eq.1-18}$$

Avec E_a : Energie d'activation

D'après l'Eq.1-18, il est également possible d'exprimer la dépendance des temps de relaxation T_1 et T_2 (d'un corps pur) avec la température sous la forme d'une loi d'Arrhenius [23] :

$$\frac{1}{T_{1,2}} = T_{1,2}^{298K} \exp \left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298} \right) \right] \quad \text{Eq.1-19}$$

Avec :

- $T_{1,2}^{298K}$: temps de relaxation longitudinale (1) ou transversale (2) à 298K
- R : constante universelle des gaz parfaits

La théorie de Bloembergen, Purcell et Pound est valable dans le cadre d'étude de substances pures. Elle ne l'est cependant plus pour expliquer les valeurs des paramètres de relaxation de milieux plus complexes, comportant plusieurs composés chimiques différents.

1.1.1.1.4. Mécanismes des échanges

Dans le cas d'une solution aqueuse, le temps de relaxation diminue par rapport à celui de l'eau, d'une part car la mobilité moléculaire diminue [24, 25], et d'autre part, les interactions dipolaires et chimiques entre les protons de l'eau et ceux du soluté ainsi que les échanges diffusionnels, vont également modifier la relaxation.

D'après la théorie d'échanges à deux sites de Zimmerman et Brittin [26], on peut distinguer plusieurs populations de protons selon la dynamique des échanges: lorsque les échanges chimiques et diffusionnels sont lents on distingue 3 populations: celle des protons de l'eau qui ne sont pas affectés par les échanges, celle des protons échangeables du soluté et celle des protons non-échangeables du soluté.

Dans ce cas le signal de relaxation est multi-exponentiel:

$$I(t) = \sum_{i=1}^3 I_{0i} e^{-\frac{t}{T_{2i}}} \quad \text{Eq.1-20}$$

Avec I_{0i} , intensité du signal relative à chaque population de protons et T_{2i} , temps de relaxation transversale propre à chaque population de protons. Dans le cas des échanges chimiques rapides, la relation entre le temps de relaxation mesuré et ceux propres à chaque population de protons est beaucoup plus complexe.

Dans ce cas le signal est bi-exponentiel:

$$I(t) = I_{0ech} e^{-\frac{t}{T_{2ech}}} + I_{0n_ech} e^{-\frac{t}{T_{2n_ech}}} \quad \text{Eq.1-21}$$

Avec:

- I_{0ech} : intensité relative à la population des protons échangeables du soluté.
- I_{0n_ech} : intensité relative la population de protons non échangeables du soluté.
- T_{2ech} : T_2 moyen impacté par les échanges entre eau et soluté.
- T_{2n_ech} : des protons non-échangeables du soluté.

En pratique, c'est seulement pour des concentrations de soluté assez élevées et des temps d'écho faibles que le T_2 des protons non-échangeables du sucre peut être identifié. En IRM, cela est rarement le cas, le T_2 que l'on mesure correspond alors au T_2 des protons échangeables. $1/T_2$ va dépendre de l'inverse du temps d'écho ($1/TE$) comme montré dans la *Figure 1-5*.

Lorsque $1/TE$ est petit devant la vitesse d'échange, la différence de fréquences de résonance "perçue" par un proton au cours d'un échange entre deux sites va causer un rapide déphasage de l'aimantation transversale faisant ainsi diminuer le T_2 observé.

On observe alors un plateau pour les temps d'écho long avec une valeur de T_2 minimale. Au contraire, lorsque la fréquence des impulsions est grande devant la vitesse d'échange, le déphasage dû aux échanges entre deux sites est complètement refocalisé par le train d'impulsions de 180° . Donc les échanges de protons n'ont pas d'effet de déphasage supplémentaire, on observe dans ce cas un plateau aux TE courts pour lesquels la valeur du T_2 mesurée est maximale. De même lorsque la vitesse d'échange est très élevée par rapport à $1/TE$, le T_2 devient indépendant du TE comme dans le cas des liquides purs car les échanges sont trop rapides à l'échelle du temps d'écho pour que leur influence sur la fréquence de résonance soit perçue. Dans la gamme de TE se situant entre les deux plateaux, le T_2 mesuré diminue avec le temps d'écho en raison de l'influence plus ou moins importante des déphasages dus aux échanges. On peut ainsi observer une courbe de dispersion caractéristique en traçant $1/TE$ en fonction de $1/T_2$ (Figure 1-5).

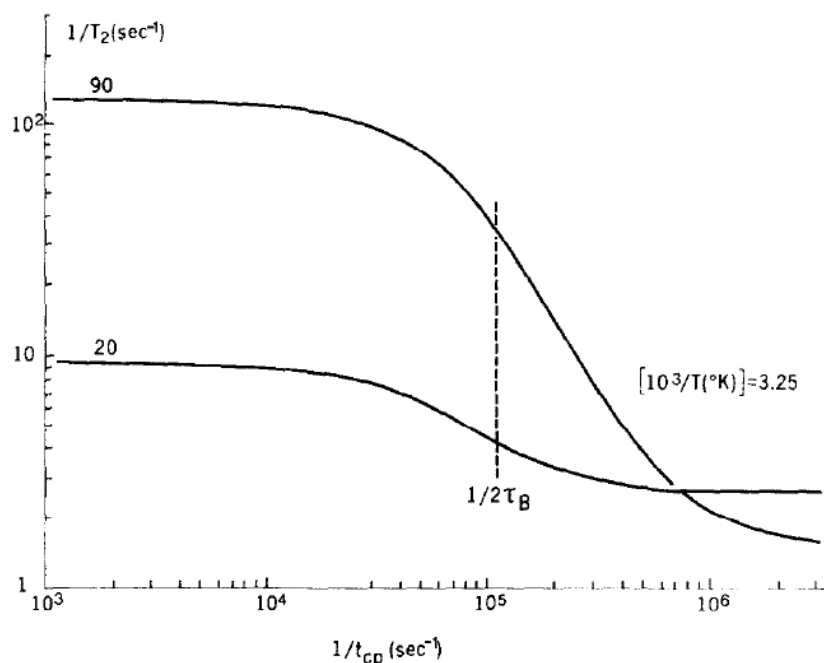


Figure 1-5: Courbes de dispersion théoriques issues de [27] à 20 et 90MHz à 34°C. A noter qu'ici $1/t_{cp}$ correspond à $1/TE$.

1.1.1.1.4.1. Modèles des échanges chimiques

Les équations de Bloch [28, 29] permettent de calculer l'évolution de l'aimantation macroscopique en fonction du temps à partir des temps de relaxation. Hahn, Maxwell [30] et McConnell [31] ont montré que ces équations pouvaient être modifiées pour inclure les effets des échanges entre deux sites ou plus. Ces équations modifiées sont connues sous le nom d'équations de Bloch-McConnell. Luz et Meiboom [32] ont été les premiers à résoudre ces équations de manière analytique, en se limitant au cas particulier où les échanges sont rapides et où les T_2 propre des sites sont identiques ($T_{2a} = T_{2b}$). Par la suite, Allerhand et Gutowsky [33] ont proposé un modèle qui ne se limite pas seulement au cas des échanges rapides. Enfin, en 1972, Carver et Richards [27] ont proposé un modèle plus général où la condition $T_{2a} = T_{2b}$ n'est plus requise, comme par exemple dans un mélange eau-sucre, lors d'échanges entre les protons de l'eau (site a) et les protons des groupes hydroxyle (site b).

A) MODELE DE CARVER-RICHARDS

Le modèle de Carver-Richards fait intervenir les paramètres suivants :

- T_{2a} et T_{2b} : temps de relaxation transverse des protons de l'eau (site a) et des protons échangeables du soluté (site b), respectivement.
- P_a et P_b : fractions de la population totale de protons sur les sites a et b , respectivement. ($P_b = 1 - P_a$).
- ω_a et ω_b : fréquences de résonance des protons sur les sites a et b , respectivement.
- $\Delta\omega = \omega_b - \omega_a$: différence de déplacement chimique en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. ($\Delta\omega = 2\pi\delta\omega B_0$) avec $\delta\omega$: différence de déplacement chimique en ppm et B_0 : intensité du champ magnétique en MHz).
- k_a et k_b : vitesses d'échange (en s^{-1}) du site a vers le site b et du site b vers le site a , respectivement. ($k_a = \frac{P_b}{P_a} k_b$).

Il est défini par les équations suivantes :

$\alpha_+ = \frac{1}{T_{2a}} + \frac{1}{T_{2b}} + k_a + k_b$	Eq.1-22
$\alpha_- = \frac{1}{T_{2a}} - \frac{1}{T_{2b}} + k_a - k_b$	Eq.1-23
$\psi = \alpha_-^2 - \Delta\omega^2 + 4k_a k_b$	Eq.1-24
$\zeta = 2\Delta\omega \cdot \alpha_-$	Eq.1-25
$\xi = \left(\frac{t_{cp}}{4\sqrt{2}}\right) \left[\psi + (\psi^2 + \zeta^2)^{\frac{1}{2}}\right]^{\frac{1}{2}}$	Eq.1-26
$\eta = \left(\frac{t_{cp}}{4\sqrt{2}}\right) \left[-\psi + (\psi^2 + \zeta^2)^{\frac{1}{2}}\right]^{\frac{1}{2}}$	Eq.1-27
$2D_+ = 1 + \frac{2(\psi + 2\Delta\omega^2)}{\sqrt{(\psi^2 + \zeta^2)}}$	Eq.1-28
$2D_- = -1 + \frac{2(\psi + 2\Delta\omega^2)}{\sqrt{(\psi^2 + \zeta^2)}}$	Eq.1-29
$\ln\lambda_1 = -t_{cp} \frac{\alpha_+}{2} + \ln \left[\sqrt{D_+ \cdot \cosh^2 \xi - D_- \cdot \cos^2 \eta} + \sqrt{D_+ \cdot \sinh^2 \xi + D_- \cdot \sin^2 \eta} \right]$	Eq.1-30
$\frac{1}{T_2} = -\frac{1}{t_{cp}} \ln\lambda_1$	Eq.1-31

Le modèle de Carver-Richard a été utilisé dans de nombreuses études notamment par Hills [34-40], pour étudier l'impact des échanges chimiques sur les variations des T_2 avec le temps d'écho de la séquence CPMG (courbes de dispersion), en fonction des conditions expérimentales.

D'après Stock[41], le modèle original de Carver-Richards comprend une erreur. Il propose d'utiliser un modèle corrigé, qui consiste à modifier d'un facteur 2 les équations suivantes :

$\xi = \left(\frac{t_{cp}}{2\sqrt{2}} \right) \left[\psi + (\psi^2 + \zeta^2)^{\frac{1}{2}} \right]^{\frac{1}{2}}$	Eq.1-32
$\eta = \left(\frac{t_{cp}}{2\sqrt{2}} \right) \left[-\psi + (\psi^2 + \zeta^2)^{\frac{1}{2}} \right]^{\frac{1}{2}}$	Eq.1-33
$2D_+ = 1 + \frac{\mathbf{1}(\psi + 2\Delta\omega^2)}{\sqrt{(\psi^2 + \zeta^2)}}$	Eq.1-34
$2D_- = -1 + \frac{\mathbf{1}(\psi + 2\Delta\omega^2)}{\sqrt{(\psi^2 + \zeta^2)}}$	Eq.1-35

C'est ce modèle corrigé qui est utilisé dans le cadre de ce travail. Dans la publication originale de Carver et Richards la durée t_{cp} correspond bien au temps d'écho TE communément employé en imagerie.

B) APPLICATIONS DU MODELE DE CARVER-RICHARDS POUR L'ANALYSE DE DONNEES EXPERIMENTALES

Le modèle Carver Richard défini par les équations précédentes (Eq.1-22 à Eq.1-35) est utilisé pour calculer les courbes de dispersion théoriques afin d'analyser le phénomène des échanges chimiques et l'impact des différents paramètres sur les temps de relaxation. Il peut également être employé pour expliquer les mesures expérimentales en estimant des paramètres du modèle à partir des données RMN acquises. Dans ce cas, les paramètres connus ou mesurés initialement sont l'intensité du champ magnétique et le T_2 de l'échantillon. Le T_{2a} de l'eau peut également être mesuré dans les mêmes conditions que celui de l'échantillon.

La fraction de population de protons échangeables du soluté P_b peut également être estimée à partir de la concentration en soluté comme:

$$P_b = \frac{\text{nombre total de groupes hydroxyle (soluté)}}{\text{nombre total de protons échangeables (soluté + solvant)}} \quad \text{Eq.1-36}$$

Cependant, cela implique que tous les protons d'une même molécule s'échangent à la même vitesse, ce qui peut induire des différences entre la valeur théorique et la valeur estimée. Dans la littérature [23, 42] la valeur de T_{2b} est souvent imposée car les erreurs d'ajustement sur ce paramètre peuvent être importantes.

La vitesse d'échange k_b varie avec la température et le pH selon les équations suivantes respectivement [37, 43]:

$$k_b = \frac{K_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) \quad \text{Eq.1-37}$$

$$k_b = k_1[H_3O^+] + k_2 K_w/[H_3O^+] \quad \text{Eq.1-38}$$

Où ΔG est l'énergie d'activation de Gibbs, k_1 et k_2 les vitesses d'échange de la réaction acide-base et K_w est la constante d'autoprotolyse de l'eau.

A partir de ce modèle, les études sur les échanges chimiques ont principalement été effectuées pour des champs magnétiques supérieurs à 100MHz [34-38, 40, 44, 45] et jamais en imagerie [46].

Par exemple Hills [36] a montré que l'on pouvait modéliser le T_2 d'une solution de glucose à 20% mesuré à 100MHz à l'aide de ce modèle (Figure 1-6).

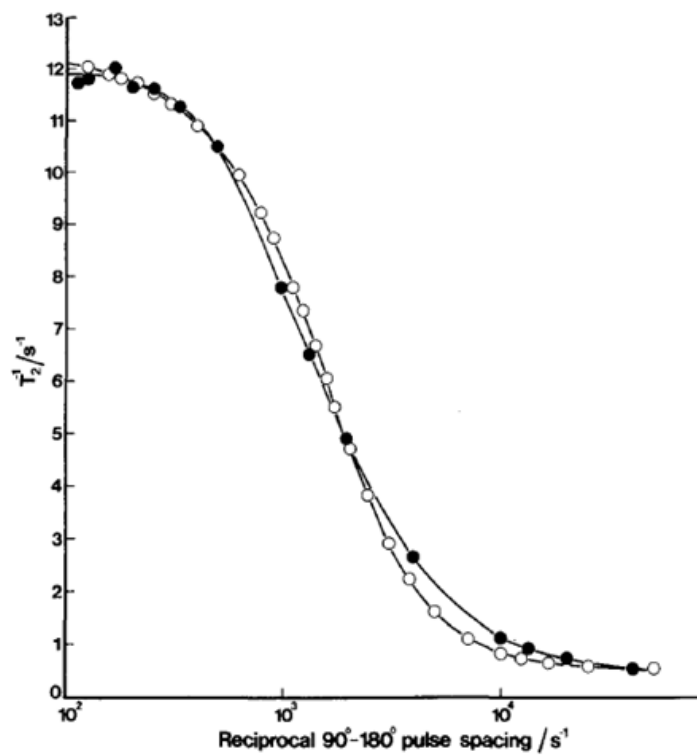


Figure 1-6: Courbes de dispersion expérimentales et théoriques issues de [36] obtenues pour une solution de glucose à 20%(m/V) à 23°C à pH 6.6 à 100MHz.

Fabri et al. [23] ont montré l'impact particulier de la température sur le phénomène de dispersion à 80MHz sur différentes solutions de sucre (*Figure 1-7*)

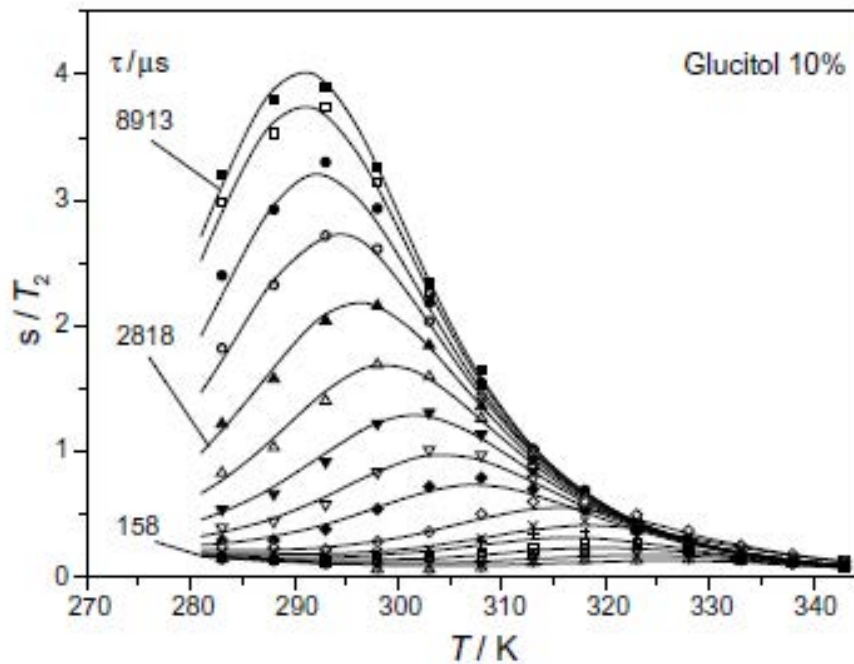


Figure 1-7: Vitesse de relaxation d'une solution de glucitol à 10% (g/g) en fonction de la température à différents temps d'écho issu de [23]. Les symboles correspondent aux valeurs expérimentales et les lignes sont les résultats des ajustements du modèle C-R. A noter qu'ici τ correspond à $TE/2$.

Ce graphique montre des variations de R_2 ($=1/T_2$) inattendues entre 280 et 300K pour des TE longs, ainsi on remarque que dans cette gamme de température, le T_2 diminue pour atteindre un minimum vers 295K puis augmente par la suite.

Enfin, dans une des rares études du phénomène de dispersion à bas champ, Aroulmoji et al. [47] ont montré des différences des courbes de dispersion pour le glucose et le fructose à la même concentration à 20MHz ($TE=1.7ms$).

1.1.1.1.5. Relaxation dans les milieux compartimentés

Dans les milieux compartimentés, les protons des molécules proches de la surface ont des temps de relaxation significativement plus courts que ceux des molécules dites "libres", à cause du phénomène appelé relaxation de surface. Dans ce cas le temps de relaxation va dépendre de plusieurs paramètres selon l'équation suivante [48]:

$$\frac{1}{T_2} = \rho \frac{S}{V} + \frac{1}{T_{2bulk}} + \frac{1}{12} (TE\gamma G)^2 D \quad \text{Eq.1-39}$$

Avec:

- ρ : relaxativité de surface en m.s^{-1} .
- S : surface du compartiment.
- V : volume du compartiment
- T_{2bulk} : T_2 du liquide en l'absence de compartimentation.
- G : gradient de champ magnétique.
- D : coefficient d'autodiffusion du liquide.

Lorsque les compartiments ont des tailles et/ou des géométries distinctes, en absence d'échange diffusionnels ou lorsque les échanges diffusionnels entre compartiments sont lents, on observe une décroissance T_2 multi-exponentielle. Par exemple en considérant trois compartiments A , B et C , le signal de relaxation est de la forme:

$$I(t) = I_0 \left(P_A e^{-\frac{t}{T_{2A}}} + P_B e^{-\frac{t}{T_{2B}}} + P_C e^{-\frac{t}{T_{2C}}} \right) \quad \text{Eq.1-40}$$

Dans le cas où les échanges diffusionnels sont rapides le signal est mono-exponentiel:

$$I(t) = I_0(P_A + P_B + P_C)e^{-\left(\frac{t}{T_{2A}} + \frac{t}{T_{2B}} + \frac{t}{T_{2C}}\right)} \quad \text{Eq.1-41}$$

A noter également qu'en l'absence perturbateurs de champ à la surface du pore, qui pourraient perturber le champ magnétique local, et lorsque le T_2 est indépendant du temps d'écho, le terme de diffusion peut être négligé dans l'équation (Eq.1-39). De plus, le terme $\rho \frac{S}{V}$ devient prépondérant devant $1/T_{2bulk}$ lorsque la taille du compartiment diminue.

1.1.1.2. Relaxation RMN dans les tissus végétaux

1.1.1.2.1. La cellule végétale

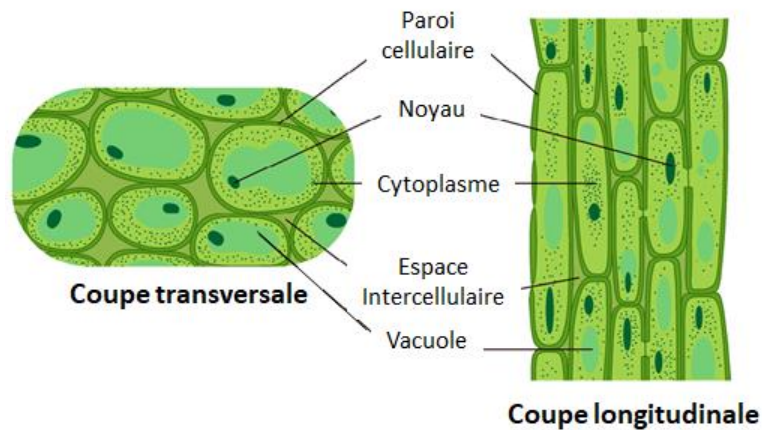


Figure 1-8: Schéma d'une cellule végétale (parenchyme), vue en coupes transversale et longitudinale [49]

Les cellules végétales présentent une structure complexe (Figure 1-8). Dans le cas du parenchyme des fruits charnus, elles peuvent être modélisées par trois principaux compartiments aqueux :

- la vacuole, délimitée par le tonoplaste, comportant environ 70-80% de l'eau cellulaire.
- le cytoplasme, milieu compris entre la vacuole et la paroi cellulaire qui contient le cytosol (représenté par un milieu uniforme, malgré la présence des organites), il est séparé de la vacuole par le tonoplaste et de la paroi par le plasmalemme.
- la paroi (incluant l'eau extracellulaire), délimite la cellule du milieu extérieur, elle aussi, composée essentiellement d'eau (environ 60%).

Les membranes (tonoplaste et plasmalemme) qui séparent les compartiments hydriques sont à perméabilité sélective, permettant des échanges de molécules d'eau et d'autres substances (dioxyde de carbone, dioxygène, métabolites, certains ions, ...) entre les compartiments. La perméabilité varie sous l'influence des facteurs physiques (température [50, 51], stress hydrique [52]), physiologiques ou génétiques.

Des tissus végétaux présentent généralement une microporosité non-négligeable due aux gaz contenus dans les espaces extracellulaires.

1.1.1.2.2. Attribution des composantes du signal de relaxation transversale aux compartiments hydriques des tissus

Les tissus végétaux présentent un signal de relaxation complexe [53, 54] en raison de leur structure compartimentée. Le T_2 permet généralement une meilleure différenciation entre les différents compartiments cellulaires que le T_1 et est donc généralement préféré pour la caractérisation des tissus végétaux. Les mécanismes de relaxation peuvent être considérés en représentant les cellules végétales en première approximation comme plusieurs réservoirs d'eau, comme décrit plus haut, en échange relativement lent les uns avec les autres grâce à des membranes semi-perméables. La relaxation T_2 de chaque compartiment est fortement impactée par l'échange chimique des protons de l'eau avec ceux des molécules de soluté et des surfaces solides. En conséquence, les solutions aqueuses dans les différents compartiments cellulaires ont des temps de relaxation différents en fonction de leur composition particulière (type de soluté, concentration). La limite à la diffusion des molécules d'eau entre les compartiments, déterminée par les coefficients de diffusion de l'eau, la perméabilité de la membrane cellulaire et la taille des compartiments, donne lieu à

un signal multi exponentiel qui reflète la compartimentation de l'eau. De plus, la présence d'espaces intercellulaires remplis d'air peut également affecter la mesure des temps de relaxation transversale en raison des différences entre la susceptibilité magnétique de l'air et de l'eau [55-57].

La problématique de l'attribution des composantes du signal de relaxation aux compartiments cellulaires a fait l'objet de plusieurs études [58, 59]. Généralement, la composante caractérisé par l'intensité la plus élevée et le T_2 est le plus long, est attribuée à l'eau vacuolaire compte tenu du volume de ce compartiment (Eq.1-39) et de la mobilité moléculaire qui sont censés être plus importants que dans les autres compartiments. Selon le même raisonnement, la composante la moins intense dont le T_2 est le plus court et la composante T_2 intermédiaire, sont associées respectivement, à l'eau dans la paroi ou au milieu extracellulaire et à l'eau du cytoplasme.

En 1992, Snaar et Van As [58] (Figure 1-9) ont réalisé une démonstration de cette attribution en étudiant l'évolution du signal de relaxation T_2 en fonction du temps d'imprégnation d'un agent de contraste (Mn^{2+}) au sein du tissu frais de pomme (20MHz, TE=1.6ms).

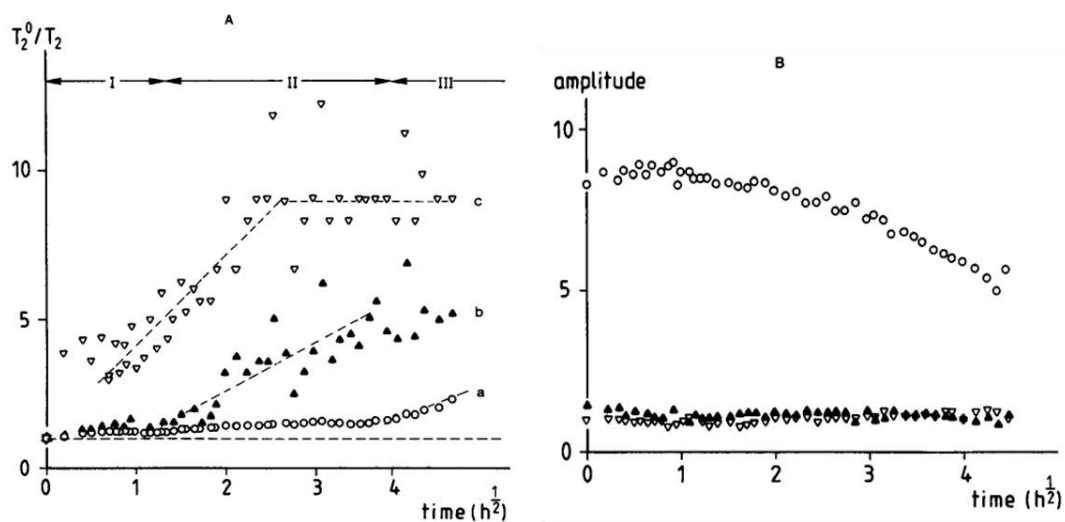


Figure 1-9: Figure extraite de [58], représentant l'évolution des temps de relaxation normalisés (à gauche) ainsi que l'évolution des amplitudes correspondantes, en fonction du temps d'imprégnation du Mn^{2+} dans le tissu frais de pomme, les cercles correspondent à la composante longue, les triangles noirs à la composante intermédiaire et les triangles inversés à la composante courte.

Le signal mesuré est tri-exponentiel avec des composantes relaxant à T_2 d'environ 1000, 200 et 30ms, représentant respectivement environ 75, 17 et 8% du signal. Le T_2 de chaque composante diminue après un certain temps d'imprégnation de l'agent de contraste. La composante ayant le T_2 le plus court est la première impactée, puis le T_2 de la composante intermédiaire diminue et enfin le T_2 long est le dernier à subir une diminution. D'après les auteurs, ces résultats sont expliqués par la diffusion de l'agent de contraste dans le milieu extracellulaire en premier, puis dans le cytoplasme et enfin dans la vacuole. On remarque également que l'amplitude de la composante longue diminue avec le temps d'imprégnation de l'agent tandis que celle des deux autres composantes reste stable. Cette diminution pourrait indiquer un changement de la répartition de l'eau cellulaire au sein du tissu mais n'est pas commentée dans l'article.

Une attribution des composantes de relaxation transversale dans la pomme de terre a été proposée dans une étude de Hills et Le Floch [60] (100MHz, $TE=0.4ms$), consistant à diminuer progressivement la température et à observer les variations du spectre des temps de relaxation transversale (*Figure 1-10*). A $10^\circ C$ le signal de relaxation est quadri-exponentiels. Le pic correspondant au T_2 le plus long est le premier à disparaître consécutivement à la diminution de la température et donc au gel de la fraction d'eau correspondante. Cette fraction d'eau est alors associée à la vacuole. En suivant la même logique, les auteurs ont associé le troisième pic (en partant de la gauche) au cytoplasme, le second à la paroi et celui correspondant au T_2 le plus court, à l'eau contenue dans des grains d'amidon.

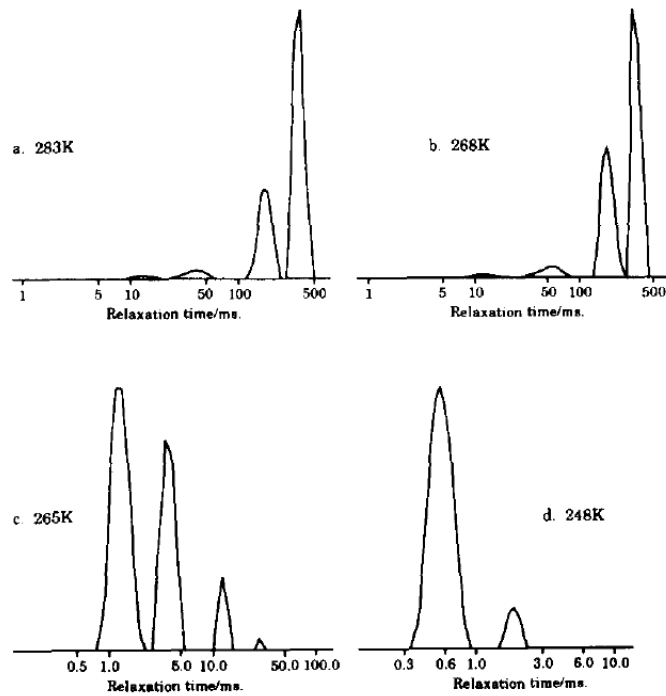


Figure 1-10: Figure extraite de [60], représentant l'évolution des amplitudes des différentes composantes du signal de relaxation mesuré à 100MHz dans la pomme, avec la température.

L'interprétation du signal de relaxation transversale, selon laquelle une composante du signal correspond à un compartiment cellulaire a été remise en cause dans le cas où le tissu étudié présente une hétérogénéité de taille de cellules. En effet, dans l'oignon, le nombre relativement élevé de composantes du signal de relaxation (*Figure 1-11*) est expliqué par l'hétérogénéité du tissu en termes de tailles de cellules [61].

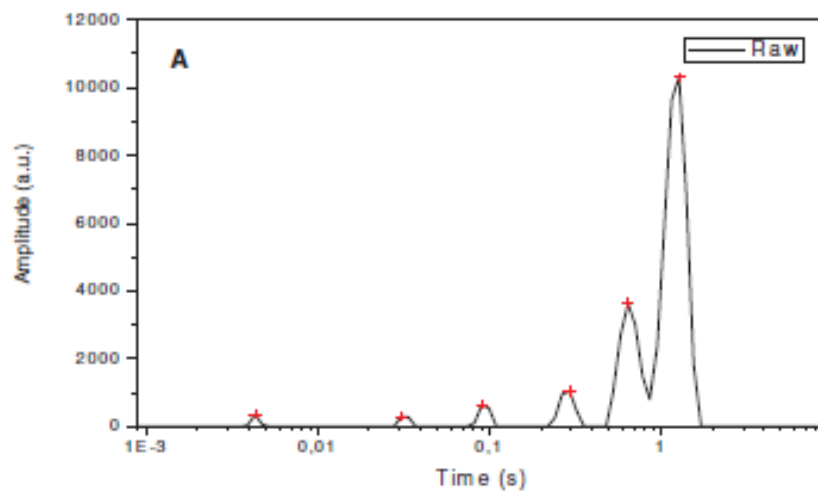


Figure 1-11: distribution des temps de relaxation observée dans le tissu d'oignon frais [61]

Dans le cas des feuilles de colza [62] (20MHz, TE=0.2ms), il a été possible de démontrer que la distribution des temps de relaxation transversale reflète en même temps la compartimentation subcellulaire et l'hétérogénéité du limbe foliaire. En effet, à la différence des fruits, le limbe foliaire est composé de deux principaux tissus, dont la taille peut varier en fonction du stade de développement de la feuille. Il a été ainsi démontré que chez les feuilles matures, le signal RMN permet de distinguer les vacuoles des tissus palissadique et lacuneux. Le principal mécanisme de relaxation permettant cette différenciation est lié à la taille des compartiments hydriques en accord avec l'Eq.1-39. Deux autres composantes ont été attribuées à l'eau en forte interaction avec les polysaccharides (amidon et parois) et à l'eau contenue dans les chloroplastes.

Récemment, une étude IRM (1.5 T, TE=6.5ms) sur le fruit de pêche en croissance [63] a montré que le nombre de composantes du signal de relaxation augmentait de 2 à 3 au cours du développement du fruit (*Tableau 1-1*). Dans les premiers stades du développement l'intensité de la composante longue représente 60 à 70% du signal total. Au dernier stade de maturité étudié, l'intensité de la composante longue ne représente plus que 35% du signal, tandis que celle de la composante intermédiaire représente 45%. Dans ce cas l'attribution des composantes relaxant à T_2 court, intermédiaire et longue, respectivement à la paroi, au cytoplasme et à la vacuole, n'est pas valide, si l'on considère qu'environ 70% de l'eau cellulaire est contenue dans la vacuole. Il a été démontré que la taille des cellules des fruits étudiés présente une forte hétérogénéité, les composantes intermédiaire et longue correspondraient plutôt à deux populations de vacuole de taille distincte et la composante courte au cytoplasme et à la paroi.

Tableau 1-1: données issues de [63], temps de relaxation et amplitudes relatives mesurés dans le mésocarpe intérieur et extérieur de la pêche au cours de son développement du 54^{ème} au 119^{ème} jour après floraison

DAF	I_{01} (%)	T_{21} (msec)	b_2 (%)	T_{22} (msec)	I_{03} (%)	T_{23} (ms)
Outer mesocarp						
54	35 ± 3 ^{a*}	52 ± 6 ^{a*}	65 ± 3 ^{a*}	135 ± 10 ^{a*}	–	–
61	40 ± 2 ^{b*}	51 ± 6 ^{a*}	60 ± 2 ^{b*}	163 ± 11 ^{b*}	–	–
95	37 ± 4 ^{ab}	61 ± 9 ^b	63 ± 4 ^{ab}	233 ± 23 ^{c**}	–	–
119	17 ± 4	41 ± 6 [#]	44 ± 1 [#]	165 ± 21 [#]	39 ± 4 [#]	441 ± 40 [#]
Inner mesocarp						
54	31 ± 6 ^{a*}	44 ± 7 ^{a*}	69 ± 6 ^{a*}	118 ± 13 ^{a*}	–	–
61	36 ± 4 ^{b*}	44 ± 5 ^{a*}	64 ± 4 ^{b*}	139 ± 9 ^{b*}	–	–
95	39 ± 4 ^b	55 ± 6 ^b	61 ± 4 ^b	205 ± 16 ^{c*}	–	–
119	20 ± 7	39 ± 8 [#]	48 ± 4	143 ± 25 [#]	32 ± 100	377 ± 51 ^{*#}

Il est à noter que les conditions d'acquisition du signal RMN ou de l'image IRM sont également un facteur important qui détermine le nombre de pools d'eau détectés. En effet, en imagerie, il n'est pas possible de distinguer des composantes dont le T_2 est inférieur à une dizaine de millisecondes compte tenu de la gamme de temps d'écho disponible.

1.1.1.3. Application de la relaxométrie par RMN et IRM à l'étude des végétaux

La relaxométrie par RMN ou par IRM convient à la caractérisation des tissus végétaux [58, 64] car elle permet d'accéder à des informations sur l'état et la distribution de l'eau au niveau cellulaire et tissulaire. Un certain nombre d'applications de ces techniques dans les sciences végétales et alimentaires ont été employées sur diverses questions, telles que le développement des fruits ou des feuilles [65-67], le stockage des fruits et des tubercules [56], la cuisson [68] et les processus de séchage et de congélation [39, 40, 60]. Bien que des informations importantes sur les changements dans les caractéristiques des tissus aient été obtenues, l'interprétation des variations des paramètres de relaxation qui se produisent au cours de ces processus reste complexe. Cela est dû aux multiples changements de composition et de structure qu'un tissu végétal subit au cours de sa transformation (teneur en eau, pH, taille des cellules, etc.) et à l'impact de ces changements sur les paramètres de relaxation via différents mécanismes physiques et chimiques, qui, à leur tour, dépendent des conditions expérimentales [69].

Sans un modèle général tenant compte de cette diversité d'applications, il est difficile d'interpréter un certain nombre de résultats divergents rapportés dans la littérature. Un exemple typique concerne les processus impliquant une perte d'eau par séchage ou à la suite d'un stress hydrique, pour lesquels différents résultats ont été rapportés.

Par exemple, le séchage lent des échantillons de pommes [70], entraînant une perte de masse de 45% (soit une réduction de la teneur en eau de 89% à 80%), a conduit à une diminution des valeurs de T_2 de tous les composants du signal de relaxation tri-exponentiel, avec une diminution d'environ 50% de la composante T_2 associée à l'eau vacuaire (TD-RMN, 20 MHz (0,5 T), TE = 5,6 ms). En revanche, le séchage par flux d'air d'échantillons de pommes [71] n'a pas eu d'impact sur la composante T_2 vacuaire jusqu'à 45% de perte d'eau, tandis que pour une perte d'eau de 50%, le T_2 a diminué de 900 à 700 ms (TD-RMN, 100 MHz (2,35 T); TE = 0,4 ms, signal tri-exponentiel).

Dans le cas de la tomate (*Figure 1-12*), il a été observé que pour une perte de masse d'environ 50% (réduction de la teneur en eau de 95,2% à 90,6%), induite par séchage sous vide [72] (TD-RMN, 20 MHz, TE = 0,2 ms), la valeur de la composante T_2 associée à la vacuole était inchangée et celles des autres composantes du signal de relaxation quadri-exponentielle mesuré n'étaient que légèrement impactées, tandis que les intensités des composantes attribuées à la vacuole et au cytoplasme diminuaient en accord avec la perte d'eau.

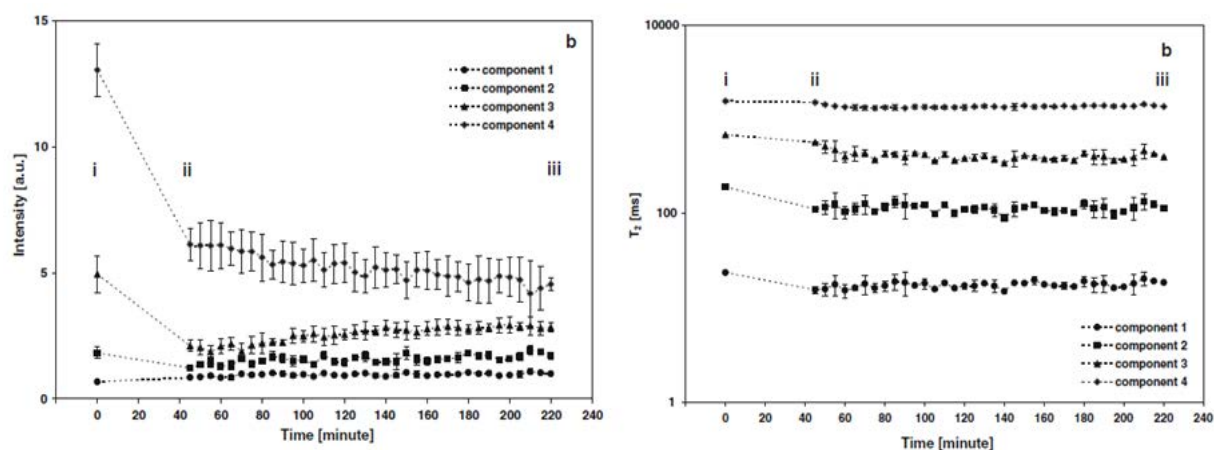


Figure 1-12: Figure issue de [72], représentant l'amplitude (à gauche) et les temps de relaxation (à droite) des composantes du signal T_2 , mesuré dans le péricarpe de tomate: avant séchage (i), après séchage (ii) et au cours du rééquilibrage hydrique (ii) à (iii).

Enfin, le séchage à l'air chaud du brocoli [73] entraînant une perte de masse de 50%, a conduit à une diminution de la composante T_2 associée à l'eau vacuolaire d'environ 50% pour le fleuret et la tige, tandis que les composantes associées au cytoplasme et à la paroi cellulaire n'ont pas varié de manière significative (TD-RMN, 23,3 MHz (0,5 T), TE = 33 ms, signal tri-exponentiel)(Figure 1-13).

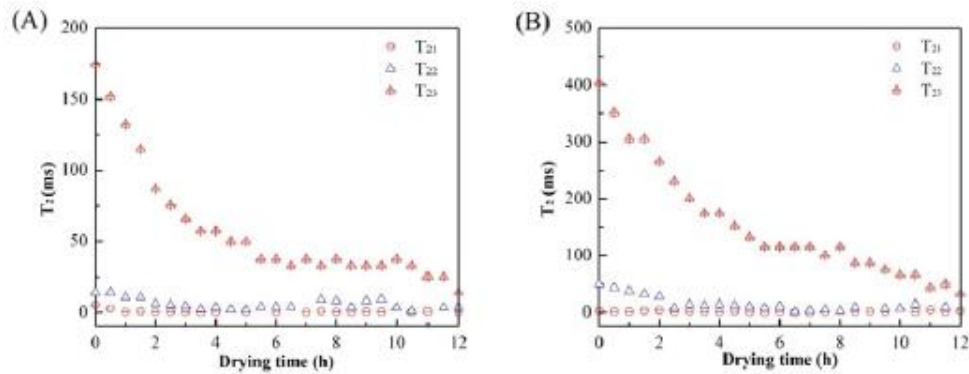


Figure 1-13: Evolution des temps de relaxation mesurés au cours du séchage dans le fleuret (A) et la tige (B) du brocoli [73]

Les effets d'un stress hydrique modéré sur les cellules de tiges de maïs et de millet ont été étudiés par IRM (20 MHz, TE = 4,3 ms) en mesurant les temps de relaxation transverse mono-exponentiels [74]. Dans le maïs, le stress n'a provoqué aucune variation de l'intensité du signal IRM, tandis que dans le millet, le temps de relaxation transverse a diminué pendant la période de stress. Cette variation a été expliquée par les changements de perméabilité membranaire, car il a été démontré que les cellules n'ont pas subi de modification de taille, que le coefficient de diffusion était inchangé et enfin que l'impact de la variation de la concentration en sucres était négligeable dans la gamme des variations attendue. La différence entre les réponses au stress du millet et du maïs s'explique par une tolérance différente au stress hydrique. Plus récemment, une étude sur les feuilles de tabac [75] a démontré que les variations des temps de relaxation transverse en fonction du stress hydrique subi par la plante dépendaient du stade de développement des feuilles et impactaient principalement pour les vacuoles des cellules palissadiques (TD-RMN, 20 MHz; TE = 0,2 ms).

Des résultats divergents ont également été observés pendant la maturation des fruits. Par exemple, lors de la maturation du kiwi [76], aucun impact sur les temps de relaxation mono-exponentiels (T_2) mesurés par IRM n'a été observé (*Tableau 1-2*), malgré une augmentation de la matière sèche de 6.3 à 10.6 mg/g et de la concentration en sucre de 32.4 à 106.9 mg/g. (85MHz (2T), TE = 20 ms).

Tableau 1-2: données issues de [76], comparaison des temps de relaxation (ms) et des concentrations en sucres (mg/g de masse sèche) dans les tissus de kiwi après récolte et après maturation.

Parameter	Flesh			Locule			Core		
	Unripe	Ripe	P	Unripe	Ripe	P	Unripe	Ripe	P
T_1	1610	1809	NS	1774	1792	NS	874	1370	NS
T_2 -CPMG	201.4	215.9	NS	344.3	354.6	NS	88.9	105.8	NS
Fructose	13.8	45.7	**	10.9	34.3	**	14.2	49.2	***
Glucose	12.0	41.8	NS	10.1	32.0	***	12.3	40.4	***
Sucrose	5.4	16.7	**	5.7	11.0	*	7.6	29.2	*
Total soluble sugars	32.4	106.9	*	28.0	79.6	**	37.9	126.1	***
Total soluble solids ^b (%)	6.3	10.6	***						

En revanche, lors de la maturation post-récolte de la banane [67] (*Tableau 1-3*), toutes les composantes T_2 du signal tri-exponentiel mesuré a augmenté (TD-RMN, 20 MHz, TE = 2 ms). Cette augmentation des T_2 a été attribuée à l'hydrolyse de l'amidon, qui agit comme un puit de relaxation, alors que l'augmentation de la concentration en sucre était supposée n'avoir qu'un effet mineur sur les valeurs de T_2 . On a supposé que l'échange chimique de protons entre l'eau et les groupes hydroxyles de l'amidon diminuait significativement le T_2 de l'eau à l'intérieur des grains d'amidon et, dans une moindre mesure, ceux du cytoplasme et de la vacuole, en raison de l'échange diffusif de molécules d'eau à travers les membranes séparant ces compartiments. La diminution de la teneur en amidon pendant la maturation de la banane réduit les fractions d'eau du cytoplasme et de la vacuole qui sont potentiellement affectées par les échanges chimiques et diffusifs, ce qui augmente par conséquent les T_2 de l'eau contenue dans les cytoplasmes et dans les vacuoles (de 470 à 610 ms, pour la vacuole).

Tableau 1-3 données issu de [67], temps de relaxation transversale et amplitudes relatives des composante du signal mesurés dans la banane lors des 7 premiers jours de maturation post-récolte. Les mesures ont été effectuées sur 5 échantillons du même fruit.

Storage time (days)	Cellular wall		Cytoplasm		Vacuole	
	T_2 (ms)	%	T_2 (ms)	%	T_2 (ms)	%
0	14 ± 3	17 ± 3	90 ± 10	27 ± 4	320 ± 30	56 ± 4
1	21 ± 4	16 ± 3	100 ± 10	33 ± 5	370 ± 30	51 ± 6
2	18 ± 3	13 ± 3	110 ± 10	27 ± 5	410 ± 30	60 ± 6
3	20 ± 3	13 ± 3	140 ± 10	28 ± 5	470 ± 40	59 ± 6
4	21 ± 3	11 ± 1	170 ± 10	29 ± 4	510 ± 20	60 ± 5
7	27 ± 1	13 ± 2	190 ± 10	25 ± 5	610 ± 10	62 ± 5

Enfin, lors de la maturation post-récolte de tomates, le temps de relaxation transverse augmente de 180 à 300 ms [66] alors qu'aucun changement de la teneur en eau ou en soluté n'a été observé (IRM 0,2 T (8 MHz), TE = 30 ms, signal mono-exponentiel).

Un autre problème concerne les effets de la température sur les temps de relaxation mesurés dans les tissus végétaux qui ne peuvent être expliqués directement. Hills et al. [39] ont montré qu'une augmentation de la température de 5 à 22°C dans le parenchyme de la pomme, entraînait une augmentation du T_2 associé à la vacuole de 521 à 652 ms (TD-RMN, 100 MHz, TE = 0,4 ms). Inversement, dans les tubercules de pomme de terre, lorsque la température est passée de 25 à 45°C, le T_2 associé à la vacuole [68] a diminué de 450 à 375 ms (TD-RMN, 23,2 MHz, TE = 0,3 ms)(Figure 1-14). Les auteurs expliquent cette diminution des temps de relaxation par l'effet des échanges chimiques et par l'augmentation de la taille des compartiments cellulaires.

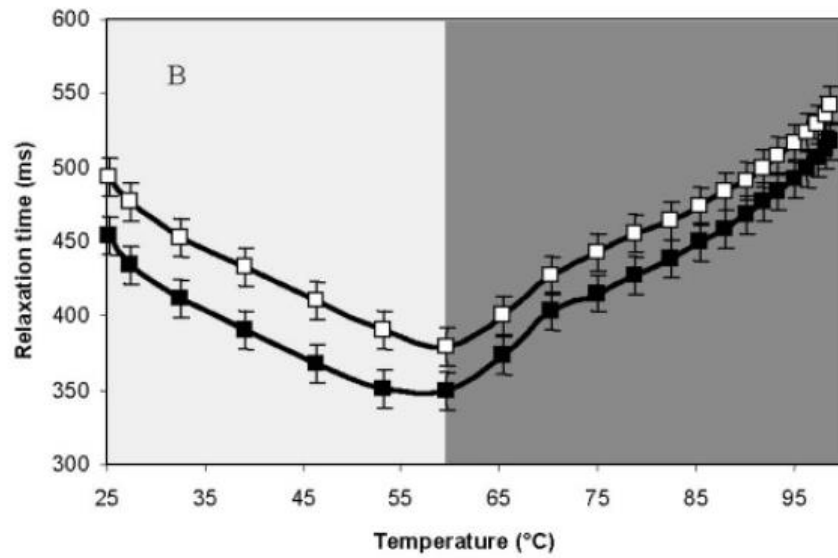


Figure 1-14: Figure issue de [68], représentant le T_2 de la composante longue (relaxation bi-exponentielle), mesuré dans la pomme de terre au cours de la cuisson, pour 2 teneurs en matière sèche différentes: faible (carrés blancs) et moyenne (carrés noirs). Le T_2 diminue avec la température jusqu'à environ 60°C où survient la gélatinisation de l'amidon.

1.2. OBJECTIFS DE LA THESE

Les résultats des applications de la relaxométrie par RMN et IRM à l'étude des végétaux suggèrent que les variations du T_2 de l'eau vacuolaire reflètent souvent plusieurs phénomènes physiques et chimiques qui sont simultanément modifiés par le processus étudié. En conséquence, dissocier les différents mécanismes de relaxation dans les tissus végétaux est loin d'être simple. Les résultats de la littérature présentent parfois des divergences, que ce soit dans l'attribution des temps de relaxation mais aussi dans l'interprétation des variations de ces derniers au cours de l'étude d'un même processus physique. Certaines de ces divergences peuvent être en partie expliquées par des conditions d'acquisition différentes.

L'eau contenue dans les principaux compartiments hydriques des tissus végétaux contient de nombreux composés organiques tels que des sucres et des acides, des échanges chimiques ont alors lieu entre les protons échangeables des différentes molécules en solution. Les variations des temps de relaxation induites par ces échanges chimiques vont être modulées en fonction de la composition du liquide contenu dans les compartiments hydriques (composition chimique, concentration et pH) de façon dépendante des conditions d'acquisition (intensité du champ magnétique, temps d'écho et température). Ce phénomène a été particulièrement étudié par RMN à haut champ (>100MHz) et peu d'études se sont finalement intéressées à son impact aux champs magnétiques faible et modéré, et en condition d'imagerie. De plus, la variation du coefficient de diffusion et de la structure compartimentée du tissu (taille des compartiments et propriétés des membranes), impactent les échanges diffusionnels des molécules d'eau des différents compartiments.

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la relaxation de tissus végétaux en considérant la composition du contenu cellulaire et la microstructure des tissus et de disposer ainsi de règles pour interpréter la variation du signal de relaxation, en particulier lors de processus de déshydratation. En effet, l'interprétation des changements des paramètres de relaxation lors de ces processus est particulièrement complexe en raison de nombreux phénomènes physico- chimiques qui rentrent en jeu.

Toutefois, les applications de la relaxométrie par l'IRM pour caractériser les changements de l'état et de la répartition de l'eau à l'échelle subcellulaire lors des processus impliquant une perte en eau sont nombreuses, dans le domaine de la biologie végétale et l'agronomie (stress hydrique) ou pour l'étude des procédés de transformation des fruits et légumes (séchage, traitements thermiques). Pour répondre à cet objectif, nous avons procédé par des étapes suivantes :

Une première étape a été d'analyser l'influence des échanges chimiques sur la relaxation transversale pour des champs faibles à modérés (0.2-1.5T) dans le cas de solutions de sucres faiblement concentrées, représentatives du contenu vacuolaire des fruits. Nous avons abordé cette problématique par des simulations numériques basées sur le modèle de Carver Richard et réalisé des expérimentations par imagerie à 1.5T, couplées à la modélisation. Cela a permis de hiérarchiser l'influence des paramètres tels que la concentration, le type de sucre, la température et le pH sur les temps de relaxation. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le Journal of Magnetic Resonance et constituent le troisième chapitre de cette thèse.

La seconde étape a été d'étudier les effets combinés des échanges chimiques et de la structure compartimentée sur les paramètres de relaxation des tissus végétaux . Nos études ont été réalisées sur la tomate, utilisée comme modèle de fruits charnus.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés aux changements des paramètres de relaxation transversale induits par des variations de température dans des gammes de températures où l'intégrité cellulaire est maintenue. Dans ce cas, la taille des compartiments et la composition du contenu des compartiments hydriques sont supposées constantes, alors que de nombreux paramètres dont dépendent les échanges chimiques et diffusionnels varient (mobilité moléculaire, vitesse d'échanges chimiques, perméabilité membranaire, ...). Cette étude est décrite dans le quatrième chapitre, rédigé sous forme de publication qui a été soumise au journal Applied Magnetic Resonance. Le cinquième chapitre présente l'étude des variations des temps de relaxation au cours de la déshydratation des tissus de tomate, processus complexe à l'origine des variations simultanées de la structure (taille des compartiments, microporosité, ..) et de la composition des tissus.

CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES

2.1. METHODES DE MESURE IRM

Les méthodes et les protocoles utilisés sont décrits dans les chapitres 3, 4 et 5 du manuscrit. L'objectif de ce chapitre est d'apporter des précisions sur les différentes méthodes utilisées quand cela est nécessaire et de présenter les étapes de validations techniques qui ont été réalisées en amont des études présentées.

2.1.1. DISPOSITIF DE REGULATION THERMIQUE COMPATIBLE IRM

Dans le cadre de ce travail de thèse, les données IRM ont été acquises sur un imageur corps entier (Siemens Avanto 1.5T (63MHz, proton) équipé d'un aimant supraconducteur et de gradients de champ magnétique de valeur maximale de 28mT/m. La température des échantillons a été régulée dans l'ensemble des expériences présentées dans le manuscrit à l'aide d'un dispositif de régulation thermique dédié (*Figure 2-1*). Ce dispositif nécessite l'utilisation d'antennes de réception ouvertes, comme celle représentée sur la *Figure 2-1*. La température de l'objet étudié a été contrôlée, avec une précision de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ à l'aide de fibres optiques placées dans un échantillon témoin à proximité de l'objet étudié.



Figure 2-1: Imageur (1.5T, Avanto, Siemens) avec le dispositif de régulation thermique

Dans le chapitre 3, les expériences ont été réalisées sur les solutions aqueuses de sucres simulant le contenu vacuolaire des fruits charnus. Ces solutions aqueuses ont été contenues dans les tubes de diamètre 3.4cm. Afin d'empêcher les vibrations du liquide dues aux gradients de champ magnétique, notamment pendant les mesures de diffusion, un support a été réalisé grâce à une imprimante 3D (*Figure 2-2, gauche*). Il permettait de maintenir les tubes en position horizontale, avec les coussins en néoprène collés dans les espaces prévus pour accueillir les tubes ainsi que sous la base du support qui permettait d'absorber les vibrations. Pour les mesures sur les tomates (chapitre 4) nous avons utilisé des plaques sur lesquelles des plots en caoutchouc ont été collés pour stabiliser les tomates au cours de la mesure (*Figure 2-2, droite*). Un coussin en néoprène a également été collé sous le support pour absorber les vibrations.



Figure 2-2: dispositifs utilisés pour les mesures IRM

2.1.2. ESTIMATIONS DES TEMPS DE RELAXATION TRANSVERSALE

La séquence utilisée pour les mesures des courbes de relaxation transversale est une séquence multi écho de spin (MSE) mise au point par le laboratoire [64]. Elle permet d'échantillonner la courbe de relaxation avec un nombre d'échos illimité, ce qui n'est généralement pas possible avec les séquences d'acquisition fournies sur les imageurs cliniques. Une des raisons de cette limitation est dans les applications médicales imposées par le SAR (Taux d'absorption spécifique) qui correspond à l'énergie déposée dans l'échantillon par les ondes RF. Les imperfections des impulsions RF sont cumulatives et sont par conséquent accentuées pour les trains d'écho longs.

Elles sont corrigées en grande partie par l'application de gradients de correction (crushers), avant et après les impulsions de refocalisation permettant de déphaser de façon sélective les signaux non-désirés.

Les imperfections des impulsions RF sont également limitées par l'utilisation d'impulsions de refocalisation non-sélective, ce qui permet également de minimiser le TE.

Les paramètres utilisés avec la séquence MSE communs aux chapitres sont décrits dans les parties matériels et méthodes des chapitres 3, 4 et 5.

Deux approches peuvent être envisagées pour l'estimation des temps de relaxation et des amplitudes associées à partir des images acquises avec la séquence MSE. Une première approche consiste à modéliser le signal comme la somme d'un nombre fini et connu d'exponentielles décroissantes, la seconde consiste à considérer une distribution continue de temps de relaxation pour laquelle il s'agit d'estimer les amplitudes.

2.1.2.1. Approches basées sur le modèle d'une somme discrète de décroissances exponentielles

Dans le cas d'une somme de décroissances exponentielles, le modèle décrivant le signal à l'instant t s'écrit:

$$m(t) = \sum_{n=1}^N I_{0n} e^{-t/T_{2n}} \quad \text{Eq.2-1}$$

Où N est le nombre de composantes a priori connu, I_{0n} et T_{2n} sont respectivement l'amplitude à $t=0$ et le temps de relaxation de la composante n . L'estimation de ces paramètres est généralement réalisée à l'aide de méthodes basées sur la minimisation d'un critère des moindres carrés entre les mesures et l'expression théorique de la courbe de relaxation, comme l'algorithme de Levenberg-Marquardt (L-M). L'utilisation d'un critère des moindres carrés induit des biais d'estimation. En effet, minimiser ce critère revient à maximiser la vraisemblance du signal dans le cas où le bruit suit une distribution gaussienne.

Or pour les images IRM en module, le bruit a une nature ricienne [77]. Toutefois, ce bruit peut être assimilé à un bruit gaussien lorsque le rapport signal sur bruit (RSB) est suffisamment élevé, ce qui n'est pas le cas en fin de décroissance T_2 . Afin de s'affranchir de cet effet, seuls les points de mesure dont le RSB est supérieur à 7 peuvent être pris en compte dans l'estimation des T_2 [78]. Afin d'estimer ce RSB, il est nécessaire de connaître la variance du bruit, σ^2 , elle-même estimée à partir des voxels constituant le fond de l'image, où le signal est théoriquement nul, par la relation suivante :

$$\sigma = \frac{\text{valeur moyenne du fond}}{\sqrt{\frac{\pi}{2}}} \quad \text{Eq.2-2}$$

Dans le cas d'un modèle mono-exponentiel ($N = 1$), le RSB est généralement suffisant à l'échelle d'un voxel pour estimer les paramètres avec une précision satisfaisante. A titre d'exemple, pour les solutions aqueuses (chapitre 3), le RSB à $TE=6.5ms$ du premier écho était en moyenne de 107 à $15^\circ C$. Dans le cas des tomates ($15^\circ C$), le SNR était d'environ 165. Cependant, pour un modèle multi-exponentiel, il est nécessaire d'augmenter le RSB, ce qui peut se faire en moyennant pour chaque TE le signal sur une région d'intérêt (ROI) homogène, définie sur une image pondérée en T_2 . Cependant, cette approche réduit l'information spatiale à l'échelle d'une ROI.

Afin de permettre l'estimation des paramètres de relaxation multi-exponentielle à l'échelle du voxel, une méthode originale a été récemment développée [77]. Cette méthode prend en compte la nature ricienne du bruit des images IRM et traite le problème du RSB limité en adoptant la stratégie de régularisation spatiale qui exploite les informations contenues dans le voisinage de chaque voxel.

2.1.2.2. Approche basée le modèle de distribution de temps de relaxation

Les algorithmes basés sur le modèle d'une somme de décroissances exponentielles nécessitent de connaître le nombre de composantes du signal de relaxation. Ils doivent également être initialisés par des valeurs des paramètres de relaxation relativement proches des vraies valeurs afin d'assurer la convergence de l'algorithme vers la solution optimale. Dans le cas où le nombre de composantes du signal n'est pas connu et/ou pour s'affranchir du problème de l'initialisation de l'algorithme, l'utilisation des méthodes d'estimation des temps de relaxation basées sur la recherche d'une distribution continue des temps de relaxation est plus pertinente. Cette approche, généralement utilisée en RMN, est basée sur la transformée de Laplace inverse. Dans le cadre de ce travail, c'est la Méthode de Maximisation de l'Entropie (MEM) [79] qui a été employée. N'étant pas développée pour l'imagerie, elle nécessite l'extraction de courbes de relaxation à partir des régions d'intérêt. Comme dans le cas de la méthode LM, le problème de la nature du bruit des mesures peut être traité en prenant en compte uniquement les données avec $RSB > 7$.

Dans le cadre de ce travail de thèse, ces différentes approches d'estimation de T_2 ont été employées en fonction de la nature des données expérimentales. Ainsi, les temps de relaxation des solutions modèles ont été estimés à l'aide de l'algorithme LM. Par contre, dans le cas de mesures réalisées sur les tissus de tomate, le nombre de composantes du signal de relaxation a été estimé par la méthode MEM. Dans les deux cas, l'approche de régions d'intérêt a été adoptée et uniquement les points à $SNR > 7$ ont été utilisés. Pour la réalisation de cartographie des temps de relaxation sur les tomates, nous avons utilisé l'algorithme d'estimation de cartographies de paramètres de relaxation multi-exponentielles [77], initialisé à l'aide des spectres MEM calculés sur des régions d'intérêts.

2.1.3. MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION

2.1.3.1. Acquisition d'images

Le coefficient de diffusion apparent (moyenne de D à l'échelle d'un voxel) peut être mesuré par IRM à l'aide d'une séquence pondérée en diffusion (PFGSE pour pulsed field gradient spin echo). La séquence PFGSE consiste en l'application de deux gradients de champ magnétique courts et intenses. Le premier, donne à la précession des protons une avance de phase en fonction de leur position, le second, compense cette avance. Ainsi, seuls les protons immobiles subissent un déphasage nul.

Avec cette séquence, l'écho de spin est pondéré par le coefficient de diffusion D et par un facteur de diffusion b . Si I_b est le signal mesuré dans le voxel pour chaque valeur de b et I_0 , le signal mesuré dans le voxel pour $b = 0$, la relation suivante s'applique :

$$\ln\left(\frac{I_b}{I_0}\right) = -b \cdot D \quad \text{Eq.2-3}$$

b dépend de la durée d'application du gradient de diffusion (δ), de son intensité (G) et du délai séparant les deux gradients selon la formule :

$$b = -\gamma^2 \delta^2 G^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad \text{Eq.2-4}$$

Il est ainsi possible de réaliser des cartographies de coefficient de diffusion apparent (ADC) en calculant l'ADC à partir des images obtenues à différentes valeurs de b . Il faut au minimum acquérir deux images avec des valeurs de b différents pour estimer la valeur d'ADC par régression linéaire, où généralement la première valeur de b est nulle. Dans le cas où il est important de vérifier que le tissu étudié est caractérisé par un seul coefficient de diffusion (modèle mono-exponentiel), il est pertinent d'acquérir les images à trois b différents.

En général, b est modulé en modifiant l'intensité des gradients appliqués et en gardant la durée d'application des gradients et le délai entre deux applications constants, afin de garder la même pondération T_2 .

Deux schémas d'acquisition pour estimer l'ADC ont été employés dans le cadre de ce travail. Le premier consiste à utiliser 8 valeurs de b régulièrement espacées sur une échelle logarithmique, avec une seule accumulation pour chaque valeur de b . Elle a été employée dans le chapitre 3. Un schéma alternatif, utilisé dans l'expérience de déshydratation de tomates (chapitre 5) consiste à prendre 4 valeurs de b mais avec un nombre d'accumulations différent en fonction de l'amplitude du gradient de diffusion. Le temps de mesure est identique pour les deux méthodes cependant, la seconde méthode doit permettre d'augmenter la précision de la mesure de l'ADC [80]. Les valeurs de b et le nombre d'accumulations ont été déterminés par simulation numérique au cours de travaux de recherche menés en parallèle de cette étude. Sur une gamme de D variant de 0.8 à $1.8 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, l'incertitude moyenne évaluée par la borne de Cramer-Rao à l'échelle du voxel est de 0.024 et $0.029 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ respectivement à 5 et 15 °C pour le premier schéma et de 0.021 et $0.026 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ pour le second schéma.

Dans les deux approches, les paramètres géométriques, le type d'impulsion de refocalisation et les gradients de correction correspondaient à ceux utilisés pour les mesures des T_2 . Les paramètres spécifiques communs étaient : $\Delta=60\text{ms}$, $\delta=20\text{ms}$, $TE=91\text{ms}$ et $TR=5\text{s}$. Dans le cas de la première approche, les valeurs de b (modifié en variant G entre 0 et 28mT/m) étaient: 0 ; 168.3 ; 219.8 ; 390.8 ; 610.7 ; 807.6 ; 1032.0 et $1196.9\text{s}\cdot\text{mm}^{-2}$; avec une accumulation pour chaque valeur de b . dans la deuxième approche, b était fixé à 0 ; 97.7 ; 390.8 et $879.4 \text{ s}\cdot\text{mm}^{-2}$, avec 2 ; 1 ; 1 et 4 accumulations, respectivement.

Les cartographies d'ADC ont été estimées à l'aide de l'algorithme L-M présenté plus haut, en supposant un modèle de décroissance de signal mono-exponentiel. Dans certains cas, nécessitant des analyses préliminaires, les valeurs d'ADC ont été estimées en parallèle par régression linéaire de la courbe obtenue en traçant $\ln(I/I_0)$ en fonction de b , en adoptant l'approche par région d'intérêt.

2.1.3.2. Validation de la méthode de mesure de l'ADC par IRM

La méthode de mesure du coefficient de diffusion par IRM a été validée par comparaison avec les mesures réalisées avec un spectromètre RMN à 20MHz (Bruker, Minispec). Ce spectromètre est équipé d'une unité de gradients permettant de générer les gradients pulsés allant jusqu'à des intensités de 4 T/m sur des durées d'impulsion inférieures à la milliseconde (environ 140 fois plus élevé qu'en cas d'imagerie employée dans ce travail). Par conséquent, la mesure d'ADC est optimisée et peut être considérée comme référence. Les mesures IRM ont été réalisées sur trois tubes d'eau distillée et trois tomates. Les mesures RMN ont été réalisées sur les mêmes échantillons d'eau, et sur deux d'échantillons cylindriques d'environ un centimètre de diamètre et de hauteur, prélevés dans le péricarpe équatorial de chaque tomate. Dans les deux approches, la température des échantillons a été fixée à 21°C. La séquence PFGSE a été utilisée dans le cas de l'IRM avec 8 valeurs de b (comme décrit plus haut). Dans le cas de la RMN, les paramètres de la séquence ont été fixés à : $\Delta=7.5\text{ms}$, $\delta=0.5\text{ms}$, $TE=15\text{ms}$, $TR=6$ ou 7s selon les échantillons et 7 accumulations. b était fixé à 85.6; 213.7; 381.6; 620.0; 785.6; 998.8 et $1145.1\text{s}\cdot\text{mm}^{-2}$ en variant G entre 0.81 et 2.95T/m.

La comparaison des valeurs de coefficient de diffusion obtenus par les deux techniques a été réalisée en moyennant la valeur de l'ADC sur 2 ROIs de chacune des tomates analysées, tracées à l'endroit où les échantillons ont été prélevés pour les mesures RMN (*Figure 2-3*). Il est à noter que dans cette approche, nous négligeons le fait que le coefficient de diffusion moyen reflète plusieurs compartiments cellulaires de façon dépendante de leurs temps de relaxation et que cette pondération diffère entre les deux techniques à cause des différentes valeurs de TE employées.

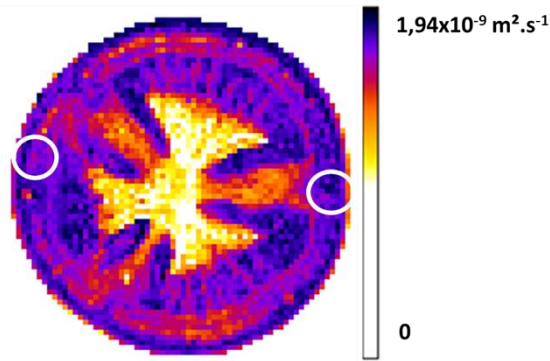


Figure 2-3: Cartographie d'ADC obtenue à partir des images acquises en IRM avec la séquence PFGSE en faisant varier b . Les ROIs délimitées par les cercles blancs correspondent aux zones où le signal a été mesuré dans le péricarpe équatorial, ainsi qu'aux zones de prélèvements pour les mesures RMN

Tableau 2-1: Valeurs des ADC mesurés en IRM (63MHz) et en RMN (20MHz). Les valeurs correspondent aux moyennes et écarts type de 3 et 6 mesures pour l'eau et le péricarpe, respectivement.

	ADC ($10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	
	IRM	RMN
EAU	2.09 ± 0.01	1.99 ± 0.01
PERICARPE DE TOMATE	1.70 ± 0.04	1.74 ± 0.02

Les résultats présentés dans le *Tableau 2-1* démontrent une très bonne concordance entre les coefficients de diffusion mesurés par IRM et ceux obtenus par RMN dans le cas de l'eau distillée et du péricarpe équatorial de la tomate et permettent de valider la méthode de mesure de l'ADC par IRM.

2.1.4. MICROPOROSITE APPARENTE

La mesure de la microporosité a été réalisée par la méthode décrite par Musse et al. [55]. En mesurant à la fois le T_2 et le T_2^* , on peut avoir accès aux informations concernant les inclusions mésoscopiques, notamment la microporosité ε qui représente la fraction volumique des inclusions dans le tissu. Pour cela il faut que le temps diffusion t_D ($t_D = R_0^2/D$); avec D : coefficient de diffusion et R_0 : rayon moyen des inclusions) soit supérieur à un temps caractéristique t_c (hypothèse du régime de déphasage statique [81]).

Avec $t_c = 9\sqrt{3}/(2\pi\gamma\Delta\chi B_0)$ et $\Delta\chi$ différence de susceptibilité magnétique entre les inclusions et le milieu.

Dans ce cas la microporosité apparente peut s'écrire:

$$\varepsilon = \frac{9\sqrt{3} \left(\frac{1}{T_{2*}} - \frac{1}{T_2} \right)}{2\pi\gamma\Delta\chi B_0} \quad \text{Eq.2-5}$$

Cette méthode a été utilisée dans le chapitre 5, pour estimer la microporosité apparente initiale des tissus, susceptible d'impacter le processus de déshydratation.

2.2. ESTIMATION DES PARAMETRES DU MODELE DE CARVER-RICHARD

Dans le troisième chapitre, nous avons estimé les variables d'intérêt, P_b , $\Delta\omega$, k_b et T_{2b} à partir des données de T_2 acquises par IRM sur des solutions aqueuses et du modèle de Carver-Richards. Ceci s'est avéré être un problème mal posé qui a nécessité plusieurs adaptations.

Nous avons utilisé la fonction datafit du logiciel Scilab pour minimiser la somme des carrés des écarts entre la valeur mesurée et la valeur prédite par le modèle. Cette fonction permet d'imposer des bornes minimales et maximales aux solutions si nécessaire. Enfin, cette méthode est une méthode itérative qui nécessite par conséquent d'initialiser les solutions. Nous avons proposé une démarche qui nous a permis d'aboutir à un résultat en accord avec les valeurs des paramètres attendues d'après la littérature.

Pour illustrer la problématique d'estimation des paramètres nous présentons plusieurs exemples de configurations testées sur des données acquises sur une solution de sucrose à 0.325mol.L^{-1} ($\approx 10.7\%$ de teneur en soluté). Les valeurs initiales utilisées à ce stade sont adaptées de celles indiquées par Fabri [23] pour une solution de saccharose à 20% de teneur en soluté (Tableau 2-2) et les ajustements ont été réalisés en prenant en compte une gamme de temps d'écho disponible sur notre IRM (6.5-40ms).

Tableau 2-2: Valeurs initialisation pour une solution de sucrose à 0.325mol.L^{-1} (10.7%), ces paramètres sont adaptés de ceux donnés par Fabri [23] pour une solution de saccharose à 20%

P_b	K_b (s^{-1})	$\Delta\omega$ (ppm)	T_{2b} (s)	T_{2a} (s)
0.0245	265	1.4039	0.187	1.44

Les résultats obtenus sont reportés dans le *Tableau 2-3*, et la *Figure 2-4* représente les données et la courbe reconstruite en utilisant les valeurs estimées. Sur cette figure on observe une certaine discordance entre la courbe et les données expérimentales. Les valeurs des vitesses d'échanges k_b et de déplacement chimique $\Delta\omega$ sont relativement proches de celles attendues [23]. En revanche, la valeur de P_b est deux fois moindre que la valeur théorique (0.0245), calculée comme le ratio entre le nombre de groupes hydroxyles du soluté et le nombre total de groupes hydroxyles de la solution. Enfin la valeur de T_{2b} de 909s est aberrante. On s'attend à des valeurs inférieures à 1s pour ce paramètre.

Tableau 2-3: Résultats d'ajustement sur la gamme de TE allant de 6.5 à 40ms, tous les paramètres sont libres.

Concentration (mol.L^{-1})	P_b	K_b (s^{-1})	$\Delta\omega$ (ppm)	T_{2b} (s)
0.325	0.012	242.0	1.05	909

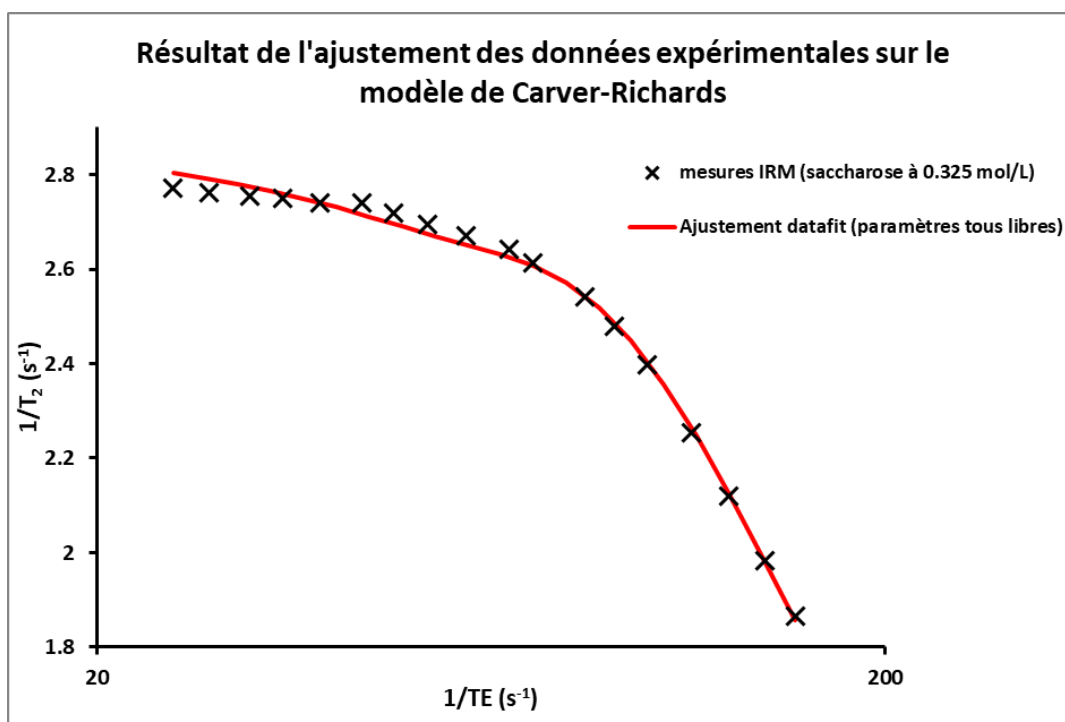


Figure 2-4: résultat de l'ajustement sur l'intervalle (6.5-40ms), tous les paramètres sont libres

Le test suivant a consisté à fixer la valeur de P_b à sa valeur théorique, en conservant les mêmes valeurs initiales que précédemment pour les autres paramètres. Les résultats d'estimation sont présentés dans le *Tableau 2-4* et la *Figure 2-5* représente les données expérimentales et la courbe reconstruite en utilisant les valeurs estimées.

Tableau 2-4: Résultats d'ajustement sur la gamme de TE allant de 6.5 à 40ms, avec P_b fixé à sa valeur théorique (0.0245)

Concentration (mol.L ⁻¹)	K_b (s ⁻¹)	$\Delta\omega$ (ppm)	T_{2b} (s)
0.325	521.5	0.63	24.1

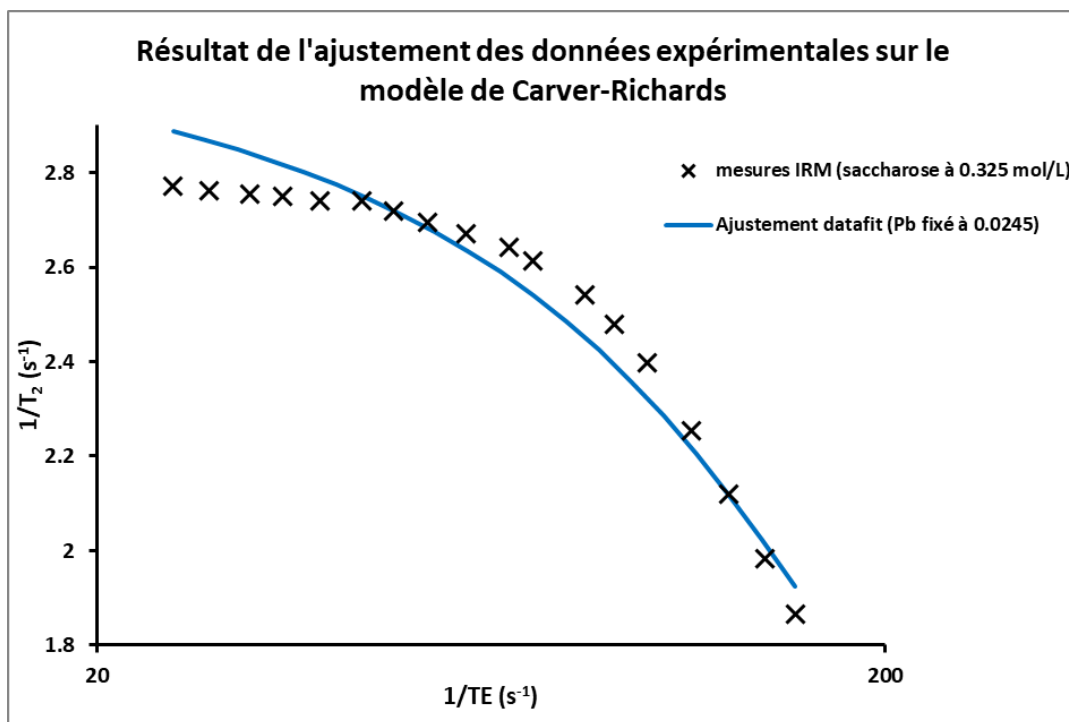


Figure 2-5: résultat de l'ajustement sur l'intervalle (6.5-40ms), P_b est fixé à sa valeur théorique.

De même que dans le cas précédent, la courbe n'est pas en totale concordance avec les mesures. De plus, les valeurs obtenues pour chaque paramètre du modèle sont très éloignées de celles attendues, avec une valeur aberrante pour T_{2b} . Ce paramètre est le plus instable et sa valeur semble avoir peu d'impact pour ce jeu de données. Fixer P_b impose des contraintes trop fortes sur le modèle, a minima dans cet exemple précis et en utilisant les données acquises sur la gamme des TE utilisée.

Une autre solution envisageable est de fixer la valeur du déplacement chimique $\Delta\omega$ à celle donnée dans la littérature [23]. La *Figure 2-6* représente le résultat de l'estimation et montre que cette solution n'est pas adéquate.

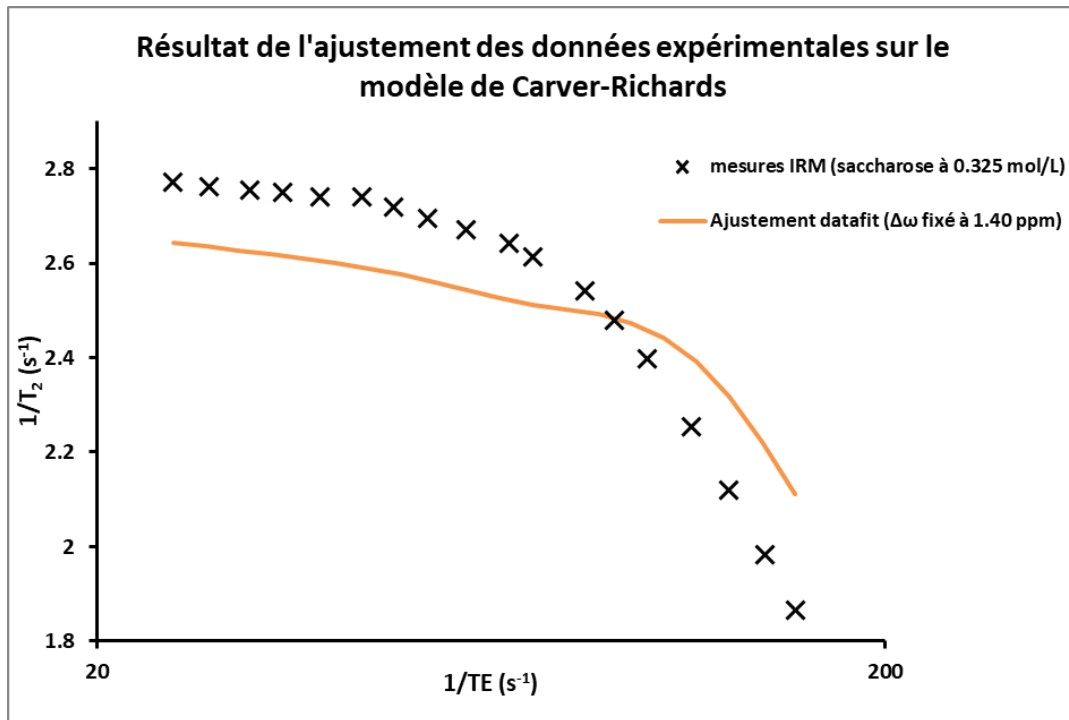


Figure 2-6: résultat de l'ajustement sur l'intervalle (6.5-40ms), $\Delta\omega$ est fixé à la valeur donnée par Fabri [23] pour le saccharose.

La contrainte sur le déplacement chimique est probablement trop forte, la courbe d'ajustement est en forte discordance avec les points de mesure. Le résultat est similaire lorsque l'on fixe P_b et $\Delta\omega$ simultanément.

Compte-tenu des résultats précédents, une autre solution envisagée est d'imposer des bornes sur T_{2b} . Nous avons choisi de restreindre les valeurs possibles dans l'intervalle (10^{-5} - 1.5s). Les autres paramètres sont libres. Les valeurs estimées sont présentées dans le *Tableau 2-5* et la *Figure 2-7* représente les données et la courbe reconstruite en utilisant les valeurs estimées.

Tableau 2-5: Résultats d'ajustement sur la gamme de TE allant de 6.5 à 40ms, avec des bornes fixées pour T_{2b} : (10^{-5} ; 1.5 s)

Concentration (mol.L ⁻¹)	P_b	K_b (s ⁻¹)	$\Delta\omega$ (ppm)	T_{2b} (s)
0.323	0.014	204.2	0.99	0.06

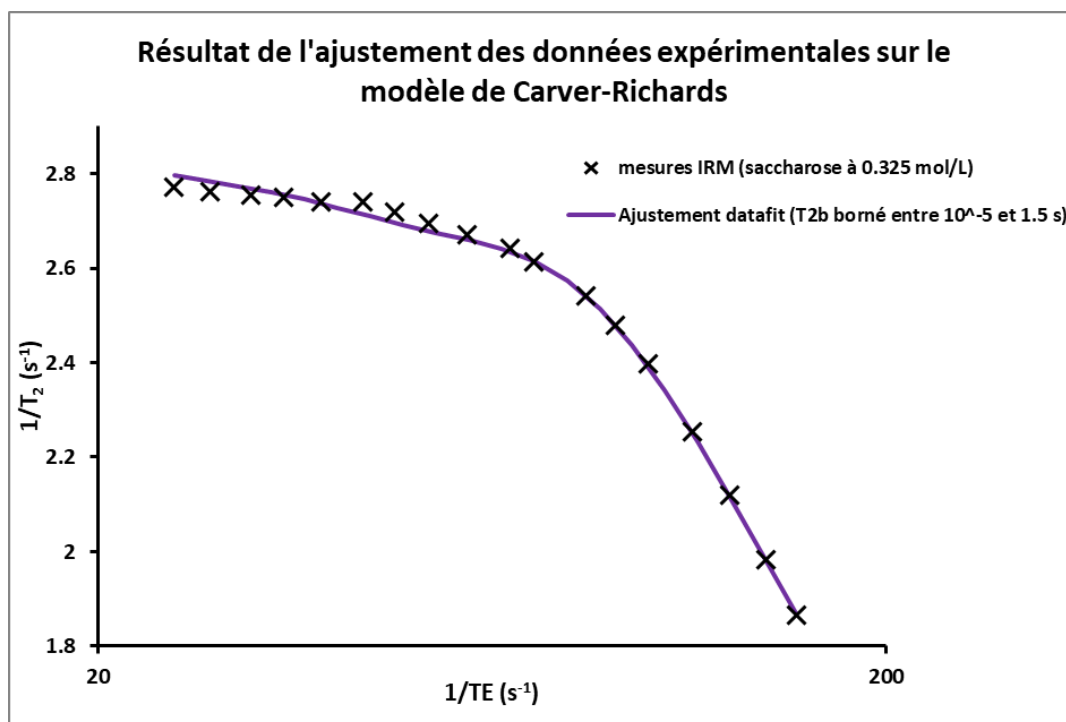


Figure 2-7: résultat de l'ajustement sur l'intervalle (6.5-40ms) avec la fonction, des bornes sont définies pour T_{2b} : (10^{-5} ; 1.5 s)

Le résultat obtenu avec des bornes sur le T_{2b} correspond à des valeurs cohérentes avec celles données par Fabri [23], toutefois, les valeurs ajustées des différents paramètres sont plus faibles que l'estimation. Les points de mesures qui se révèlent être le moins bien représentés par les ajustements sont ceux qui correspondent à des TE longs. Lorsque les temps d'écho sont longs, les échanges diffusionnels peuvent avoir un impact non négligeable sur le signal de relaxation et donc sur la mesure du T_2 . Ce phénomène n'étant pas pris en compte dans le modèle, il s'avère préférable de ne pas les prendre en considération et d'ajuster les données sur une plage de temps d'écho réduite (6.5 ; 23ms).

Les résultats d'estimation sur cette plage sont reportés dans le *Tableau 2-6* et la représentation graphique correspondante *Figure 2-8*. Les bornes sur T_{2b} ont été maintenues, les autres paramètres sont libres.

Tableau 2-6: Résultats d'ajustement sur la gamme de TE allant de 6.5 à 23ms

Concentration (mol.L ⁻¹)	P _b	K _b (s ⁻¹)	Δω (ppm)	T _{2b} (s)
0.323	0.012	265.0	0.99	0.217

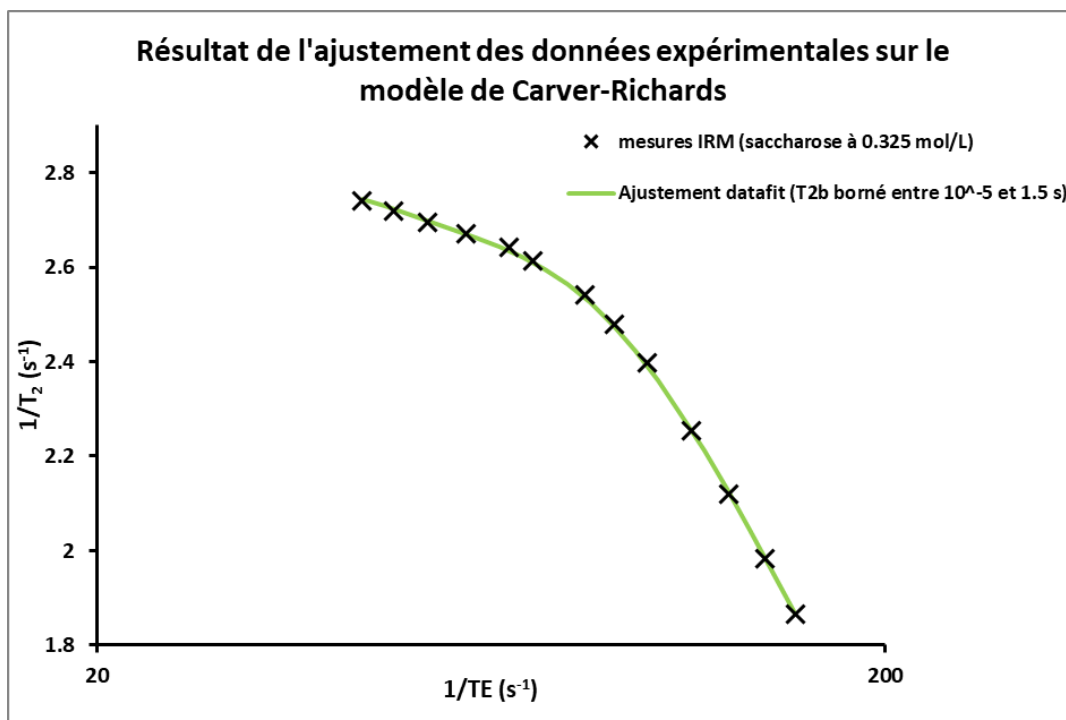


Figure 2-8: résultat de l'ajustement sur l'intervalle (6.5-23ms).

Le résultat obtenu pour l'ajustement des données sur une gamme de temps d'écho réduite (6.5-23ms) est proche de celui obtenu sur une gamme de temps d'écho plus large (6.5-40ms) en imposant des bornes sur le paramètre T_{2b} (Tableau 2-5). L'écart entre les points de mesure et la courbe théorique est significativement plus faible.

La solution retenue pour l'estimation des paramètres présentée dans le chapitre 3, est d'exclure les points mesurés à TE > 23 ms. Dans ce chapitre, le T₂ de différentes solutions de sucre a été mesuré en faisant varier le TE et la température. Cependant, l'amplitude des variations de T₂ en fonction du TE diminue avec la température, rendant l'estimation des paramètres plus difficile. Nous avons alors estimé les 4 paramètres à 8°C (où les variations de T₂ sont les plus importantes) et utilisé la même valeur de P_b pour les températures plus élevées. Enfin, lorsque la valeur estimée de T_{2b} était aberrante, nous avons réitéré l'estimation en imposant des bornes sur ses solutions.

En ce qui concerne les valeurs initiales pour k_b , $\Delta\omega$ et T_{2b} , nous avons opté pour une recherche préalable sur une grille de combinaisons prédéfinie. Nous avons utilisé les valeurs suivantes : pour k_b de 200 à 3000 par pas de 10 s^{-1} , pour $\Delta\omega$ de 0.7 à 1.3 par pas de 0.0025 ppm et pour T_{2b} de 0.01 à 0.05 par pas de 0.0005 s. La combinaison de valeurs correspondant à la valeur minimale entre les T_2 mesurés et les T_2 estimés via le modèle est retenue pour initialiser l'estimation.

**CHAPITRE 3: IMPACT OF CHEMICAL EXCHANGE
ON TRANSVERSE RELAXATION AT LOW AND
MODERATE MAGNETIC FIELD STRENGTHS FOR
SUGAR SOLUTIONS REPRESENTATIVE OF FRUIT
TISSUES ANALYZED BY SIMULATION AND MRI
EXPERIMENTS**

3.1. RÉSUMÉ

Les effets des échanges chimiques sur la vitesse de relaxation transversale ont été étudiés pour des intensités de champs magnétiques faibles à modérés.

Cette étude a été menée sur des solutions de sucres simples faiblement concentrées (fructose et glucose), en première approximation du contenu vacuolaire des fruits charnus. Les données simulées obtenues à partir des équations de Carver et Richards ont été utilisées pour analyser les effets de la température, de la concentration et du pH sur les paramètres impliqués dans les mécanismes d'échanges chimiques.

Les résultats ont mis en évidence que les conditions de mesure et les caractéristiques des tissus (temps d'écho, intensité du champ, température, pH, etc.) ont un impact significatif sur la relaxation transversale, même dans une gamme de champs faibles à modérées (0.2-1.5T) dans des conditions d'imagerie, pour une gamme de temps d'écho plus longs que ceux généralement utilisés en RMN.

Ceci explique certaines divergences des données de relaxation RMN sur les tissus végétaux rapportées dans la littérature, et souligne l'importance de la prise en compte des conditions expérimentales et des caractéristiques du tissu étudié lors de l'interprétation des résultats.

Il a aussi été clairement démontré que le choix des conditions expérimentales peut accentuer les effets de la concentration en sucre ou des variations de pH sur la relaxation transversale dans les liquides vacuolaires, permettant le suivi de ces paramètres via des mesures de relaxation transversale. L'impact de la concentration, du type de soluté, du pH et de la température sur la relaxation transversale des solutions de sucre ont été démontrées expérimentalement dans des conditions d'imagerie à 1.5T.

Ces données ont été interprétées à l'aide du modèle Carver–Richards qui a permis d'estimer les valeurs des différents paramètres impliqués dans les mécanismes d'échanges chimiques.

3.2. INTRODUCTION

Time Domain (TD) NMR and MRI relaxometry are suitable for the characterization of plant tissues [69] as they make it possible to access information on the status and distribution of water at cell and tissue levels. A number of applications of these techniques in plant and food science have been reported on various issues, such as fruit or leaf development [65, 82], storage of fruits and tubers [56] and drying and freezing processes [71]. Although valuable insights into the changes in tissue characteristics have been obtained, interpretation of the variations in relaxation parameters that occur during these processes remains a complex task. This is due to the multiple changes in composition and structure that a plant tissue undergoes during its transformation (composition, cell size, pH, etc.), and to the impact of these changes on the relaxation parameters via different physical and chemical mechanisms which, in turn, depend on the experimental conditions (magnetic field strength and experimental protocol). As a result, dissociating the different relaxation mechanisms in plant tissue is far from straightforward. Indeed, the transverse relaxation mechanisms can be considered by representing the plant cells in the first approximation as several water pools with different bulk T_2 relaxation. In each pool, the bulk relaxation is mainly defined by proton exchanges between water and cell metabolites and membranes. At the cell and tissue levels, the relatively slow diffusive exchange between water pools through semi-permeable membranes, gives rise to a multi exponential signal that reflects water compartmentalization. As a consequence of the diffusion exchanges, the observed T_2 of water pools depends on compartment size and membrane properties. Finally, the presence of air-filled intercellular spaces in plant tissues may also affect observed relaxation times due to differences between the magnetic susceptibility of air and water [69].

As a consequence of the complexity of the relaxation mechanisms in plant tissues, a number of divergent results are reported in the literature. One typical example concerns fruit drying studied by TD NMR. For example, dehydration of apple samples resulting in a 45% mass reduction in one case strongly reduced ($\sim 50\%$) the T_2 of the vacuolar water [70] (20MHz, TE=5.6ms), while it did not produce any effect on the vacuolar water transverse relaxation in [71] (100MHz, TE=0.4ms). For higher mass losses ($\sim 50\%$), vacuolar T_2 decreased for about 50% and 20% in apple [71] and broccoli [73] (23.3MHz, TE=33ms) tissues respectively, while it remained unchanged in tomato ([72]; 20MHz, TE=0.2ms). Some opposite results were also observed during fruit maturation.

During the maturation of kiwi [65] (85MHz, TE=20ms) no impact on the mono-exponential T_2 relaxation times measured by MRI was observed, despite an increase in dry matter and sugar concentration of 68% and 200% respectively. By contrast, during the postharvest ripening of banana [67], the T_2 of all components of the multi-exponential signal measured by TD-NMR increased (20MHz, TE=2ms). Finally, TD-NMR studies showed that a temperature increase in apple resulted in the increase in the T_2 of the vacuole water [71](100MHz, TE=0.4ms), while the opposite was observed in potato [68] (23.2 MHz, TE=0.3ms). The above examples suggest that variations in the T_2 of vacuolar water probably often reflect several physical and chemical phenomena that are simultaneously altered by the process under investigation.

In the vacuole, one of the main phenomena related to bulk water relaxation is proton exchange between water and cell metabolites. The contribution of proton exchange depends on the concentration and transverse relaxation of exchangeable solute protons, the chemical shift ($\Delta\omega$) between protons from different molecular environments involved in the exchange, and on the exchange rate (k_b). The last is modulated by temperature and the pH of the medium [37], whereas $\Delta\omega$ depends on solute (sugars and organic acids) structure and on magnetic field intensity. The impact of chemical exchange on the T_2 value also depends on the pulse spacing of the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) sequence, as the ratio between the pulse spacing and the exchange rate determines the dephasing of the spins from different molecular environments. This effect, which gives rise to a dispersion phenomenon, is described by the Carver-Richards model [27].

Although the effect of chemical exchanges on transverse relaxation in plant tissues strongly depend on experimental conditions, they were mainly investigated at relatively high magnetic fields of 100MHz and above [36, 44], while the magnetic fields ranging between 20 and 100MHz have rarely been investigated. Moreover, these investigations concern TD NMR while in MRI studies, the impact of chemical exchanges on T_2 has often been overlooked and the changes in T_2 with echo time have been mostly attributed to the effects of magnetic susceptibility induced by tissue porosity. In order to address these two issues, the work presented in this paper focuses primarily on the understanding at low to moderate magnetic fields (0.2 to 1.5T) of mechanism involved in chemical exchange impacting the bulk transverse relaxation times of liquids in plant tissues.

In the first step, numerical simulations based on the Carver and Richards model (Appendix A) were used to explore the impact of magnetic field strength on the observed T_2 , by taking into consideration the pulse space ranges used in MRI and TD NMR experiments. The range of the magnetic field strengths analyzed corresponded to that of TD-NMR spectrometers and MR imaging systems usually used for plant applications. Then, the impact of temperature and pH on chemical exchanges effects and consequently on the observed T_2 values was investigated. The study was performed on systems that simulated vacuole liquid, corresponding to the solution of small molecules (fructose and glucose), with small chemical shifts (0.8-1.2ppm) and low concentrations (with no changes in viscosity). The aim was to demonstrate how a slight variation in experimental conditions (magnetic field strength, pulse spacing, temperature, pH) will impact the transverse relaxation times measured in the conditions of TD NMR or MRI experiments. In a second step, the impact of temperature, concentration, solute type and pH on T_2 of sugar solutions were analyzed experimentally at 1.5T with an MRI scanner. The Carver and Richards model was successful in analyzing the dispersion curves obtained by MRI, despite the constraints of the imaging experiment (range of relatively long TE used, inhomogeneities in B_1 and B_0 , imperfect refocusing pulses, etc).

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1. NUMERICAL SIMULATION

Sets of simulated T_2 -dispersion curves for aqueous solutions of sugars were generated with Scilab 5 software (Scilab, ESI Group, France). The effects of magnetic field intensity (B_0) on the T_2 -dispersion curves were studied at 8, 20, 60, 80, 100 and 200MHz (0.2, 0.5, 1.5, 1.9, 2.4 and 4.7T, respectively) corresponding to a range of TD NMR spectrometers and MR imaging systems usually used for plant applications. The dispersion curves were generated with TE spanning the range of values generally used in TD NMR (0.1-10ms; 40 values equally spaced on a logarithmic scale) and imaging (6.5-20ms; 10 values equally spaced on a logarithmic scale) relaxometry experiments. P_b was fixed to 0.015, which corresponds to the ratio of the number of sugar hydroxyl groups to the total number of hydroxyl groups in fructose or glucose 60g/L solution. The sugar molecular structure was taken into account by setting the differences in chemical shift between water and sugar protons at 0.8 and 1.2 ppm for fructose and glucose respectively [83].

The effects of temperature (Eyring's law, Eq.3-1) and pH (Eq.3-2) on the T_2 of sugar solutions were studied respectively by varying the exchange rate k_b [37, 43]:

$$k_b = \frac{K_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) \quad \text{Eq.3-1}$$

$$k_b = k_1 [H_3O^+] + \frac{k_2 K_w}{[H_3O^+]} \quad \text{Eq.3-2}$$

Where K_B is the Boltzmann constant, h the Planck constant, ΔG the Gibbs energy of activation, R the gas constant, k_1 and k_2 are the exchange rate constants of the acid-base reaction, and K_w is the autoprotolysis constant for water. T_{2a} was set to the relaxation time of pure water, measured experimentally for different temperatures, while T_{2b} was fixed at 50ms which corresponds approximately to the relaxation times of the non-exchangeable protons of simple sugars in dilute systems [45]. Variations in T_{2b} and $\Delta\omega$ were considered to be negligible across the temperature range (8-32°C) and for the low sugar concentrations studied according to [23].

3.3.2. EXPERIMENTAL

3.3.2.1. Samples

D-glucose and D-fructose were purchased from Sigma Chemicals and used as such without further purification. The solutions were obtained by dissolving sugars in ultra-pure water (resistivity at 25°C: 18.2 MΩ.cm, Synergy UV Water Purification System, Merck, Darmstadt, Germany) and adding sodium azide (2.0 mmol/L) as the antibacterial agent, under constant stirring. The pH was adjusted to selected values at 7.0 and 4.4 with sodium hydroxide and hydrochloric acid respectively, purchased from Sigma Chemicals.

The experimental setup involved seven 50mL tubes (3.4 cm in diameter and 7.0 cm in height) containing different solutions: 1) pure water; 2) 29.4g/L fructose, pH=4.4; 3) 29.4g/L fructose, pH=7.0; 4) 28.8g/L glucose, pH=4.4; 5) 28.8g/L glucose, pH=7.0; 6) 14.7g/L

fructose+14.4g/L glucose, pH=4.4 and 7) 29.4g/L fructose+28.8g/L glucose, pH=4.4. The tubes were placed on a specially designed base with 2mm thick neoprene pads between the tubes and the base to prevent vibrations.

3.3.2.2. Magnetic Resonance Imaging

MRI measurements were performed on a 1.5T scanner (Magnetom Avanto, Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a circular polarized head array coil. The prepared apparatus was placed in a temperature regulating device installed inside the RF coil. Five optical fibers connected to a data logger (UMI8, FISO Technologies Inc., Canada) were inserted into the tubes and used to control the temperature of the solutions during the MRI experiment. Prior to the experiment, the uncertainty of the temperature measurement was estimated to be less than 1°C. T_2 was measured using a multi spin echo (MSE) sequence [64] with 256 echoes and the first echo (TE) equal to the inter-echo spacing. The parameters common to all experiments were: transverse orientation, Field Of View 152x152mm², matrix size 128x128, slice thickness 5mm, pixel bandwidth 260Hz, Repetition Time 10s and 1 scan. Experiments were performed at 8, 12, 15, 20, 24, 28 and 32°C with TE set at 6.5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 and 20ms.

Regions of interest (ROI) for each tube were selected with ImageJ software (National Institutes of Health, USA). The signal was then averaged for each ROI and for all the MSE magnitude images of the series. The signal to noise ratio (SNR) was obtained by taking the ratio of the mean signal in the image to the mean signal in the background divided by $\sqrt{\frac{\pi}{2}}$. Only data characterized by a SNR greater than 7 were kept for relaxation parameter estimation, making it possible to assume zero-mean Gaussian noise distribution in magnitude images at all echo times [78]. Mono-exponential T_2 values were obtained by fitting the relaxation curves using the Levenberg-Marquardt algorithm with TableCurve 2D Software (Systat Software Inc., USA).

The repeatability of the T_2 measurements, including acquisition and image processing steps, was estimated by acquiring three scans at TE=6.5ms with independent scanner settings (automatic frequency and transmitter attenuation/gain adjustments and shimming) at four different temperatures (8, 15, 24 and 32°C). In all cases, the standard deviation of the three repetitions was less than 0.4% of the T_2 value measured in each tube.

3.3.2.3. Estimation of the Carver and Richards NMR parameters

The dispersion curves of each experimental condition studied consisted of 8 T_2 measurements at different TE values (from 6.5 to 16ms). The fitting of the experimental dispersion curve with the two-site expression of Carver and Richards model was carried out using the Levenberg-Marquardt algorithm implemented in the Datafit function of Scilab 5 software. The outputs of the fit were: k_b , $\Delta\omega$ and T_{2b} , while, T_{2a} was fixed at the value measured for pure water at each temperature. After a first adjustment at the lowest temperature (8°C) where all the parameters were estimated (P_b , k_b , $\Delta\omega$ and T_{2b}), it was confirmed that the estimated value of P_b was close to its theoretical value corresponding to the ratio of the number of sugar hydroxyl groups to the total number of hydroxyl groups in the solution. P_b was then fixed at the value of this preliminary adjustment.

Due to experimental constraints, the TE values could not be chosen optimally, the minimum value being 6.5ms. As a consequence, the estimation of the parameters from the adjustment on the experimental data was an ill-posed inverse problem that depended on the initial guess. Fitting was therefore stabilized by first estimating the initial guess through the direct mapping of the parameter space [84]. This consisted in the comparison of the experimental T_2 values ($T_{2,exp}$) with those calculated at the points of a multidimensional grid ($T_{2,theo}$) delimiting a space of physically reasonable parameters for k_b , $\Delta\omega$ and T_{2b} . The grid was defined as followed (minimum; maximum; step) using values from the literature: k_b in s^{-1} (200; 3000; 10), $\Delta\omega$ in ppm (0.7; 1.3; 0.0025) and T_{2b} in s (0.01; 0.05; 0.0005). The combination with the lowest sum of the squares of the differences between ($T_{2,exp}$) and ($T_{2,theo}$) was selected as the initial guess. The dispersion curves were then fitted as a function of the pulse spacing for different temperatures i.e. 8, 11, 15, 20 and 24°C.

3.4. RESULTS AND DISCUSSION

3.4.1. SIMULATED DATA

Numerical simulations of the effects of magnetic field strength and exchange rates on the dispersion curves for sugar aqueous solutions at low (8 (0.2T) and 20MHz (0.5T)), mid (60 (1.5T) and 80 MHz (1.9T)) and relatively high (100 (2.3T) and 200MHz (4.7T)) magnetic field strengths are shown in *Figure 3-1*.

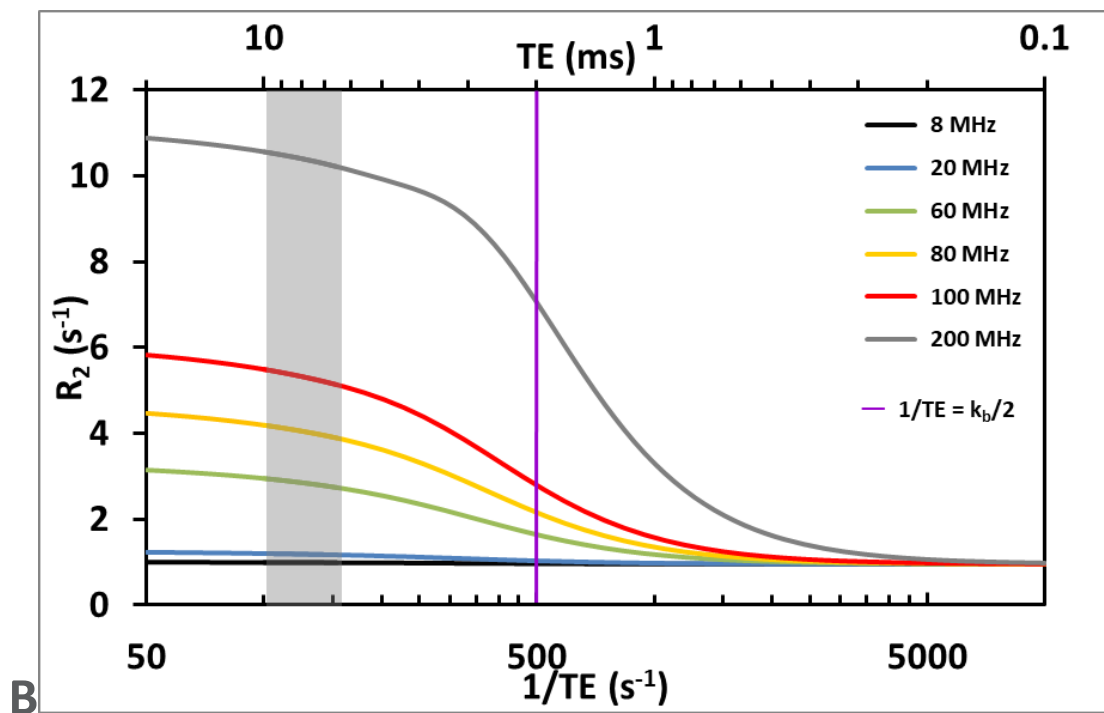
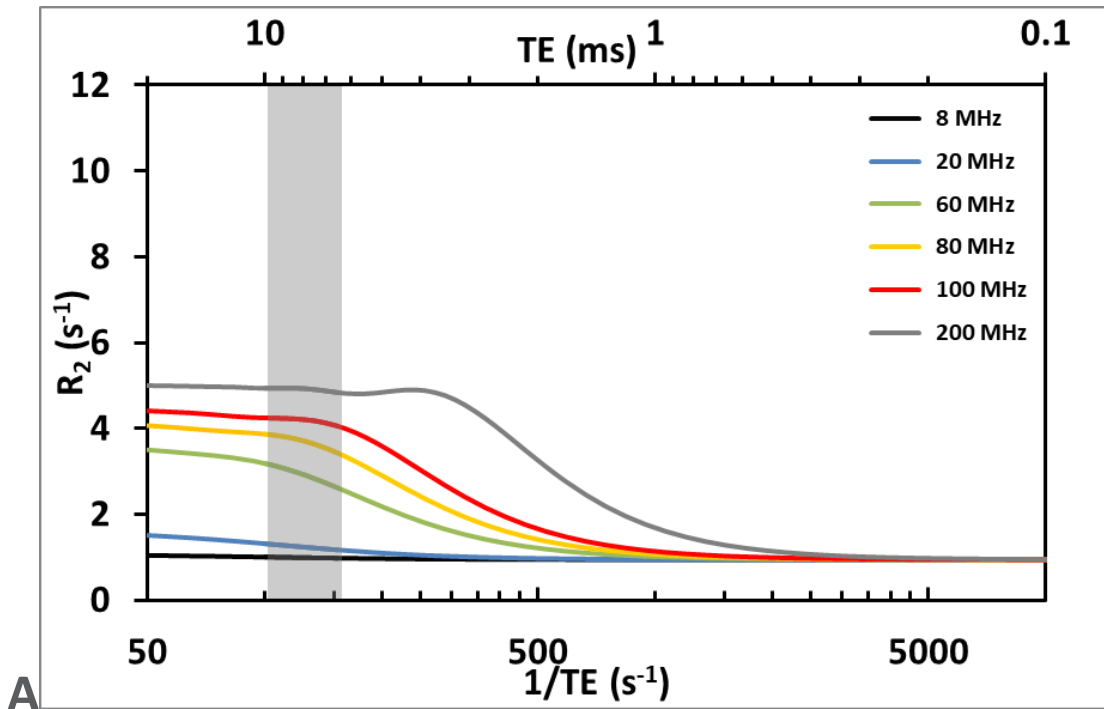


Figure 3-1: Relaxation dispersion curves simulated for 60g/L ($P_b=0.015$) glucose solution ($\Delta\omega=1.2\text{ppm}$ and $T_{2b}=50\text{ms}$) and for different magnetic field strengths (8; 20; 60; 80; 100; 200MHz). 100% of the hydroxyl protons are assumed to be accessible to exchange and have the same chemical shift. A corresponds to 5°C with $k_b=300\text{s}^{-1}$ and $T_{2a}=1.5\text{s}$ and B corresponds to 20°C with $k_b=1000 \text{ s}^{-1}$ and $T_{2a}=1.5\text{s}$. The shaded area indicates the range of echo time values usually accessible through both MRI and NMR, echo times to the left of this zone are accessible only through MRI and echo times to the right of this zone only through NMR.

A more detailed analysis of the complex effects of temperature on T_2 of sugar solutions was then carried out for low and mid magnetic field ranges (i.e. 20 and 60MHz) where the effects of chemical exchanges have generally been considered to be minor and for the echo times (1, 6.5 and 14ms) representative of the TD-NMR and MRI experiments on plants (*Figure 3-2*).

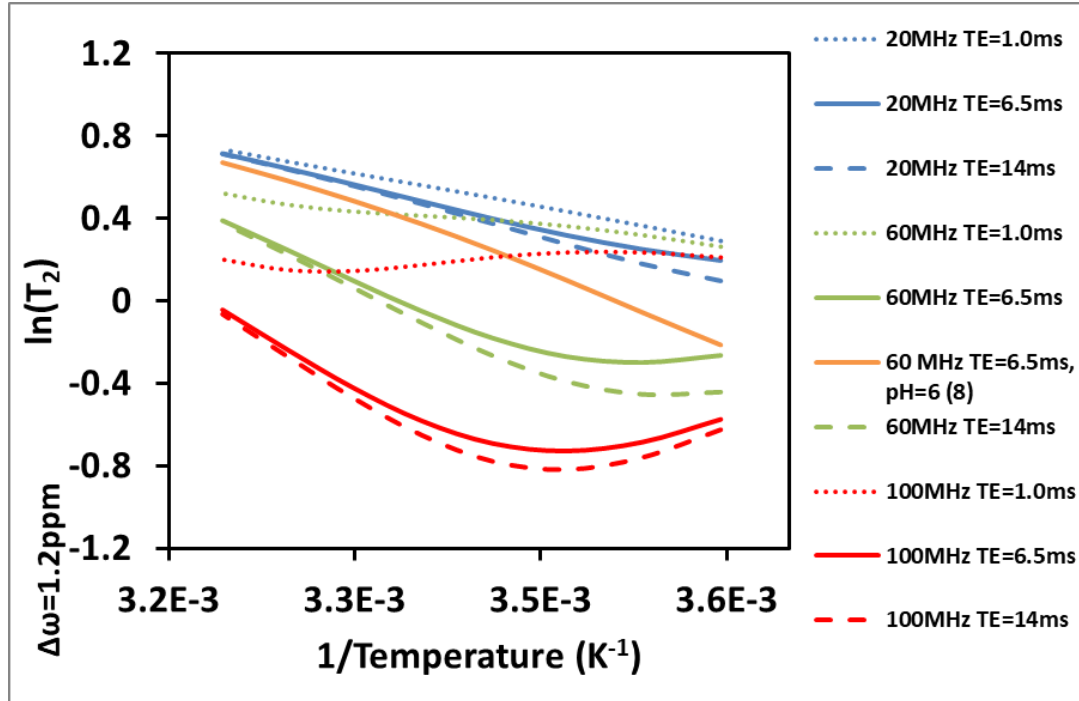


Figure 3-2: Numerical simulation of the relationship between T_2 of 20g/L glucose solution and temperature (5–40°C, 8 values equally spaced) at different field strengths (20, 60 and 100MHz) and echo times (1.0, 6.5 and 14ms). Parameters values: $P_b=0.005$; $\Delta\omega=1.2\text{ppm}$; $T_{2b}=50\text{ms}$; $T_{2a}=1.5, 1.7, 1.8, 2.0, 2.2, 2.3, 2.5$ and 2.7s ; $k_b= 300, 456, 687, 1020, 1495, 2164, 3096$ and 4380s^{-1} ; $\text{pH}=7$. For 60MHz and $\text{TE}=6.5\text{ms}$, T_2 dependence on temperature is also shown for $\text{pH}=6(8)$.

The temperature range from 5 to 40°C was analyzed, as it corresponds to that encountered in physical processes where the integrity of the cell is preserved. An analysis of the effects of sugar concentration, sugar type and pH on T_2 of sugar solutions is given in Appendix B (*Figure 3-7*, *Figure 3-8* and *Figure 3-9*). In both *Figure 3-2* and Appendix B, data were systematically compared with data corresponding to the well-described dispersion curves at 100MHz reported by Hills et al. [36].

3.4.2. EFFECT OF MAGNETIC FIELD STRENGTH

Figure 3-1 depicts the dispersion curves for a general case simulating the vacuolar compartment of fleshy fruit parenchyma (glucose concentration of 60g/L; 96% water content) for exchange rates of 300s^{-1} (Figure 3-1A) and 1000s^{-1} (Figure 3-1B), corresponding approximately to temperatures of 5 and 20°C respectively and neutral pH [85]. Considering the two figures, both the effects of the exchange rate and the magnetic field on the dispersion curves can be observed. The characteristic shape of the dispersion curves shows a decrease in transverse relaxation rate (R_2) with TE^{-1} between two plateaus observed for the long and short TE values. According to the Swift and Connick equations [36, 86], T_2 values at the plateaus for long (Eq.3-3) and short TE (Eq.3-4) respectively are expressed as follows:

$$R_2 = \frac{1}{T_{2a}} + \frac{P_b k_b}{P_a} \left\{ \frac{T_{2b}^{-2} + T_{2b}^{-1} k_b + \Delta\omega^2}{(T_{2b}^{-1} + k_b)^2 + \Delta\omega^2} \right\} \quad \text{Eq.3-3}$$

$$R_2 = \frac{P_a}{T_{2a}} + \frac{P_b}{T_{2b} + k_b^{-1}} \quad \text{Eq.3-4}$$

showing that for long TEs the relaxation rate increases with the exchange rate and with the magnetic field strength (Figure 3-1A and B), and also with the difference in chemical shifts (Eq.3-3), while at short echo times (Eq.3-4) the R_2 is independent of the field strength.

Differences in regimes should be taken into account considering the ratio between the chemical exchange rate and the difference in the chemical shifts between the two spin populations for each of the two k_b analyzed. In the case of $k_b=300\text{s}^{-1}$ (Figure 3-1A), slow exchange regime ($k_b \ll \Delta\omega$) with the mid-point at $TE^{-1}=\Delta\omega/2$ is effective for magnetic fields $\geq 80\text{MHz}$, while a transition between slow and fast exchange regimes can be observed for $B_0 > 100\text{MHz}$. For this value of k_b , no fast exchange regime condition is observed for the TE and B_0 ranges investigated. In the case of a higher exchange rate with $k_b=1000\text{s}^{-1}$ (Fig. 1B) the fast exchange regime ($k_b \gg \Delta\omega$) with the mid-point at $TE^{-1}=k_b/2$ is only effective for magnetic fields $\leq 80\text{MHz}$. Where k_b is 300s^{-1} or 1000s^{-1} , the dispersion curves at fields below and over 80MHz correspond to an intermediate regime where k_b is close to $\Delta\omega$.

For $k_b=300s^{-1}$ (Figure 3-1A), in the pulse spacing range from 0.1ms to 20ms R_2 increases only slightly, from 0.94 to $1.04s^{-1}$ (T_2 1.06 and 0.96s) at 8MHz, while it markedly increases from 0.94 to $1.51s^{-1}$ (T_2 1.06 and 0.66s) and from 0.94 to $3.50s^{-1}$ (T_2 1.06 and 0.29s) at 20 and 60MHz respectively. This effect is pronounced by increasing k_b from 300 to $1000s^{-1}$ (Figure 3-1B).

It should be pointed out that a significant variation in R_2 can be observed (Figure 3-1) even for mid field strengths and for the range of small TE variations observed in MRI experiments (6.5 to 20ms) because the conditions of the long TE limit which depend on the ratio $k_b/\Delta\omega$ are not reached. A transition of the system between slow and fast exchange regimes makes it complex to analyze the impact of magnetic field on R_2 dispersion effects. Interestingly, in the range of MRI TE values (6.5-20ms), for $k_b=300s^{-1}$ (Figure 3-1A), the strongest relative variation in R_2 occurs at 60MHz (about 25%) while it is relatively low at 100 and 200MHz (~5%). For $k_b=1000s^{-1}$ (Figure 3-1B), the strongest variation in R_2 also occurs at 60MHz while, unlike the previous case, it is very similar for 80 and 100MHz. As might be expected, for the echo time range used in TD-NMR relaxometry (0.1-6ms), the relative increase in R_2 with echo time is modulated by the magnetic field. Note that for a moderate magnetic field of 1.5T (60MHz), the variation in TE between 0.1 and 2ms induces an increase in R_2 of around 30%, reaching up to 60% for TE>3ms. The condition of the short TE limit is reached for TE<0.1ms for all cases, except for 200MHz and $k_b=1000s^{-1}$.

3.4.3. EFFECTS OF TEMPERATURE

Figure 3-2 depicts the complex impact of temperature (5-40°C) on the relaxation rate for a 20g/L glucose solution and neutral pH at 20, 60 and 100MHz and for different echo times (1, 6.5 and 14ms).

At 20MHz, the relationship between T_2 and the inverse of temperature is linear for the three TEs studied with only slight differences between the slopes. It corresponds to a fast exchange regime across the whole temperature range. At 60MHz, the relationship between T_2 and $1/T$ is strongly impacted by the TE. T_2 varies linearly with $1/T$ for TE of 6.5 and 14ms between 40 and 25°C, but was almost constant for lower temperatures. At 100MHz, for TE of 6.5 and 14ms, T_2 decreased with $1/T$ until about 20°C, and increased for lower temperatures. For TE=1ms, at both 60 and 100Mz, T_2 has a poor sensitivity to temperature across the full range of temperatures investigated.

This singular behavior is due to the fact that in the temperature range analyzed, for TE=1ms the exchange regime changes from slow (5°C) to intermediate (40°C), as TE is respectively short and long comparing to $1/k_b$. The similar T_2 values for TE=6.5ms and TE=14ms at high temperatures at both 60 and 100MHz is explained by the long TE limit (Eq.3-3). In fact, the increase in k_b with the temperature causes the midpoint of the dispersion curve to shift to higher TE^{-1} values (Figure 3-1B) and, consequently, to a widening of the plateau corresponding to the long echo times. For pH different from neutral, T_2 significantly increases and the relationship between T_2 and the inverse of temperature changes as can be observed for 60MHz and TE=6.5ms. Indeed, for pH=6(8), T_2 varies with temperature as is observed for pure liquids under Arrhenius's law [37], due to the strong increase in k_b leading to the fast exchange regime.

3.4.4. IMAGING EXPERIMENT AT 1.5T

This section describes the effects of chemical exchange on transverse relaxation parameters obtained experimentally using a MRI system operating at 1.5T (63.3MHz), representative of mid-strength magnetic field imagers and incorporating all the constraints associated with scanner specifications (inhomogeneities of B_1 and B_0 , imperfect refocusing pulses etc.). The experimental data were fitted using the Carver Richards model.

The transverse relaxation rates of pure water, fructose and glucose solutions measured at 8°C and at different echo times (6.5 to 20ms) are reported in Figure 3-3.

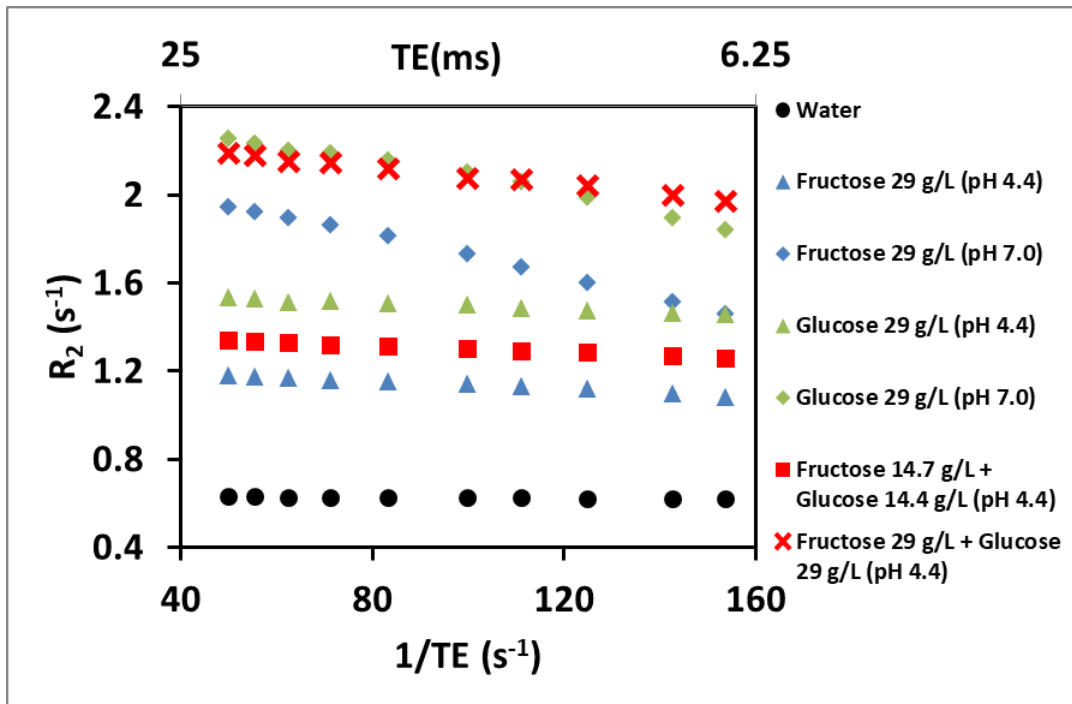


Figure 3-3: Transverse relaxation dispersion (6.5 – 20ms) for 29 g/L glucose (◆- pH 7; ▲- pH 4.4), fructose (◆- pH 7; ▲- pH 4.4) and pH 4.4 fructose + glucose (■-29g/L total; ✕-58g/L total) solutions and pure water (●) observed by MRI at 1.5T (63MHz) with a MSE sequence (TE=6.5ms TR=10s, 256 echoes) at 8°C.

The relaxation rate of water very slightly decreased with the echo time (less than 2% between 6.5 and 20ms). This can be attributed to several T_2 -reducing phenomena, caused by the diffusion of water molecules in the imaging gradients and RF pulse imperfections, which, in turn depend on TE in a complex way [87]. The mean magnetic field gradients caused by the inhomogeneities of the static magnetic field, intrinsic to the MRI system or produced by experimental device susceptibility were estimated experimentally at about 0.05mT/m. According to [88], this value is too low to impact significantly R_2 observed (less than 2.5×10^{-5} % of the T_2 value measured). R_2 of glucose and fructose solutions was modulated by TE where the pH was neutral, but varied only slightly for an acid pH (4.4). This difference in dispersion curves was due to the increase in k_b when the pH moves away from neutral (Eq.3-2). Where pH was acid, the midpoint value of the dispersion curves shifted to shorter echo times, and the plateau corresponding to the long echo times was reached more quickly [37]. At the same concentration level, R_2 of the glucose solution was higher than that of the fructose solution due to the greater chemical shift difference between the solute and water protons, in agreement with the numerical simulations shown in *Figure 3-8*. The experimental data also confirmed the strong effect of pH on the relaxation rates of glucose and fructose

solutions due to variations in k_b . For example, a decrease in pH from 7.0 to 4.4 induces a 32% decrease in R_2 (2.25 to $1.53s^{-1}$) in the case of the glucose solutions at $TE=20ms$. Note that a 50:50 solution of glucose and fructose at pH 4.4 (58g/L) had almost the same R_2 values as a glucose solution at half the concentration (29 g/L) with a neutral pH, confirming experimentally that variations in pH can considerably reduce the expected effects of sugar concentration on relaxation rates. Further, R_2 of the 50:50 fructose and glucose solution with a concentration of 29g/L at $pH=4.4$ was equal to the weighted R_2 average of the two pure sugar solutions at the same concentration and pH. The dependence of R_2 on temperature (8-32°C) for TEs of 6.5 and 20ms is illustrated in *Figure 3-4*.

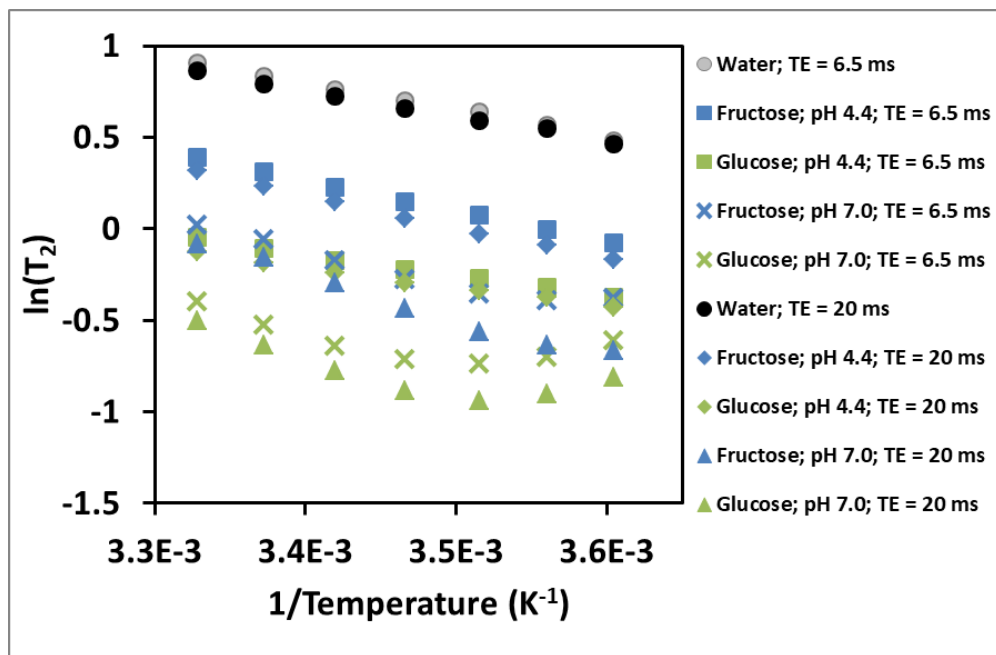


Figure 3-4: Transverse relaxation for glucose 29 g/L (✕- pH 7; ■-pH 4.4) and fructose (✕-pH 7; ■- pH 4.4) aqueous solutions and pure water (●), observed by MRI at 1.5T (63MHz) with a MSE sequence (TR=10s, 256 echoes) at 8°C. For the sugar solutions, (✕) and (■) symbols correspond to TE=6.5ms, (◆) and (▲) symbols correspond to TE=20ms. For water, grey and black symbols correspond to TE=6.5ms and TE=20ms respectively.

Accordingly to *Figure 3-3*, TE had slight effect on R_2 for pure water or for solutions with an acid pH, resulting in almost the same linear relationship between T_2 and inverse temperature. Conversely, for sugar solutions at neutral pH, this relationship was complex, with the decrease in T_2 with the temperature rise from 5 to 20°C, as predicted by the simulation (*Figure 3-2*). Note that the same R_2 was measured for different temperatures, as shown for glucose at 8 and 24°C.

Figure 3-5A and B show the experimental and fitted dispersion curves of 29g/L fructose and glucose pH-neutral aqueous solutions respectively, at 8, 12, 15, 20, 24 and 32°C.

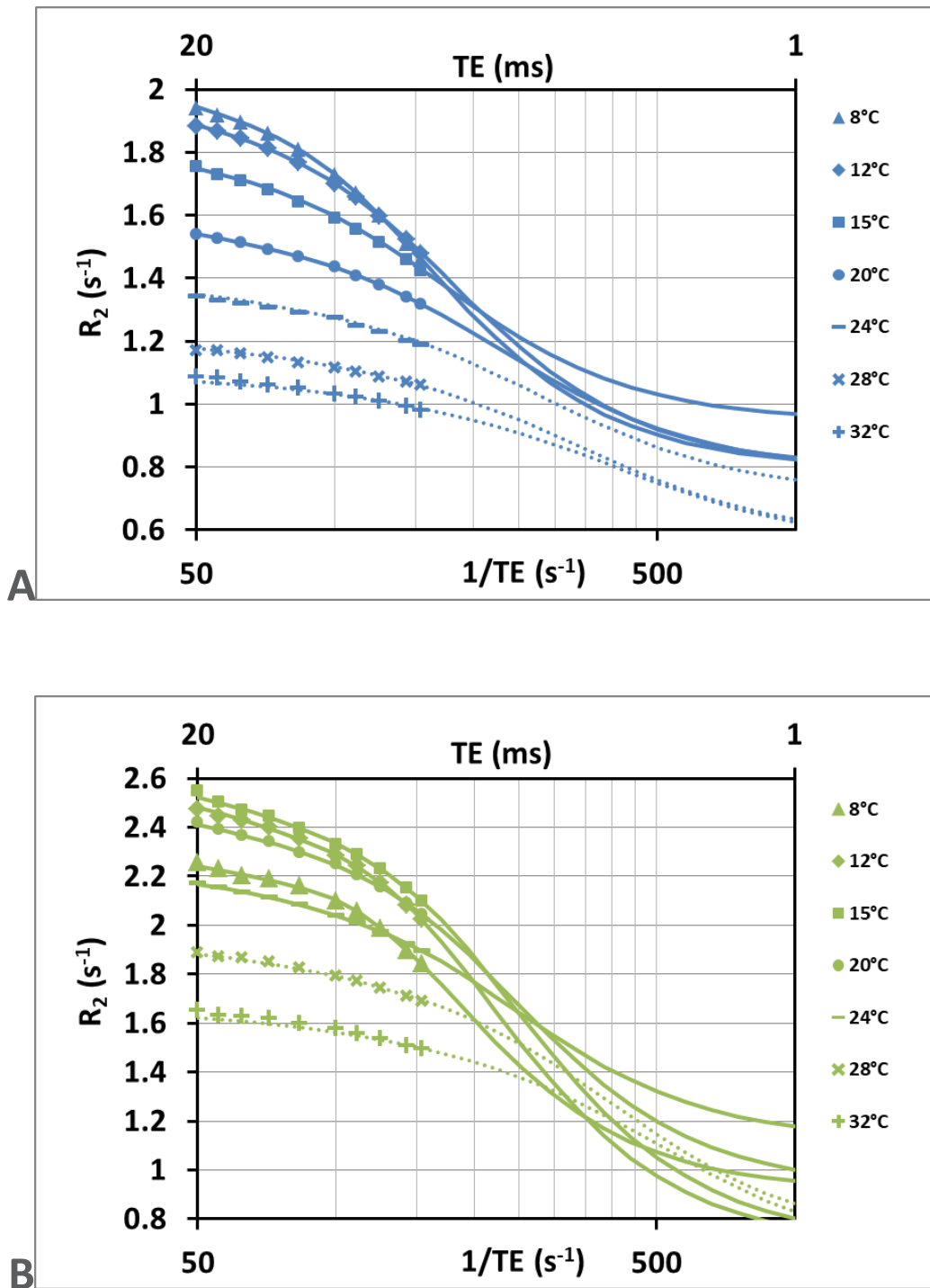


Figure 3-5: A – Transverse relaxation dispersion curves for 29g/L fructose (A) and glucose (B) aqueous solutions at neutral pH, observed by MRI at 1.5T (63MHz) with MSE sequence (TE=6.5ms, TR=10s, 256 echoes) at 8 (▲), 12 (◆), 15 (■), 20 (●), 24 (◐), 28 (✱) and 32°C (⊕) °C. Solid lines are least square fits of the Carver-Richard model (Appendix A) to the experimental data (symbols) and dashed lines are extrapolations. For fitting, P_0 of fructose (A) and glucose (B) was fixed at 8.8×10^{-3} and 8.2×10^{-3} , respectively.

Since k_b varied with temperature and $\Delta\omega$ remained almost unchanged, the different exchange conditions were observed for both solutions. As temperature increased, the mid-point of the dispersion curves shifted toward higher TE^{-1} values due to the increase in k_b , resulting in decrease in variations in R_2 for the range of the TE analyzed. Moreover, due to the changes in the chemical exchange regime, the dispersion curves intersected for several values of TE, particularly in the case of the glucose solution that has a higher chemical shift than fructose. Consequently, depending on the TE used, the same or very closed R_2 values were measured at different temperatures. These results provide experimental evidence that chemical exchange effects on relaxation time of low-concentrated sugar solutions are significant in the narrow range of echo times accessible through MR imaging at a moderated field of 1.5T.

Estimation of the Carver-Richards parameters was possible for temperatures up to 20 and 24°C for fructose and glucose respectively. At higher temperatures, slight variations in R_2 prevented an accurate fit of the dispersion curves. At 8°C, estimated P_b values were 8.8×10^{-3} and 8.2×10^{-3} for fructose and glucose respectively. The slight deviation of the P_b from its theoretical value (7.6×10^{-3}) can be explained by the assumptions that exchange rates and chemical shifts were the same for all exchangeable protons of the sugar molecule that were adopted. For higher temperatures, P_b was fixed at the values obtained at 8°C, in order to reduce the number of variables and thereby allow a more accurate fit. The estimated exchange rates, chemical shifts and T_{2b} at different temperatures are reported in *Tableau 3-1*.

Tableau 3-1: Values of k_b , $\Delta\omega$ and T_{2b} extracted from the fits of the Carver-Richard model presented in Fig. 5 A and B (fructose and glucose at 29g/L), except for the values marked with an asterisk (*) which were obtained by extrapolation.

Exchange Rate (K_b) (s^{-1})			Chemical shift difference (ppm)		T_{2b} (s)	
Temperature (°C)	Fructose	Glucose	Fructose	Glucose	Fructose	Glucose
8.2	346 ± 32	297 ± 9	0.86 ± 0.04	1.23 ± 0.02	0.047 ± 0.014	0.025 ± 0.002
11.7	430 ± 55	467 ± 23	0.85 ± 0.03	1.28 ± 0.01	0.037 ± 0.015	0.066 ± 0.015
15.4	404 ± 68	555 ± 36	0.75 ± 0.02	1.32 ± 0.01	0.019 ± 0.005	0.046 ± 0.013
19.6	645 ± 396	537 ± 61	0.74 ± 0.27	1.24 ± 0.01	0.029 ± 0.043	0.018 ± 0.003
23.6	830*	568 ± 66	0.72*	1.06 ± 0.02	0.035*	0.011 ± 0.002
27.8	1050*	1175*	0.75*	1.2*	0.065*	0.03*
31.9	1275*	1550*	0.75*	1.2*	0.06*	0.035*

The values of the chemical shift and k_b estimated from Carver Richard model were consistent with both the simulation and the literature [83, 89]. T_{2b} was the parameter with the highest estimate uncertainty, consistent with the fact that the variation in T_{2b} with temperature under Arrhenius's law [23] was rarely verified [40, 85, 90]. For $T > 20^\circ\text{C}$ for fructose and $T > 24^\circ\text{C}$ for glucose, k_b values were extrapolated following Eyring's law (Eq.3-1) by slightly varying the values of the other parameters ($\Delta\omega$ and T_{2b}) around the mean values obtained from the adjustments at lower temperatures. A linear relationship between the exchange rate and the temperature was observed (Figure 3-6), according to what was expected from Eyring's relation (Eq.3-1) and confirming the suitability of the estimated parameters. Moreover, the k_b values obtained by adjustment and extrapolation are of the same order of magnitude as the values previously reported for these sugar concentrations and temperatures [23, 36].

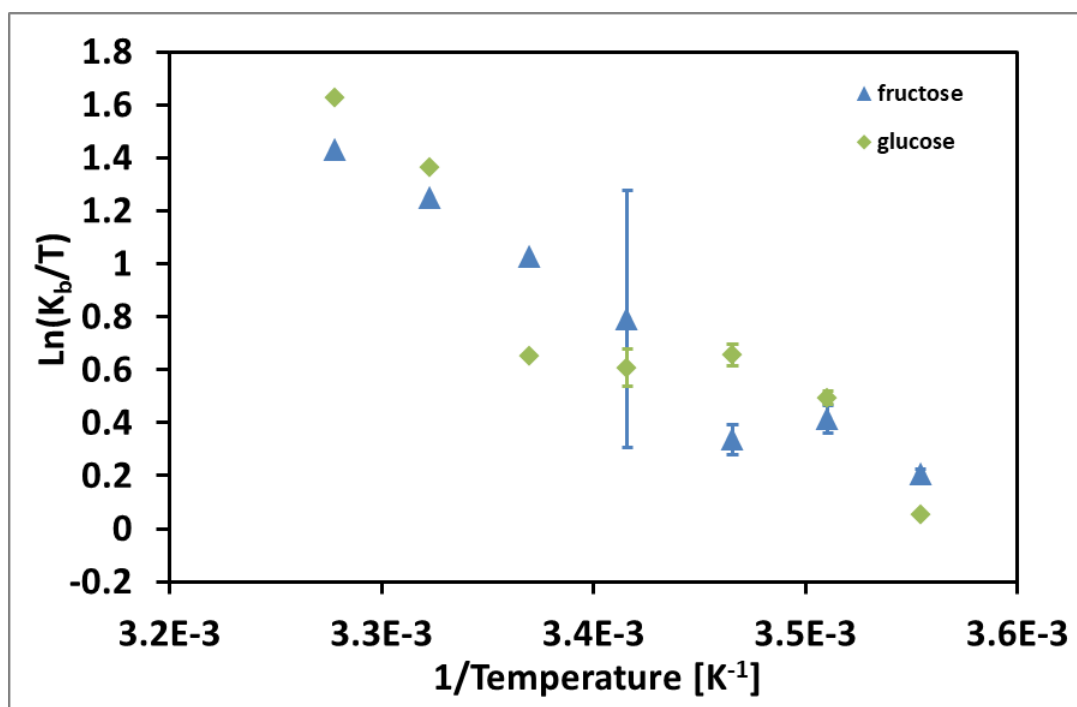


Figure 3-6: Relationship between the exchange rate k_b and the temperature (8 - 20°C) for 29g/L glucose (◆) and fructose (▲) aqueous solutions at neutral pH. Exchange rate values were extracted from the fits of the Carver-Richard model presented in Fig. 5.

In conclusion, we have shown that the relaxation times of low-concentrate aqueous sugar solutions modeling the vacuolar water in fruit cells can be strongly modulated by the experimental conditions (echo time, magnetic field strength, temperature) as a result of chemical exchange, even for low and mid magnetic field strengths and for a narrow echo time range. This makes the interpretation of the evolution of bulk relaxation times during physical processes highly complex. We therefore recommend that all these variables should be taken into account before an interpretation of NMR/MRI relaxation time experiments is put forward and before comparison of results obtained under different experimental conditions. Indeed, it is clear that relaxation time measurements should be interpreted following detailed analysis of all possible parameters involved in the chemical exchange mechanism. It is important to note that several effects such as background gradients due to B_0 inhomogeneities, imaging gradients or RF pulse imperfections (for MRI) will lead to deviations of dispersion curves from ideality. In the present case, these phenomena had a minor impact in the range of the echo time studied. The effects of magnetic susceptibility on the impact of TE on relaxation times, which are known to be highly significant at high field strengths, should also be taken into account. Additionally to the impact of the chemical exchange of water protons with macromolecules on bulk relaxation, the proton exchanges with solid surfaces should also be taken into account, as well as the possible variations in diffusional exchanges of water molecules between compartments that can result from the process under investigation. Nevertheless, we have demonstrated that the appropriate choice of experimental conditions offers a powerful strategy to maximize the effects of sugar concentration or pH variations on transverse relaxation in vacuolar liquid, enabling monitoring of these parameters. Moreover, in order to increase the level of information on the water status in plant tissues accessible by TD NMR and MRI, T_2 measurements can be coupled with other parameters such as the self-diffusion coefficient. This could be useful to the analysis of processes such as fruit ripening where changes occur simultaneously in water content and in the chemical reactions that involve the transformation of sugars and organic acids (potentially associated with changes in pH). The combination of relaxation and diffusion measurements provides a way to monitor these effects independently.

3.5.1. EFFECTS OF SUGAR CONCENTRATION

Figure 3-7 illustrates the impact of the solute concentration (5 to 60g/L, water content from 99.5 to 94.1%) on the relaxation rate for different magnetic field strengths (20, 60 and 100MHz) and echo times (1, 6.5 and 14ms).

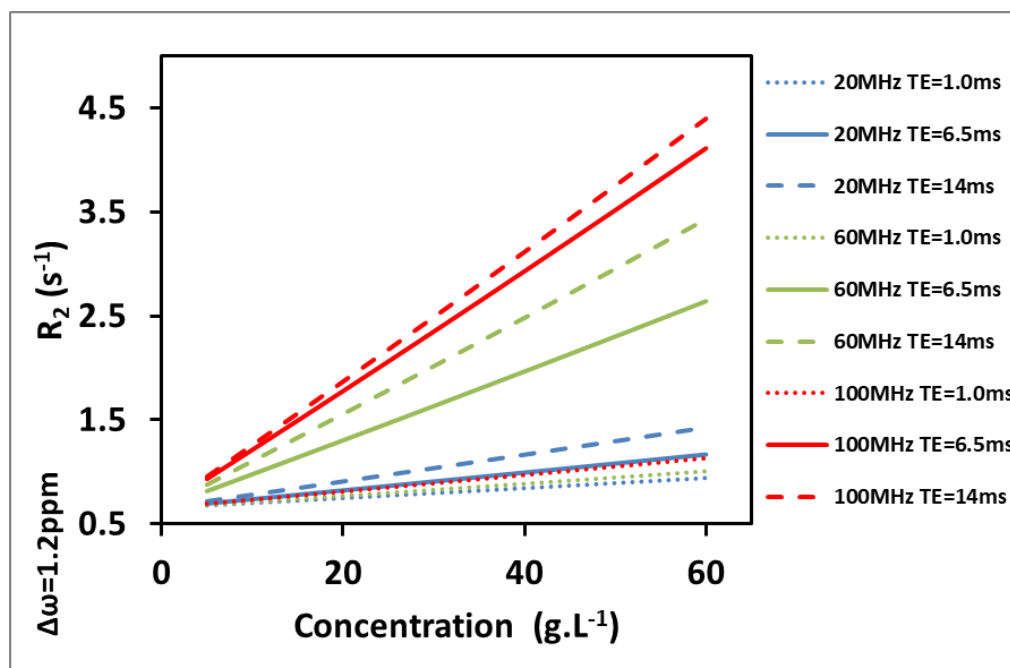


Figure 3-7: R_2 dependence on sugar concentration (0–60g/L; glucose model) for different field strengths (20, 60 and 100MHz) and echo times (1.0, 6.5 and 14ms). Parameter values: $T_{2a}=1.5s$; $k_b=300s^{-1}$; $\Delta\omega=1.2ppm$; $T_{2b}=50ms$. Between TE=1 and TE=14ms, the slope of the linear relationship increases from 0.0048 to $0.0129Lg^{-1}s^{-1}$ (167%) at 20MHz, from 0.0059 to $0.0464Lg^{-1}s^{-1}$ (686%) at 60MHz and from 0.0080 to $0.0626Lg^{-1}s^{-1}$ (683%) at 100MHz. At TE=6.5ms, for a concentration of 5g/L, R_2 varies from $0.695s^{-1}$ at 20MHz to $0.932s^{-1}$ (T_2 1.439 and 1.073s) at 100MHz. For a concentration of 40g/L and the same experimental conditions, the difference is greater, as R_2 increases from 0.993 to $2.930s^{-1}$ (T_2 1.007 and 0.341s).

The simulated data correspond to glucose at low temperature (5°C) and neutral pH, with $k_b=300s^{-1}$; which correspond to an intermediate exchange regime. As expected for the dilute systems, the relation between $1/T_2$ and concentration is linear [34]. The slope of the linear relationship, and therefore the sensitivity of the R_2 to the solution concentration, depends on both magnetic field strength and TE.

The sensitivity of R_2 to concentration and B_0 at long echo times ($1/TE \ll k_b/2$) is consistent with the Swift-Connick equations (Eq.3-3 and Eq.3-4), demonstrating that in these conditions R_2 depends upon $\Delta\omega$ in addition to T_{2a} , k_b , P_b and T_{2b} . The present results show that the sensitivity of R_2 to concentration significantly increases with B_0 even for low and mid magnetic field strength and for very low concentration range, supplementing the results obtained at high magnetic field strengths [46].

3.5.2. EFFECTS OF SUGAR STRUCTURE

Because the effects of chemical exchange on the transverse relaxation of the homogeneous sugar solution depend on the absolute frequency difference between water and sugar protons (expressed in $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$), dephasing is modulated by both magnetic field strength and sugar type. This is illustrated in Figure 3-8 by the particular case of fructose and glucose that are characterized by the same molar mass and the same number of exchangeable protons, but the protons in the hydroxyl groups shifted by 0.8 and 1.2ppm from water protons [83, 89] respectively.

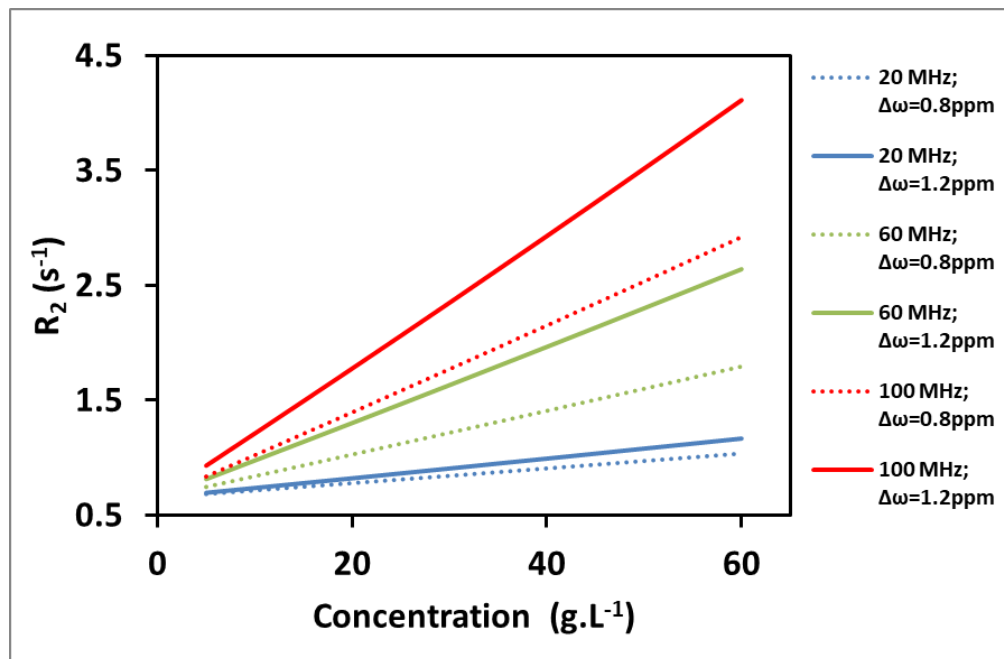


Figure 3-8: R_2 dependence on sugar concentration (0–60g/L) for different field strengths (20, 60 and 100MHz) and $TE=6.5\text{ms}$ for different sugar types. Parameter values: $T_{2a}=1.5\text{s}$; $k_b=300\text{s}^{-1}$; $\Delta\omega=0.8$ and 1.2ppm (fructose and glucose model respectively); $T_{2b}=50\text{ms}$. The slope of the linear relationship increases from 0.0064 at 20MHz to $0.0379\text{Lg}^{-1}\text{s}^{-1}$ at 100MHz (492%) for fructose, and from 0.0086 to $0.0578\text{Lg}^{-1}\text{s}^{-1}$ (572%) for glucose. At 60MHz for a concentration of 10g/L , the difference in R_2 between the two sugars is 0.14s^{-1} (16%) while it is 0.27s^{-1} (27%) for a concentration of 20g/L .

At 20MHz, variations in relaxation times are only slightly impacted by the nature of the sugar, as the effect of the chemical shift is weak. This effect increases with the magnetic field strength leading in large differences in R_2 values for glucose and fructose solutions for the highest concentrations analyzed at 60 and 100MHz. The impact of sugar type on R_2 should therefore be taken into account when the processes involving sugar transformations (i. e. sucrose hydrolysis) such as fruit development and ripening are studied.

3.5.3. EFFECTS OF PH

Figure 3-9 depicts the impact of the pH value on the relationship between R_2 and solute concentrations at 20, 60 and 100MHz, simulated using Eq.3-2. The autoprotolysis constant for water (K_w) was fixed at 10^{-14} [91] and the constants k_1 and k_2 were fixed at $6 \times 10^8 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [37, 92].

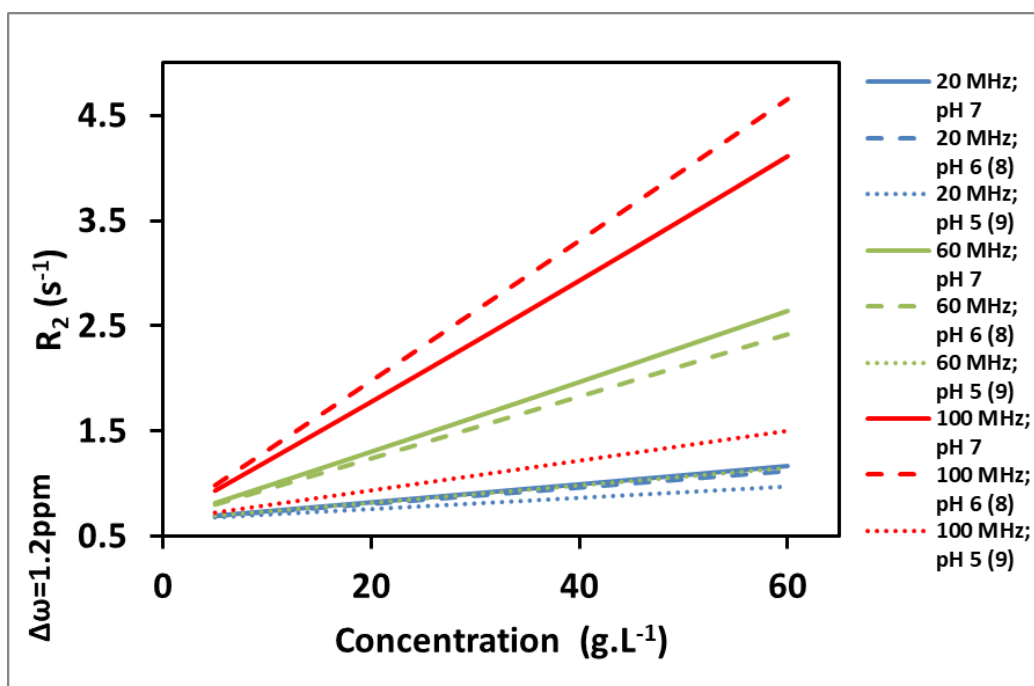


Figure 3-9: R_2 dependence on sugar concentration (0–60g/L; glucose model) for different field strengths (20, 60 and 100MHz) and TE=6.5 ms for pH=5, 6(8) and 7(9). Parameter values: $T_{2a}=1.5\text{s}$; $k_b=14943, 1509$ and 300s^{-1} for pH=5, 6(8) and 7(9) respectively; $\Delta\omega=1.2\text{ppm}$; $T_{2b}=50\text{ms}$. At 20MHz, the slope of the linear relationships is almost similar at pH=7 and pH=6 ($0.0086\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ and $0.0078\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ respectively) and decreases to $0.0053\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ at pH=5. At 60MHz, a slight decrease in the slope is observed between pH 7 ($0.0332\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), and pH 6-8 ($0.0294\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), while the slope decreases markedly for pH 5-9 ($0.0083\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). At 100MHz, the slope moderately increases when the pH change from 7 to 6 or 8, while it decreases markedly when the pH change from 7 to 5 or 9. Note that the curves corresponding to 60MHz (pH 5); 20MHz (pH6) and 20MHz (pH7) are superimposed.

It can be observed that the sensitivity of R_2 to concentration strongly depend on the pH. At 60MHz and for a very low solute concentration of 20g/L, a variation in pH from 7 to 5 leads to a large decrease in R_2 from 1.303 to $0.817s^{-1}$ (T_2 of 767 and 1224ms), which at neutral pH would require a decrease in concentration from 20 to 5g/L. This phenomenon is explained by the fact that when pH values move away from neutral, the value of k_b increases dramatically [37], leading in some cases to the transition between fast and slow exchange regimes. It is therefore essential to control the pH value when relaxation times are used to estimate changes in solute concentration in plant tissues.

**CHAPITRE 4: MRI STUDY OF TEMPERATURE
DEPENDENCE OF MULTI-EXPONENTIAL
TRANSVERSE RELAXATION TIMES IN TOMATO**

4.1. RÉSUMÉ

Les effets de la température sur le signal de relaxation transverse multi-exponentielle des tissus du fruit ont été étudiés par IRM à 1,5 T, en prenant la tomate comme modèle de fruit charnu. L'importance relative du phénomène d'échanges chimiques sur la relaxation a été étudiée en comparant les résultats obtenus sur des tomates avec ceux obtenus sur des solutions aqueuses modélisant le contenu vacuolaire.

L'étude approfondie des effets des échanges chimiques sur la distribution des temps de relaxation transversale a été réalisée en ajustant les données expérimentales sur le modèle de Carver-Richards.

À des températures comprises entre 7 et 32°C, le signal de relaxation transversale dans le péricarpe de la tomate était multi-exponentiel, cela démontre en partie, que les membranes cellulaires ont limité les échanges diffusifs de molécules d'eau entre les différents compartiments cellulaires.

De manière inattendue, le passage de deux à trois composantes du signal de relaxation transversale s'est produit entre 7 et 15°C pour la plupart des fruits analysés. En outre, le temps de relaxation associé aux vacuoles du péricarpe de tomate est resté relativement stable avec la température, contrairement à ce qui était attendu, en prenant seulement en compte les effets des échanges chimiques.

Nous en avons donc déduit que d'autres mécanismes devaient compenser l'augmentation attendue du T_2 avec la température dans le péricarpe de tomate. Une hypothèse proposée pour l'interprétation de ces résultats, serait l'augmentation des effets de relaxation de surface avec la température.

4.2. INTRODUCTION

Time Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) and Magnetic Resonance Imaging (MRI) are unique in being able to provide information about subcellular water compartmentation in plant tissues [93]. Indeed, multi-exponential transverse relaxation decay, measured using TD-NMR or MRI optimal signal sampling [87], is able to reflect the behaviour of water protons in different environments. In plant tissues, it has generally been assumed that these proton pools correspond to water in main cell compartments i.e the vacuole, cytoplasm and wall and extracellular spaces. The bulk T_2 relaxation for each water pool largely depends on its composition (solute type and concentration) via the chemical exchanges of water protons with protons from solute molecules. The T_2 of water in confined cell compartments depends on the bulk T_2 and on the exchanges of water protons with protons from non-soluble molecules such as proteins in bilayer phospholipid membranes that act as relaxing solid surfaces. Further, the diffusion of water molecules between neighboring cell compartments separated by cell membranes partially averages their NMR signals in the way that depends on the differences in their bulk relaxation times, water self-diffusion coefficients, compartment sizes and the water permeability of the membranes [94].

A number of studies have set out to explain these complex relaxation mechanisms and thereby characterize water distribution in plant tissues undergoing physiological changes [67, 75, 95] or subject to processing [96]. T_2 relaxation has been successfully used to investigate membrane damage in tissues undergoing thermal processing with a resultant loss of cell compartmentalization and tissue integrity [39, 61, 68]. However, the variations of relaxation time with temperature have been discussed only rarely with regard to the temperature range preceding phase change or cell denaturation [39, 68]. Several relaxation mechanisms cause these variations with temperature. Changes in tissue temperature lead to variations in bulk T_2 for the water in cell compartments via both the dipole–dipole interactions of water molecules and chemical exchange mechanisms, as both molecular mobility and the rates of the chemical exchanges between water and solute protons are strongly dependent on temperature. Consequently, the relationship between bulk T_2 and the inverse of temperature, although linear for pure liquids, becomes complex in plant cells [97].

In addition, temperature affects surface relaxation as well as the water self-diffusion coefficient and permeability, thus influencing the degree to which the relaxation signal is partially averaged.

In view of the phenomena described above, a number of difficulties can arise in interpreting changes in the transverse relaxation signal during the heating or cooling of plant tissues. Nevertheless, an accurate interpretation of the NMR relaxation signal would be of considerable interest if we are to benefit fully from MRI and TD-NMR approaches to the investigation of thermal transformations and heat stress in plant samples at the subcellular scale. In order to address this issue, the present study has set out to enhance understanding of the specific effects of temperature on multi-exponential transverse relaxation parameters.

The experiments were performed on tomato, as a representative model for fleshy fruits, and were carried out within the temperature range that causes no damage to membranes (7-32°C) [98, 99]. These temperatures also correspond to those experienced by plants in their natural environment. MRI relaxometry was used to measure relaxation times at different temperatures, by heating fruits directly in the MRI device. The MRI approach was chosen rather than TD-NMR, as this imaging mode is more suited to the investigation of whole fruit processing.

The relative importance of diffusional and chemical exchange mechanisms was investigated by comparing the relaxation times measured in tomatoes with those of aqueous solutions created to simulate the vacuolar water pool, in accordance with the chemical composition of the pericarp tissue.

4.3. MATERIALS AND METHODS

4.3.1. PLANT MATERIAL AND SOLUTIONS

Two separate MRI experiments (1 and 2) were conducted on tomato fruits in order to obtain consolidated data. For each experiment, five ripe tomatoes were purchased from the local market and used without any processing. In Experiment 2, following MRI measurements, the liquid phases were extracted by centrifugation from the outer pericarps sampled from each tomato. High pressure liquid chromatography (HPLC) analysis was then performed on the samples thus obtained to identify and quantify sugars and organic acids. The main solutes identified were glucose, fructose, citrate and malate at 13.7 ± 1.6 , 14.0 ± 0.7 , 3.7 ± 0.6 and 0.3 ± 0.2 g.L⁻¹ respectively and the pH value was 4.3 ± 0.1 (mean value \pm standard deviation obtained from four tomatoes).

A solution that simulated the vacuolar solution was then prepared in accordance with the mean chemical composition and pH of the tomatoes by assuming that most of the sugars and acids found in the extracted liquid phase corresponded to those present in the vacuole. A second solution was prepared with the same chemical composition but with a neutral pH to help the investigation of the effects of chemical exchanges on the transverse relaxation signal.

These two solutions were obtained by dissolving sugars and acids in ultra-pure water (resistivity at 25°C: 18.2 MΩ.cm, Synergy UV Water Purification System, Merck, Darmstadt, Germany) and by adding sodium azide (2.0 mmol/L) as the antibacterial agent while stirring constantly. Sugars, organic and hydrochloric acids and sodium hydroxide were purchased from Sigma Chemicals and used as found without further purification.

Five tubes (3.4 cm in diameter and 7.0 cm in height) were each filled with 50 ml of solution (acid solution - 1 tube, neutral solution - 1 tube and pure water - 3 tubes). They were placed on a specially-designed base with 2mm-thick neoprene pads between the tubes and the base to prevent vibrations during MRI measurements.

4.3.2. MAGNETIC RESONANCE IMAGING

4.3.2.1. Image acquisition

MRI measurements were performed on a 1.5T scanner (Magnetom Avanto, Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a circular polarized head array RF coil. Tomatoes were placed in a temperature regulating device installed inside the RF coil. Five optical fibers connected to a data logger (UMI8, FISO Technologies Inc., Canada) were inserted into an additional tomato placed outside the Field of View (FOV), to monitor the temperature of the samples during the MRI experiment (Experiments 1 and 2).

The experiment on the aqueous solutions was performed using the same MRI protocol, while the optical fibers were immersed in a beaker of water placed outside the FOV and close to the tubes. The MRI acquisition began when the temperature reached a steady value (about 1h30min after starting the temperature regulation). Prior to the experiment, the uncertainty of the temperature measurement was estimated to be less than 1°C. Transverse relaxation parameters were measured in the tomatoes and the solutions using a multi-spin echo (MSE) sequence [64] with 256 echoes where the first echo (TE) was equal to the inter-echo spacing. Pixel bandwidth was 260Hz and one scan was performed. Repetition time (TR) was fixed at 20s in order to prevent T_1 -weighting.

The Apparent Diffusion Coefficient (ADC) was estimated using the pulse field gradient spin echo (PFGSE) sequence with TE=91ms, TR=5s, diffusion time $\Delta=60$ ms and diffusion gradient duration $\delta=20$ ms. Eight diffusion gradient strengths were applied, resulting in 8 b values ($b=\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta-\delta/3)$, with γ gyromagnetic ratio) ranging from 0 to 1197 s.mm⁻². Geometrical parameters were kept constant for both T_2 and ADC measurements.

Transverse sections at the fruit's mid-height were imaged with a 5mm slice thickness, 152x152 pixels matrix and FOV = 152x152mm². T_2 and ADC measurements of tomatoes were carried out at four temperatures set at 7, 15, 24 and 32°C and 8, 15, 23 and 31°C in Experiments 1 and 2 respectively. T_2 and ADC measurements of the solutions and the water were performed at temperatures of 9, 13, 17, 20, 27 and 35°C.

The repeatability of the T_2 measurements, including the acquisition and image processing steps, was estimated in Experiment 2 by acquiring three scans at TE=6.5ms with separate scanner settings (automatic frequency and transmitter attenuation/gain adjustments and shimming) at 8°C. Standard deviation for the solutions and the water was less than 0.4% of the T_2 value measured in each tube. The repeatability of the diffusion measurements, including the acquisition and image processing steps, was tested at 20°C for the water and the solutions. The variation was less than 0.15% of the ADC value measured in each tube.

The impact of the vacuolar water pool composition on its bulk T_2 value, via the chemical exchange of protons from water and solutes, was investigated by measuring dispersion curves (T_2 measurements at different TE values) in the tomatoes and solutions.

For the tomatoes, TE was set at 6.5, 8, 10, 12 and 20ms and at 6.5, 12 and 20ms in Experiments 1 and 2 respectively, with a TR of 20s and a single scan. Measurements were carried out at the lowest temperature analyzed (8 and 7°C for Experiments 1 and 2). For the solutions, dispersion curves were measured at 8, 12, 15, 20, 24, 28 and 32°C with TE set at 6.5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 and 20ms, with a TR of 10s and a single scan.

4.3.2.2. Image processing

Analysis focused on outer pericarp tissue as this is the less porous part of the tomato fruit [55], meaning that the effects of the diffusion of water in the random magnetic field gradients generated by the susceptibility-induced inhomogeneities that result from the presence of gas in intercellular spaces could be disregarded. Regions of interest (ROI) were selected manually using ImageJ software (National Institutes of Health, USA) on a homogeneous region of the outer pericarp of each fruit (*Figure 4-1*).

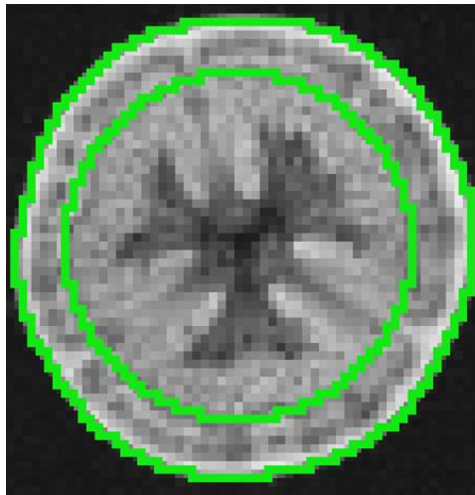


Figure 4-1: T2-weighted (TE=793ms) image of tomato acquired with an MSE sequence (TR=20s, pixel size=1.2²mm² and slice thickness=5mm). The region of interest (ROI, outlined in green) was selected manually for each fruit from a homogeneous region of the outer pericarp.

The mean signals of the ROIs were used to estimate T_2 . The signal to noise ratio (SNR) was computed by dividing the ratio of the mean signal of the ROI and the mean background signal by $\sqrt{\frac{\pi}{2}}$. Only data characterized by SNR greater than 7 were retained for the estimation of relaxation parameters, making it possible to assume a zero-mean Gaussian noise distribution in the magnitude images at all echo times. Because variations in temperature can lead to changes in the relaxation decay model for tomato pericarp, estimation of the relaxation parameters was carried out in Scilab software using a Maximum Entropy Method (MEM) [79], which provides a continuous distribution of relaxation times without assumptions concerning their number.

The relaxation parameters and ADC of the solutions and water were estimated by fitting a mono-exponential T_2 and ADC maps on pixel-to pixel bases with Scilab software, using the Levenberg–Marquardt algorithm for chi-square minimization.

The same procedure was used to compute ADC maps of the tomatoes. Parameter mean values were then estimated for the ROIs. For the tomatoes, ROIs were identical to those selected for the estimation of the multi-exponential T_2 (Figure 4-1), while for the solutions, they corresponded to tube sections.

4.4. RESULTS AND DISCUSSION

4.4.1. CHANGES WITH TEMPERATURE IN T_2 DISTRIBUTIONS OF TOMATO PERICARP

The transverse relaxation time distributions for pericarp tissue in the four tomatoes analyzed in Experiment 1 are shown in Figure 4-2.

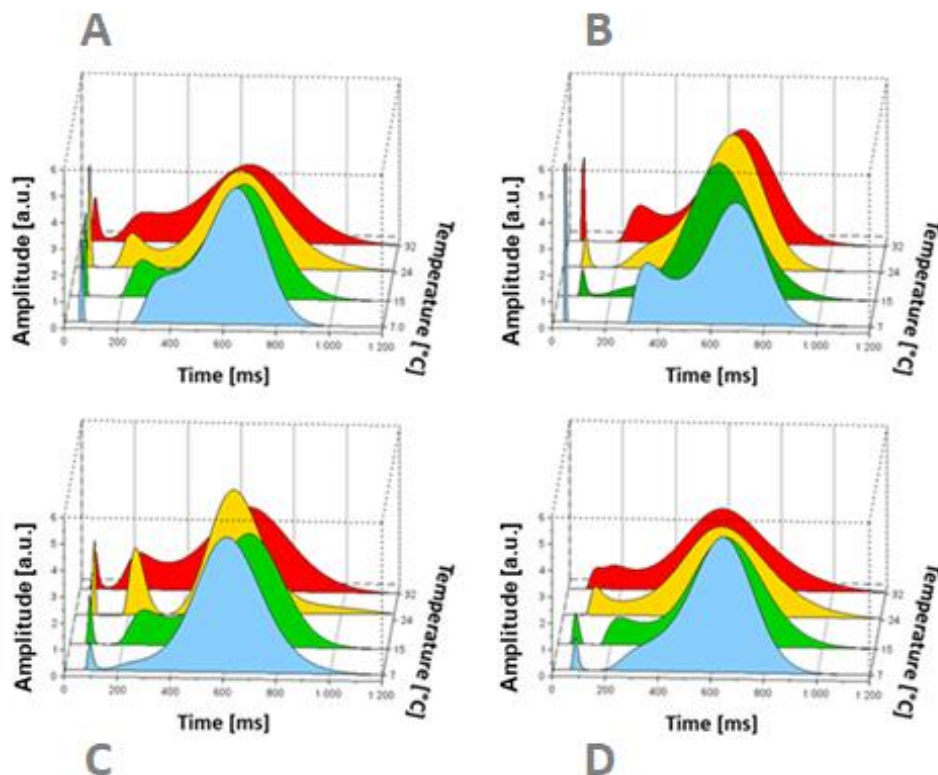


Figure 4-2: Transverse relaxation time distribution in tomato pericarp at different temperatures (7°C , 15°C , 24°C , 32°C), calculated from MSE images ($\text{TR}=20\text{s}$, $\text{TE}=6.5\text{ms}$, pixel size= 1.2^2mm^2 and slice thickness= 5mm). The data shown correspond to the tomatoes numbered A to D (left to right and top to bottom) analyzed in Experiment 1.

The distributions were described by two or three relaxation peaks depending on the temperature. At 7°C , two peaks could be distinguished for three of the four tomatoes analyzed in Experiment 1 (Figure 4-2A, C and D), with the shortest T_2 peaks centered at the value range of 50-90ms and representing a few percent of the total signal intensity while the most probable values for a second relatively large T_2 peak (the T_2 for the highest intensity in T_2 distribution) lay between 650 and 700ms.

Note that asymmetry was observed in the second T_2 peak of the first and fourth tomatoes (*Figure 4-2A and D*). For one tomato (*Figure 4-2B*), an additional peak relaxing at about 350ms and representing about 18% of the signal could be distinguished.

As the temperature increased, the first peak remained almost unchanged while two other peaks (with long and medium T_2 values) were observed for all tomatoes. At 15°C, the second T_2 peak was centered at ~250ms and represented about 10% of the signal, while the longest T_2 peak was centered at ~650ms and represented about 88% of the signal.

According to the literature [58], it could be assumed that the shortest, medium and longest T_2 peaks (T_{2S} , T_{2M} and T_{2L} , respectively) correspond to water located in the cell wall/extracellular water, cytoplasm and vacuolar compartments, respectively.

In most tomatoes studied, from 15 to 24°C, T_{2M} decreased in value and remained unchanged until 32°C, while T_{2L} remained almost unchanged throughout the temperature range studied. A similar trend in T_2 distribution evolution with temperature was observed in Experiment 2 (*Supplementary Material 1, Figure 4-8*), except that T_{2L} increased between 8 and 15°C and that the decrease in T_{2M} occurred from 23 to 31°C.

The most probable T_2 values and the peak areas taken from the relaxation time spectra for the tomatoes analyzed in Experiments 1 (*Figure 4-2*) and *Figure 4-8* (*Supplementary Material 1*) are set out in *Tableau 4-1*.

In *Figure 4-3*, the sum of the signal intensities of the relaxation peaks measured in the tomato pericarp $I(tot)$ is presented as a function of the inverse of temperature.

Tableau 4-1: Mean T_2 values and corresponding relative intensities for four tomatoes measured using the MSE sequence (TR=20s, TE=6.5ms, 256 echoes, pixel size=1.2²mm² and slice thickness=5mm) and calculated by the MEM algorithm. Values are the means \pm SD of the four tomatoes in each experiment at 7(8), 15, 24(23), and 32(31) $^{\circ}$ C respectively.

Temperature ($^{\circ}$ C)	I_{OS} (%)	T_{2S} (ms)	I_{OM} (%)	T_{2M} (ms)	I_{OL} (%)	T_{2L} (ms)
EXPERIMENT 1						
7	2 \pm 1	62 \pm 22	-	-	98 \pm 1	626 \pm 18
15	3 \pm 1	48 \pm 15	9 \pm 3	255 \pm 18	88 \pm 2	646 \pm 21
24	3 \pm 1	51 \pm 14	12 \pm 3	224 \pm 20	85 \pm 5	629 \pm 41
32	4 \pm 2	47 \pm 7	14 \pm 4	233 \pm 13	82 \pm 5	640 \pm 18
EXPERIMENT 2						
8	3 \pm 1	73 \pm 7	-	-	97 \pm 1	593 \pm 31
15	3 \pm 1	71 \pm 4	12 \pm 4	315 \pm 22	85 \pm 5	675 \pm 8
23	4 \pm 1	60 \pm 7	19 \pm 5	321 \pm 40	77 \pm 6	680 \pm 31
31	4 \pm 1	47 \pm 12	14 \pm 4	226 \pm 35	82 \pm 5	629 \pm 51

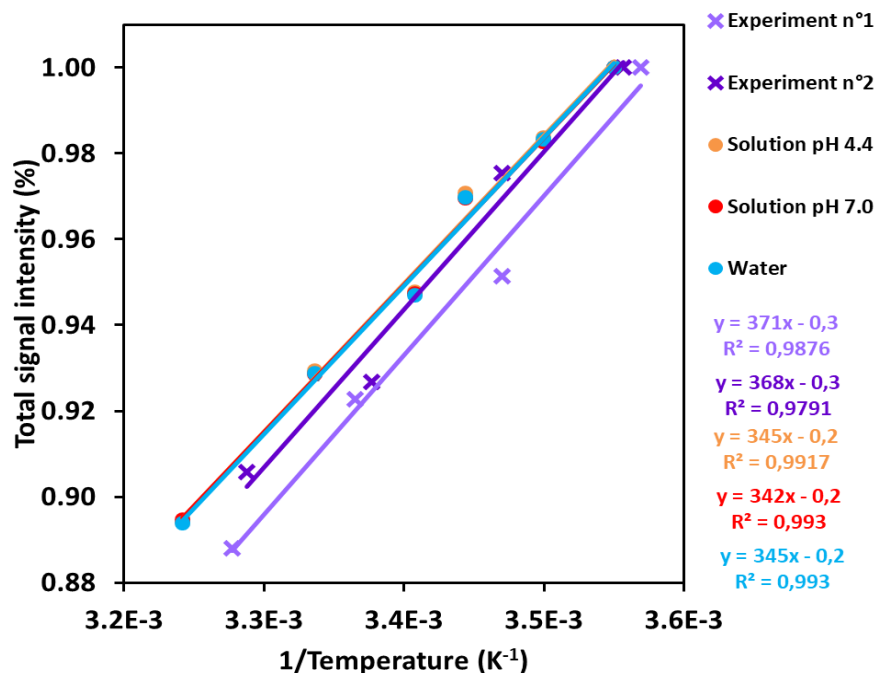


Figure 4-3: Total signal intensity versus inverse of temperature measured using the MSE sequence (TR=20s, TE=6.5ms, 256 echoes, pixel size=1.2²mm² and slice thickness=5mm) in tomato pericarp (\times Experiment 1, \times Experiment 2), acid (\bullet pH 4.4) and neutral (\bullet pH 7.0) solutions and water (\bullet). For each temperature, the signal was normalized using its value at 7(8) $^{\circ}$ C as a reference.

$I_{\text{(tot)}}$ decreased linearly with the temperature as did the signals for the pure water and acid and neutral solutions, thus obeying Curie's law. This clearly demonstrated that the same numbers of protons were contributing to the signal and that T_1 -weighting did not occur or was negligible in the temperature range studied. Therefore, given that in both experiments the relative intensity of the first peak remained almost unchanged, it can be deduced that the longest T_2 peak observed at the lowest temperatures (7/8°C) split into two peaks with temperature rise.

4.4.2. EVALUATION OF THE EFFECTS OF TEMPERATURE ON BULK TRANSVERSE RELAXATION

If chemical exchanges between protons from water and solute molecules are the sole factor considered, the T_2 of the vacuolar liquid in tomato pericarp can be expected to increase linearly with temperature, in accordance with observations for sugar solutions at acidic pH under similar experimental conditions [97]. However, in the case of compartmented water pools such as those found in plant cells, it is important to consider not only the exchanges of water protons with the protons from solutes, but also the exchanges of water protons with the protons from molecules within the membrane (phospholipids and proteins) as well as diffusional exchanges of water molecules between neighboring compartments within the cell.

In order to distinguish the contribution made by the effects of chemical exchanges on the bulk T_2 of the vacuolar liquid from those of other phenomena, the T_2 of the vacuolar liquid was compared to the T_2 of the simple systems (pure water and acid and neutral solutions with a chemical composition similar to that of the vacuolar liquid). The effects of chemical exchanges on transverse relaxation were assessed by measuring the dispersion curves (relaxation rate ($R_2=1/T_2$) as a function of $1/TE$) at 8°C, as shown in *Figure 4-4*.

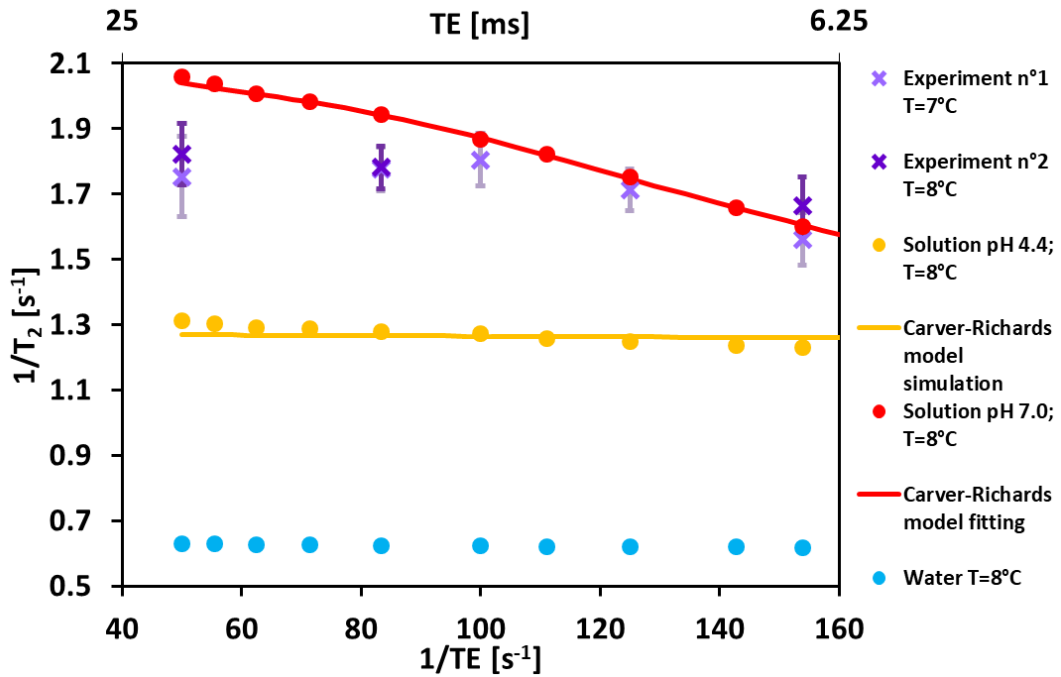


Figure 4-4: Transverse relaxation dispersion curves for the longest T_2 component (T_{2L}) measured in the tomato pericarp (✕Experiment 1, ✕Experiment 2), the acid (●pH 4.4) and neutral (●pH 7.0) solutions, and water (●). T_2 relaxation times were measured using the MSE sequence (TR=20s, pixel size=1.2²mm² and slice thickness=5mm). Solid lines show least square fits of the Carver-Richard model to the experimental data.

It can be observed that for the vacuolar liquid, R_{2L} as a function of TE remained nearly unchanged in both Experiments 1 and 2. R_2 for the acid solution, formulated to simulate the vacuolar liquid, also remained almost unchanged with the increase in TE. By contrast, a marked decrease in R_2 was observed as TE increased from 6.5 to 20ms in the case of the solution with the same composition as that of the acid solution, but with a neutral pH. Last, as expected, the observed variations in water R_{2s} were also insignificant (less than 2%) and were attributed to the diffusion of water molecules in the background and imaging gradients and to RF pulse imperfections.

As these T_2 -reducing contributions were considered to be similar in all systems studied, they were excluded from the analysis. Although the dispersion curves measured in tomato pericarp and the acid solution showed similar trends, the relaxation rate of the acid solution was lower (~20%) than that of the vacuolar water pool.

This difference was expected because 1) the vacuolar liquid did not contain only the soluble components found by the HPLC but probably also amino acids and paramagnetic ions and 2) in addition to the proton exchanges between water and solute molecules, surface relaxation of water in contact with phospholipids and proteins from the tonoplast is thought to contribute to vacuolar relaxation. Given the similar dispersion behavior of the slowest-relaxing component measured in the tomato pericarp and the acid solution, it was assumed that the acid solution provided a sufficiently accurate simulation of the bulk vacuolar water for further analysis to be carried out.

Additional insight into the chemical exchange effects on relaxation time distributions was gained by fitting the experimental dispersion curves measured for the solutions with the two-site expression of the Carver and Richards model [27]. Here, the following approximations were used: glucose and fructose were modelled as a single sugar and citrate and malate were disregarded due to their relatively low concentrations. It is true that, for a single sugar solution, each hydroxyl group does not necessarily have the same electronic environment and therefore the same chemical shift value. However, it has been demonstrated that $1/T_2$ of the 50:50 fructose and glucose solution is equal to the weighted $1/T_2$ average of the two pure sugar solutions at the same concentration and pH [97].

The fitting was carried out by using the Levenberg-Marquardt algorithm in the Datafit function of the Scilab 5 software, as described in [97]. The fit was performed for the solution at neutral pH with the following outputs: solute exchangeable proton population (P_b), rate of proton exchange between water and solutes (k_b), difference in chemical shift between the protons from water and solutes ($\Delta\omega$, in ppm), and transverse relaxation time of solute protons (T_{2b}), with the water relaxation time fixed at the value recorded for 8°C (1.61s).

The parameters estimated from the fitting were: $P_b=0.0088$, $k_b=256s^{-1}$, $\Delta\omega=1.0ppm$ and $T_{2b}=21ms$. The values of P_b and k_b were in accordance with those obtained for fructose and glucose solutions at the same concentration, temperature and pH [97], while $\Delta\omega$ corresponded to the mean of glucose and fructose chemical shifts (0.8 and 1.2ppm respectively). As a result, for the relatively low chemical exchange rate of the neutral pH solution, the limit of the long echo times ($1/TE \ll k_b/2$) was not reached and, consequently, T_2 varied significantly between $TE=6.5ms$ and $TE=20ms$ (from 625ms to 486ms).

This indicates that, under these experimental conditions, the chemical exchanges had a significant impact on the relaxation times. As shown in Supplementary Data (*Figure 4-9*), T_2 varied between TEs of 6.5ms and 20ms in the whole temperature range analyzed.

In the case of the acid solution, it was not possible to fit the Carver and Richards's model on the experimental data, as variations in R_2 with $1/TE$ were too low. However, for P_b , $\Delta\omega$ and T_{2b} set to the values obtained from the fit corresponding to the neutral solution data, the best correspondence between the model and experimental data was found for k_b of about $6000s^{-1}$. The increase in the exchange rate when the pH deviated from the neutral value, was expected in line with [37].

For the solution at acid pH, the almost constant R_2 between TEs of 6.5 and 20ms was explained by the considerably higher exchange rate when compared with the difference in the chemical shifts between water and solute protons ($k_b \gg \delta\omega$, with $\delta\omega = 2\pi B_0 \Delta\omega$, where B_0 is the main magnetic field strength), thus indicating the fast exchange regime. Across the range of echo times explored, the long echo time limit was reached ($1/TE \ll k_b$) leading to an R_2 plateau. Since k_b increases with temperature according to Eyring's law, the long echo time limit was reached for all temperatures above $8^\circ C$ and, consequently, an R_2 plateau was observed across the whole temperature range (*Supplementary data 2, Figure 4-9*).

Figure 4-5 shows the evolution of T_2 with the inverse of temperature for water and for the acid and neutral solutions, along with the longest T_2 peak associated with the vacuolar water compartments measured in the tomato pericarp (T_{2L}).

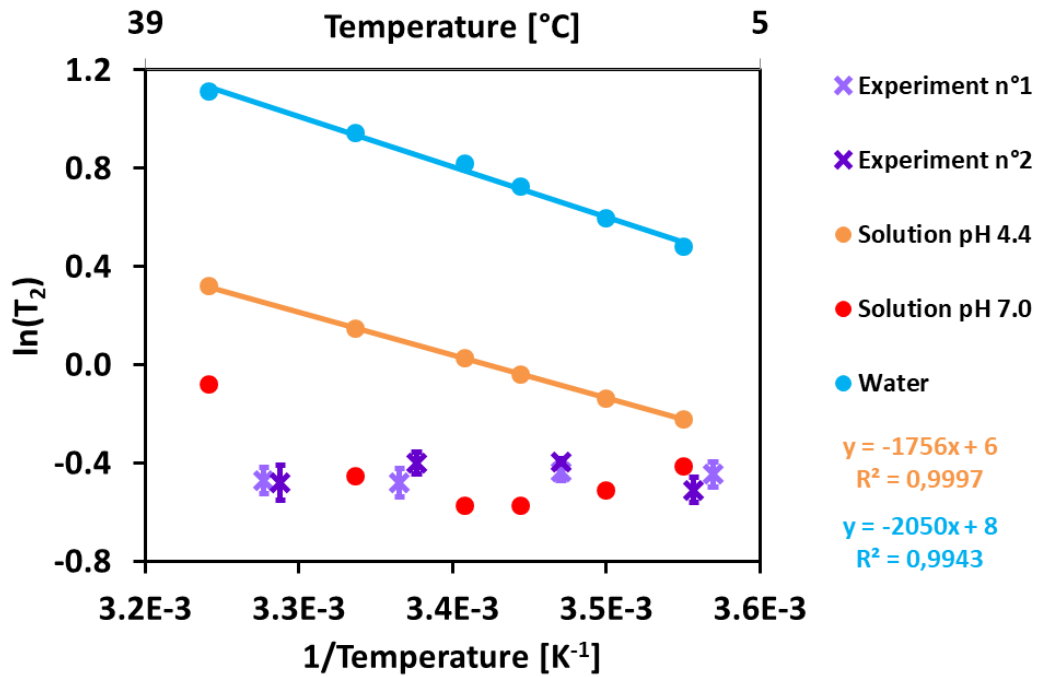


Figure 4-5: $\ln(T_2)$ versus temperature inverse for the longest T_2 component (T_{2L}) measured in the tomato pericarp (✕ Experiment 1, ✕ Experiment 2), in the acid (● pH4.4) and neutral (● pH7.0) solutions, and water (●). T_2 relaxation times were measured using the MSE sequence (TR=20s, pixel size=1.2²mm² and slice thickness=5mm).

The well-known linear relationship between $\ln(T_2)$ and the inverse of temperature (Arrhenius plot) was seen for pure water. This linear relationship was also observed for the acid solution, with a similar slope to that of the water, as expected in the case of the fast exchange regime [37, 97]. By contrast, the T_2 of the neutral solution varied with temperature in a complex way, decreasing with the temperature rise from 9 to 15°C and then increasing up to 35°C. This was attributed to the transition between intermediate and fast regimes at temperatures over 15°C resulting from the increase in exchange rate during heating, which was much more pronounced than the increase in $\Delta\omega$. As a result, the dispersion curves (*Supplementary data 2, Figure 4-9*) show a specific behavior.

For the vacuolar water pool in the tomato pericarp, T_{2L} remained stable in Experiment 1, while it increased only between 8 and 15°C in Experiment 2 (see *Tableau 4-1*). By comparing these results to those obtained from the acid solution, it could be deduced that additional mechanisms compensated for the expected increase in T_2 for the tomato pericarp.

4.4.3. APPARENT DIFFUSION COEFFICIENT

Figure 4-6 shows the ADC maps for tomatoes at different temperatures. At all temperatures, the outer pericarp appeared as a relatively homogeneous tissue.

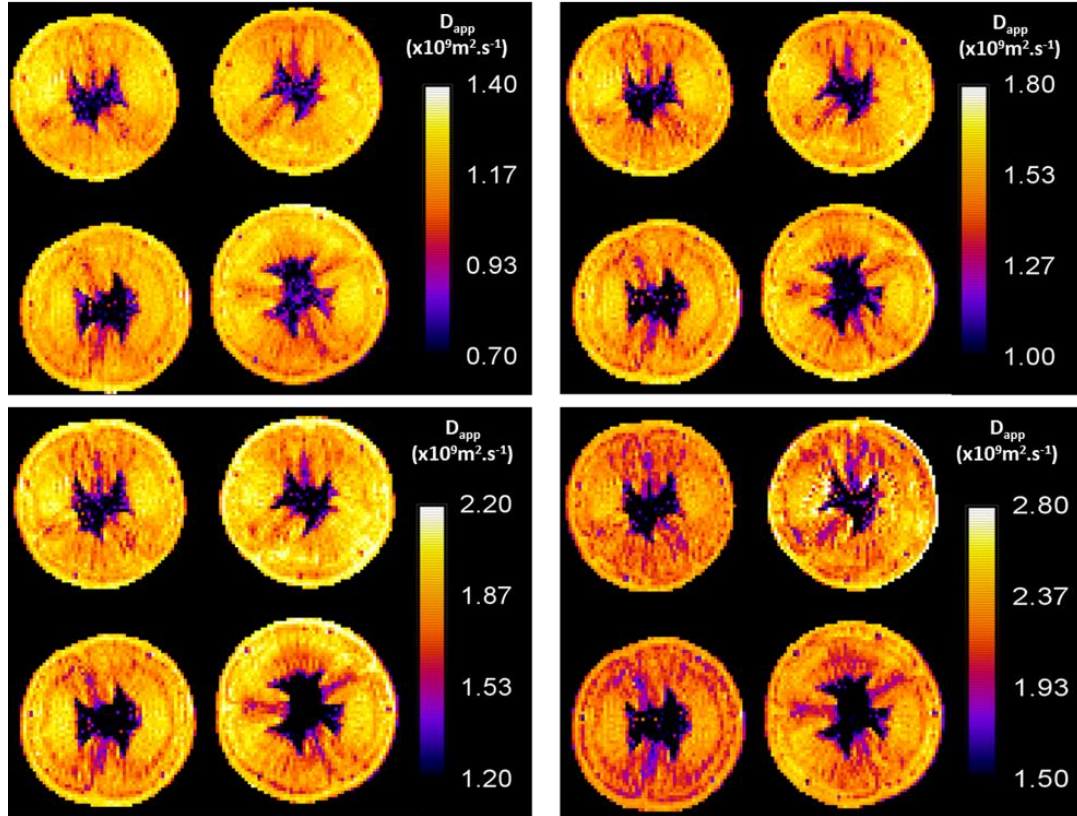


Figure 4-6: Apparent diffusion coefficient (ADC) maps calculated at 8, 15, 23 and 31°C (Experiment 2), from left to right and top to bottom respectively. ADC was estimated using the PFGSE sequence (pixel size=1.2²mm² and slice thickness=5mm) with TE=91ms, TR=5s, diffusion time Δ =60ms, diffusion gradient duration δ =20ms and 8 diffusion gradient strengths, resulting in b values ($b=\gamma^2G^2\delta^2(\Delta-\delta/3)$) ranging from 0 to 1197 s.mm⁻².

The placenta was easily distinguishable from other tomato tissues due to its lower ADC, while radial pericarp and locular tissues were discernible only on some tomatoes, resembling the observable features of the T₂-weighted images (Figure 4-1). The diffusion coefficients measured in the tomatoes, solutions and water all showed a similar relationship with temperature, resulting in an ADC that doubled in value between 7°C and 32°C for tomatoes and 9°C and 35°C for solutions and water.

Indeed, at the lowest temperatures analyzed, the ADC of the water, solutions and tomatoes was 1.44 ± 0.01 , $1.35 \times 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ and $1.17 \pm 0.01 \times 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ respectively (*Figure 4-7*), and reached $2.90 \pm 0.04 \times 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $2.72 \times 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ and $2.23 \pm 0.07 \times 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ respectively at the highest temperatures analyzed.

A possible explanation for the higher ADC values in the solutions compared with those of the tomato pericarp is provided by the fact that the ADC was computed from a mono-exponential model assuming a single component because the experimental conditions did not allow the extraction of a multi-exponential diffusion signal. The ADC would therefore correspond to the average apparent diffusion coefficients of the water in the main cell compartments, i. e. the vacuole and cytoplasm.

The cell wall/intercellular space water pool was not considered because of a significant T_2 weighting effect. The bias resulting from this approximation was estimated, taking into account the fact that at 20°C , the ADC of the vacuole and cytoplasm was about $1.9 \times 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ and $1.4 \times 10^{-9} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ respectively according to [100], and that these water pools represented, respectively, 80 and 20% of the total signal relaxing at 680 and 320ms (see experimental data from *Tableau 4-1*). By taking into account a non-negligible T_2 -weighting effect for $TE = 91\text{ms}$, the bias was estimated to about 7%.

The same slope was observed for the linear relationship between the ADC and temperatures for tomatoes, water and solutions (*Figure 4-7*).

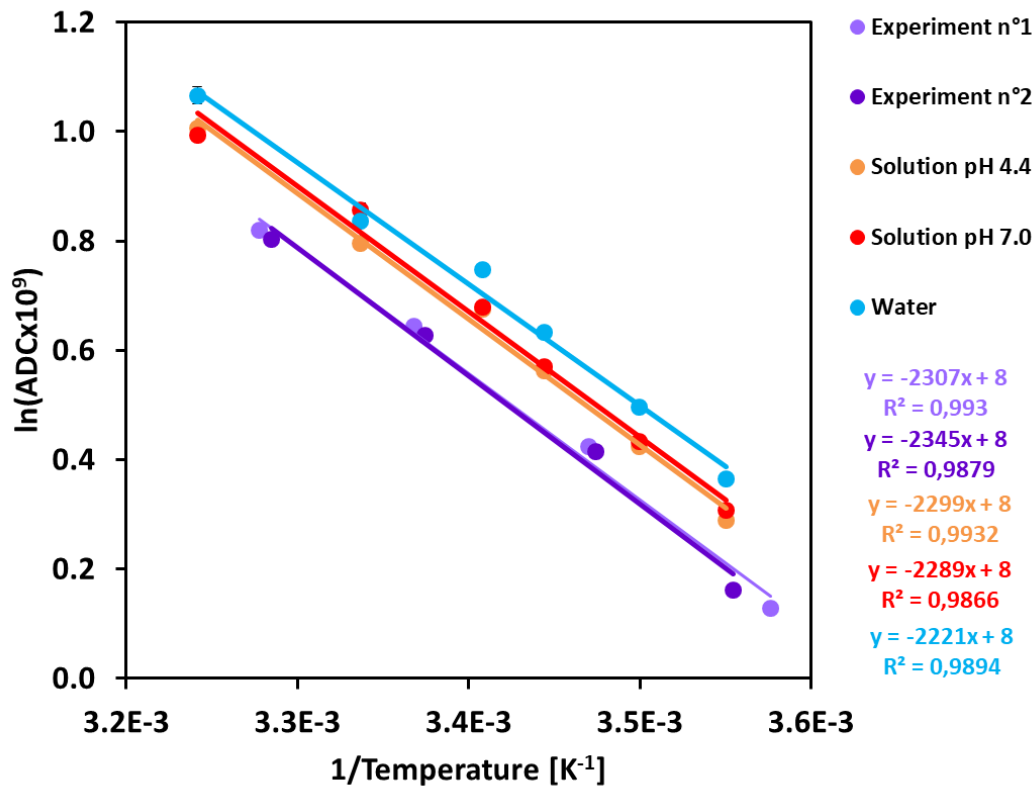


Figure 4-7: Apparent diffusion coefficient (ADC) versus temperature inverse for the tomato pericarp (●Experiment 1, ●Experiment 2), for the acid (●pH 4.4) and neutral (●pH 7.0) solutions and water (●). ADC was estimated using the PFGSE sequence (pixel size=1.2²mm² and slice thickness=5mm) with TE=91ms, TR=5s, diffusion time $\Delta=60$ ms, diffusion gradient duration $\delta=20$ ms and 8 diffusion gradient strengths, resulting in b values ($b=\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta-\delta/3)$) ranging from 0 to 1197 s.mm⁻².

This indicates that, at the relatively short observation time employed ($\Delta=60$ ms), a free diffusion regime was observed in which the time was not sufficiently long for all the water molecules to reach the compartment boundaries. The vacuolized cells of tomato pericarp are relatively large, with a shortest dimension of about 200 μ m and a length perpendicular to the cuticle that falls within a range of up to 600–700 μ m [101]. For the higher ADC measured (that of pure water at 32°C), the upper limit for restricted diffusion was 31 μ m, which was considerably lower than the smallest dimension of the tomato pericarp cells (200 μ m).

4.5. DISCUSSION

The multi-exponential transverse relaxation signal at all temperatures analyzed indicated that water exchange between components was slow or intermediate with respect to T_2 and that the cell membranes therefore acted as barriers, at least partially. Unexpectedly, the transition from two to three peaks in the T_2 distribution occurred between 7(8)°C and 15°C for most of the tomatoes analyzed. This differed from what had been observed in apple samples [39], where the number of T_2 peaks for temperatures between 5 and 22°C remained unchanged.

On the other hand, and in contrast to the T_2 of the acid solution simulating vacuolar bulk relaxation, T_{2L} (*Tableau 4-1, Figure 4-5*) remained stable with temperature (Experiment 1) or changed only between 8 and 15°C (Experiment 2). This means that the relationship between T_{2L} and temperature cannot be explained by the chemical exchanges between the water and the solutes dissolved in the vacuolar fluid.

One mechanism that might give rise to these unexpected results is surface relaxation. Indeed, additionally to the bulk T_2 , the observed T_2 for liquids in cell compartments depends on their interactions with the membranes. The degree of T_2 reduction depends on the surface to volume ratio of the compartment and the surface relaxivity of the membranes (ρ_2), which describes how effectively the membrane acts as a relaxation sink, whether through chemical exchanges between protons from water and from membrane macromolecules or through the impact of paramagnetic centers.

In order to determine the possible significance of surface relaxation, the smallest compartment dimension (r), diffusion coefficient (D) and membrane properties should be considered. If $D/r \gg \rho_2$, a system is assumed to be in a fast diffusion limit, making it possible for water molecules to rapidly explore the compartment space during the relaxation time. In other cases, where the compartments are very large or surface relaxation is extremely high ($D/r \ll \rho_2$), the slow diffusion regime is observed. Here, molecules near the pore surface relax too rapidly for molecules to be able to diffuse throughout the compartment and to average the relaxation times. In this case, a single compartment exhibits multi-exponential relaxation behavior.

It is possible for a particular situation to arise in the case of a fast diffusion limit where water molecules may cross the semi-permeable membranes between subcellular compartments and diffusive exchange then occurs, sometimes causing peaks to shift and the partial averaging of relaxation peaks [69].

Based on the ADC measurements (*Figure 4-5*) and considering the vacuole's smallest dimension $r=200\ \mu\text{m}$ [101], D/r can be estimated at 0.6 and $1.1 \times 10^{-5}\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ for 8° and 32°C , which is of the same order of magnitude as ρ_2 found in Quest and Cameron tomato parenchyma (0.5 and $1.1 \times 10^{-5}\text{ms}^{-1}$, respectively) [100] and as ρ_2 found in apple parenchyma ($1 \times 10^{-5}\text{ms}^{-1}$) [102]. This indicates that the fast diffusion regime holds inside the tomato pericarp's vacuole and that surface relaxation is effective.

The unexpected relationship between multi-exponential relaxation times and temperature could therefore be attributed to the changes in the relaxing properties of the membranes with temperature. Indeed, the characteristics of membrane proteins may be impacted by temperature, which would affect the chemical exchange between protons from proteins embedded in the phospholipid bilayer of the membranes and vacuole liquid, thus modifying the membrane sink NMR relaxation.

Temperature increase also modifies cell membrane lipid interactions [50] impacting cell membrane permeability and fluidity [51] and would therefore favor diffusive averaging between the neighboring intrinsic magnetizations. However, the changes in the relaxation model from bi- to tri-exponential between 8 and 15°C suggests that diffusive averaging of the intrinsic compartment magnetization is not a major effect. Indeed, as the ADC increases with temperature (*Figure 4-7*), peak separation is expected to be favored at low temperatures. However, further in-depth investigations would be necessary to test the effects of diffusive exchanges on relaxation time distribution.

A comparison of the results of the present experiment with the small number of studies from the literature addressing the dependence of relaxation time on temperature reveals the relationship between the multi exponential relaxation times and temperature to be complex [39, 68]. Indeed, divergent results have been reported in the literature.

Hills et al. [39] showed that an increase in the temperature of the apple parenchyma from 5°C to 22°C resulted in an increase in the T_2 of the vacuole liquid from 521 to 652ms. However, given the acid pH of apples [103] and the experimental conditions (TD-NMR, 100MHz, TE=0.4ms) favoring the fast exchange regime, more marked changes in T_2 with temperature might be expected [42]. In potato tubers [68], a decrease in T_2 measured by TD-NMR (23.2MHz, TE=0.3ms) was observed for both short and long components between 25 and 45°C, the long component decreasing from 450 to 375ms. This decrease in T_2 was interpreted as being caused by the increase in the exchange rate between the protons from water molecules and from hydroxyls in the starch.

It has been demonstrated that the relationship between T_2 and temperature is complex when there is a shift in chemical exchanges regime, defined by the ratio $k_b/\delta\omega$, from fast to slow regime [97]. However, at low field and for the relatively high temperature range analyzed in [68], it seems unlikely that the chemical exchange regime deviates from the fast regime as it might at high field.

In this study, the effects of temperature on relaxation times were evaluated using MR imaging, which enables further investigations into thermal transformations in fleshy fruits. Indeed, the imaging approach has the advantage of being non-invasive, and the follow-up to the experiment can be carried out using the same processing samples. In applying the conclusions to different experimental conditions, all variables relative to the tissues under investigations and the MRI experiment should be taken into account.

4.6. CONCLUSION

The present study has shown that the dependence of multi-exponential relaxation times on temperature is complex in compartmentalized structures such as the pericarp cells of fleshy fruits. Counter-intuitively, the increase in temperature made it possible to better distinguish the different T_2 components associated with cell compartments. The contributions of chemical exchange mechanisms to bulk transverse relaxation, analyzed by comparing the results obtained from tomatoes and from aqueous solutions simulating vacuolar liquid, did not explain the relationship between vacuolar T_2 and temperature. The hypotheses that a possible increase in surface relaxation effects might be caused either by chemical exchanges between protons from water molecules and solid membranes or by diffusive exchanges between compartments were discussed. The monitoring and understanding of the role of the temperature variations in the NMR signal has relevance for processing and outdoor measurements, as variations in plant temperature affecting the relaxation signal have the potential to induce interpretation errors.

4.7. SUPPLEMENTARY MATERIAL

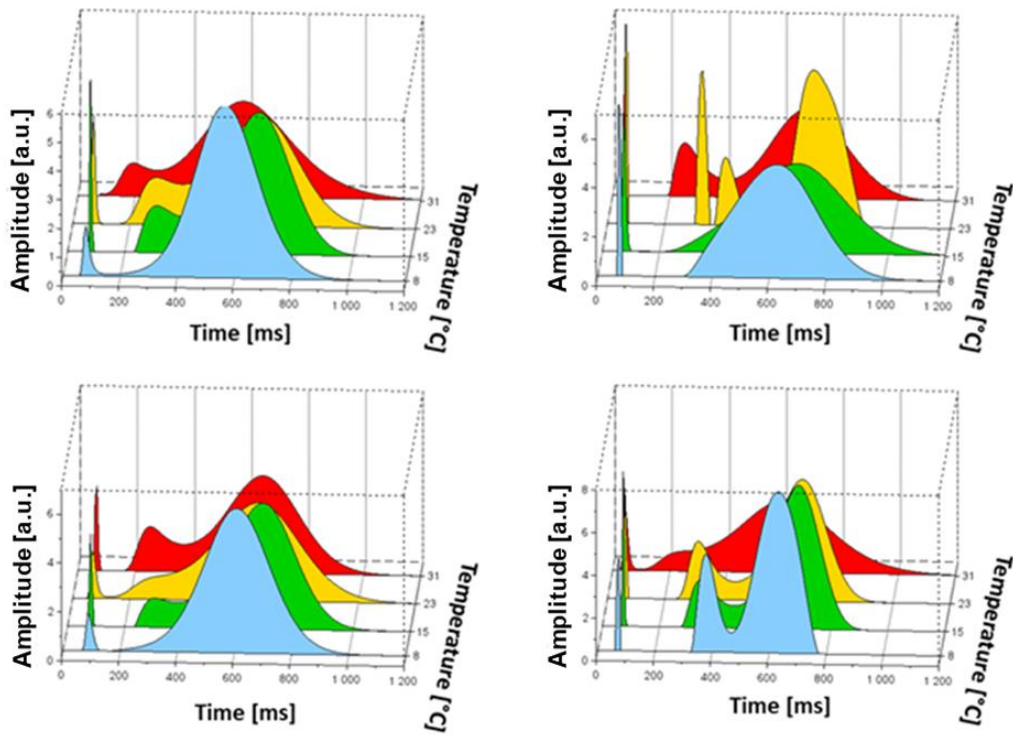


Figure 4-8: Supplementary Information 1: Transverse relaxation time distribution in the tomato pericarp at different temperatures (— 7°C, — 15°C, — 24°C, — 32°C), calculated from MSE images (TR=20s, TE=6.5ms, pixel size=1.2²mm² and slice thickness=5mm). The data shown correspond to the tomatoes numbered 1 - 4 (left to right and top to bottom) analyzed in Experiment 2.

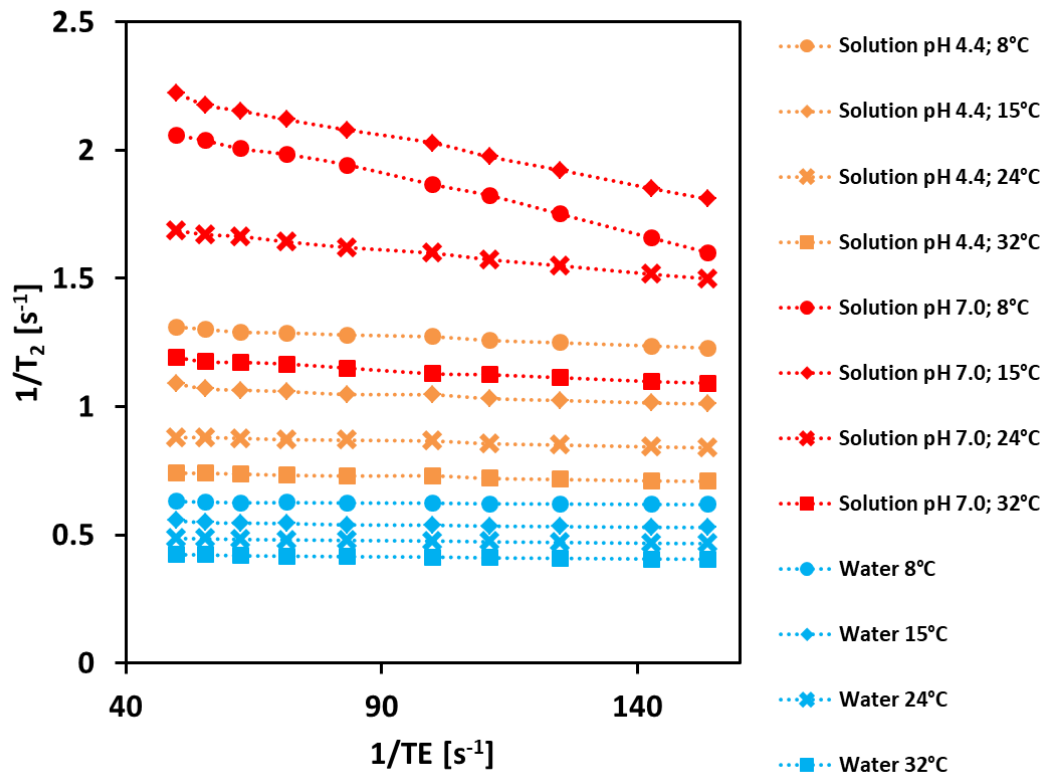


Figure 4-9: Supplementary Information 2: Transverse relaxation dispersion curves for the acid (orange symbols pH 4.4) and neutral (red symbols pH 7.0) solutions and for water (blue symbols) at ●8, ◆15, ✱24 and ■32°C. T_2 s were measured using the MSE sequence (TR=20s, TE=6.5ms, 256 echoes, pixel size=1.2²mm² and slice thickness=5mm). Solid lines show least square fits of the Carver-Richards model to the experimental data.

**CHAPITRE 5: ÉTUDE IRM DE L'IMPACT DE LA
DESHYDRATATION DE TISSUS DE TOMATE SUR
LES TEMPS DE RELAXATION TRANSVERSALE
MULTI-EXPONENTIELS**

5.1. INTRODUCTION

La perte en eau des tissus végétaux modifie de manière extrêmement complexe les paramètres de relaxation transversale multi-exponentielle, car elle impacte simultanément différents mécanismes physico-chimiques. En effet, la déshydratation entraîne des changements de la concentration en soluté du contenu vacuolaire et affecte ainsi le T_2 associé, via le phénomène des échanges chimiques, de façon dépendante de conditions de mesure comme décrit dans le chapitre 3. De plus, le rétrécissement des cellules provoqué par la perte en eau, impacte les phénomènes de relaxation de surface et des échanges diffusionnels des molécules d'eau entre les différents compartiments et donc leurs T_2 .

À cela s'ajoutent les modifications potentielles de la perméabilité membranaire, qui agiront également sur les échanges des molécules d'eau entre les compartiments. Finalement, la microporosité apparente, et par conséquent l'impact de la susceptibilité magnétique sur les paramètres de relaxation observés, peut être modifié par le séchage des tissus. Notons aussi que les récents résultats ont apportés un nouveau regard sur la relaxation de l'eau dans les tissus végétaux [61-63], démontrant la nécessité de prendre en compte l'hétérogénéité des cellules au sein du voxel dans l'interprétation du comportement multi-exponentiel de la relaxation, notamment au cours d'une transformation. Dans ce contexte, une meilleure compréhension de l'interprétation de la relaxation dans ces conditions de perte en eau est nécessaire. L'IRM présenterait alors une technique de choix pour caractériser les changements de structure et les transferts d'eau au niveau des compartiments hydriques des tissus, susceptibles d'impacter la texture du produit transformé par les procédés de déshydratation.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier les variations du signal de relaxation transversale lors d'un processus de déshydratation de la tomate, en considérant à la fois l'effet de la teneur en eau et des variations structurales des tissus. La modulation de la cinétique de la perte en eau et de son intensité ont permis de disposer de systèmes ayant des teneurs en eau similaires mais obtenus dans différentes conditions. Pour cela, différentes modalités de déshydratation ont été étudiées : par chambre froide à 4°C, par étuve ventilée à 40°C et par étuve sous vide (50mbar) à 40°C.

Afin de maximiser la surface d'échange permettant d'obtenir des pertes en eau importante, la déshydratation a été effectuée sur des tranches de tomate de 1.5 cm d'épaisseur. Les analyses ont été réalisées sur le péricarpe équatorial et le placenta, deux tissus de tomate relativement contrastés en termes d'histologie. En effet, comparé au péricarpe équatorial, le placenta dispose de cellules plus petites [66] et a une microporosité [55] plus élevée.

5.2. MATERIELS ET METHODES

5.2.1. DESHYDRATATION ET CARACTERISATION DE TOMATES

Une étude préliminaire a permis de définir le temps et la température de déshydratation selon la perte en masse souhaitée pour l'ensemble des modalités de séchage. Une perte en masse d'environ 40% a été visée car elle permettait de réduire la teneur en eau du péricarpe équatorial de quelques pourcents tout en préservant l'intégralité des cellules. L'intégrité des cellules du péricarpe équatorial a été vérifiée par microscopie optique, réalisée sur des échantillons de tissus frais et séchés par différentes modalités de séchage. Ainsi, pour atteindre une perte en masse d'environ 40%, les tranches ont été séchées en chambre froide à 4°C (modalité 1-A), en étuve ventilée à 40°C (modalité 2) et en étuve sous vide à 40°C (modalité 3). Puis, afin de comparer une même modalité de déshydratation et différentes pertes en masse, nous avons séché les tranches de tomate en chambre froide à 4°C pour atteindre une perte en masse d'environ 30% (modalité 1-B). Les conditions de déshydratation sont résumées dans *Tableau 5-1*.

Tableau 5-1: Conditions de déshydratation des tranches de tomate

	Temps	Température (°C)	Condition
MODALITE 1-A	7 jours	4	chambre froide
MODALITE 1-B	5 jours	4	chambre froide
MODALITE 2	9 heures	35	étuve ventilée
MODALITE 3	23 heures	35	étuve sous vide

Les tomates en grappe utilisées dans cette expérience ont été achetées dans un supermarché. Quatre tomates similaires (en termes de couleur et de taille) d'une grappe ont été choisies pour chaque expérience de déshydratation et quatre autres tomates de la même grappe ont été conservées pour les mesures destructives associées. Les expériences ont été réalisées sur des tranches de 1,5 cm d'épaisseur, découpées au milieu selon une coupe transversale (entre le pédoncule et le bas de la tomate, *Figure 5-1*).

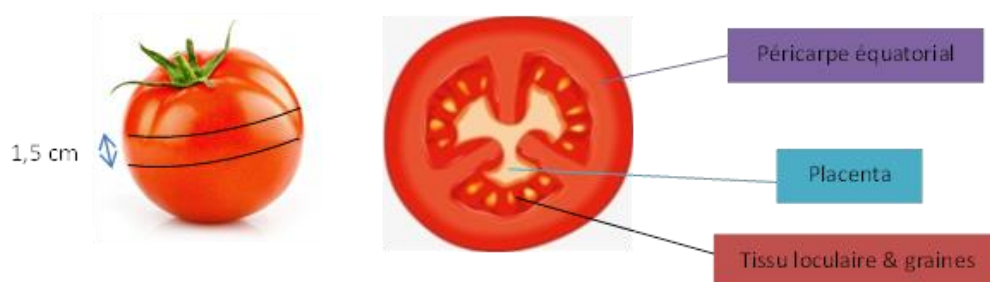


Figure 5-1: Représentation schématique de la coupe transversale de tomate étudiée par IRM

Pour les analyses par IRM, les quatre tranches de tomates ont été positionnées sur un support avec au centre un tube de solution aqueuse de Manganèse ($T_2 \sim 120\text{ms}$ à 1.5T), permettant de contrôler la stabilité des mesures. Suites à l'analyse par IRM, les tranches de tomates ont été soumises au protocole de déshydratation. Afin de stabiliser les tissus après la déshydratation et de minimiser d'éventuels gradients de teneur en eau, les tranches ont été placées en chambre froide pendant une nuit avant d'être de nouveau analysées par IRM. Elles ont été positionnées de la même façon que lors de la première expérience d'imagerie grâce à un protocole de repérage basé sur des feuilles de papier millimétré et les marques faites sur les tranches. Pour chaque acquisition IRM, les tranches ont été enveloppées dans du film alimentaire pour éviter l'évaporation de l'eau lors des acquisitions IRM. La température des échantillons lors des mesures IRM a été réglée à $15 \pm 1^\circ\text{C}$ à l'aide du dispositif de régulation thermique (*Figure 2-1*) et contrôlées par quatre fibres optiques insérées dans un tube d'eau placé à proximité des échantillons mais en dehors du champ de vue. Les analyses destructives (estimations de teneur en eau et les mesures de pH) ont été réalisées sur les échantillons du péricarpe équatorial et du placenta, prélevés sur les tomates fraîches et séchées.

La teneur en eau des échantillons cylindriques (diamètre 1cm), prélevés à trois endroits dans le péricarpe équatorial et à deux endroits dans le placenta, a été déterminée par la différence de masse des échantillons avant et après déshydratation en étuve à 70°C pendant 72h. Dans le cadre des tissus séchés, les prélèvements ont été réalisés sur les tranches pour lesquelles des images IRM ont été acquises. La position des échantillons prélevés a été localisée à l'aide des images IRM. Pour l'estimation des teneurs en eau des tissus frais, les échantillons ont été prélevés sur des tranches centrales découpées sur 4 autres tomates appartenant à la même grappe que celles dont provenaient les tomates utilisées pour l'imagerie. Dans ce cas, une valeur de teneur en eau par tomate est estimée.

Après le prélèvement des échantillons pour l'estimation de la teneur en eau, le restant du péricarpe et du placenta ont été placés dans des tubes puis centrifugés pendant 20 minutes à 18 672 x g (à 12 500 tours/min) à 4°C. Le pH de cette phase liquide a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

5.2.2. ACQUISITION DES IMAGES IRM

Pour l'ensemble des conditions de séchage, le protocole de mesures IRM comprenant les mesures de T_2 , ADC et T_2^* , ainsi que l'imagerie 3D morphologique. Pour les trois premières modalités, une coupe coronale a été acquise avec les mêmes paramètres géométriques que ceux employés dans les chapitres 3 et 4 (champ de vue 155 mm², taille de matrice 128*128 et épaisseur de coupe 5 millimètres). Le protocole utilisé pour les mesures de T_2 correspondait également à celui des publications 1 et 2 (TE=6.5ms, TR=10s, 256 échos), alors que l'ADC a été mesuré selon le protocole 2 présenté dans le chapitre 2 (4 valeurs de G (0, 8, 16 et 24mT/m) avec 2, 1, 1 et 4 accumulations, respectivement, $\delta=20$ ms et $\Delta=60$ ms et TE=91ms). Les cartographies de T_2^* (utilisées en combinant les mesures de T_2 pour l'estimation de la microporosité [55]) ont été réalisées avec une séquence en écho de gradient, avec 12 échos (TE₁= 2.27ms et Δ TE=1.58ms), TR=5s, BP=930Hz/pixel, angle de bascule=90° et 2 accumulations. Les images 3D morphologiques de résolution spatiale de 0.47*0.47*0.5 mm³ ont été acquises avec une séquence turbo spin écho (TSE), avec les paramètres suivants: matrice: 326*384, FoV: 152*180 mm², nombre de coupes=64, TR=144ms, TE=29ms, BP=200Hz/pixel, Turbo Facteur=6 et 3 accumulations.

5.2.3. MESURES DE T_2 ET ADC DANS DES SOLUTIONS MODELES

Afin de déterminer expérimentalement la relation entre le T_2 , le coefficient de diffusion et la concentration en sucre de solutions aqueuses dans la gamme de teneur en eau attendue dans les tissus de tomate frais et séchés et à pH de 4,4 correspondant à celui de la tomate, une étude préliminaire a été réalisée sur des solutions de fructose [104] à différentes concentrations: 0 (eau pure), 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 et 120 g/L. Pour ceci, 9 tubes de 50 mL (diamètre de 3.4 cm et hauteur de 7.0 cm) contenant chacun une solution, ont été placés dans un dispositif expérimental. Les mesures de T_2 et ADC ont été réalisées avec les mêmes protocoles expérimentaux que ceux employés sur les tranches de tomates, à l'exception de l'orientation transversale de coupe. Les acquisitions ont été répétées trois fois.

5.2.4. TRAITEMENT DES IMAGES IRM

5.2.4.1. Paramètres de relaxation et diffusion

Afin d'estimer le nombre de composantes du signal de relaxation avant et après la déshydratation des tissus, les spectres des temps de relaxation dans les tissus du péricarpe équatorial et du placenta ont été calculés à l'aide de la méthode MEM [79] comme décrit dans le chapitre 2. Ce calcul a été réalisé à l'échelle des régions d'intérêt des images définies à l'aide du logiciel ImageJ, dans le péricarpe équatorial (trois ROIs) et dans le placenta (deux ROIs) de façon à concorder avec les 5 prélèvements des tissus par tomate réalisés pour l'estimation de la teneur en eau (*Figure 5-2*).

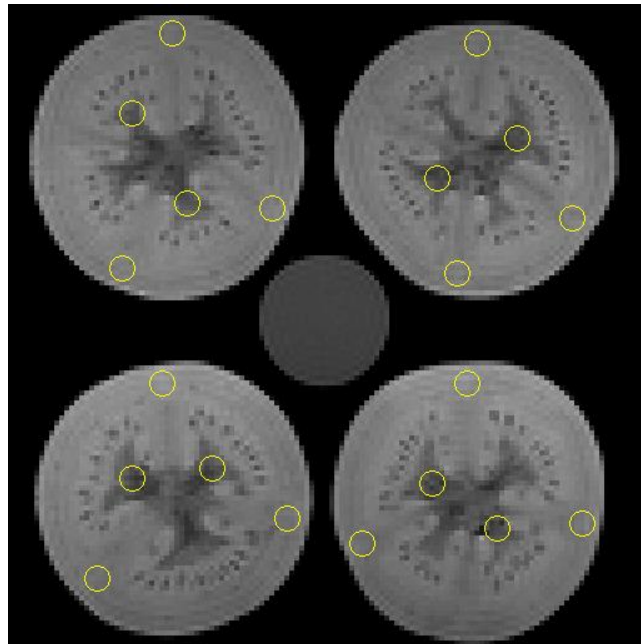


Figure 5-2: Image IRM des tomates (MSE, TE=78ms, tomates fraîches, modalité 1-A) avec les régions d'intérêt (ROIs) dans le péricarpe équatorial (3 ROIs par tomate) et placenta (2 ROIS par tomate).

Puis une cartographie des temps de relaxation, à l'aide de l'algorithme décrit dans [77] a été calculée. Les paramètres d'initialisation (nombre de composantes et valeurs initiales des T_2) ont été définis à partir des caractéristiques des spectres de distribution des temps de relaxation (positions et valeurs centrales des pics). Afin de s'affranchir des hétérogénéités spatiales de l'image dues à l'antenne réceptrice, les cartographies des intensités ont été normalisées par l'image d'un objet test homogène, acquise avec la séquence MSE à TE=6,5ms avec 20 accumulations, dans des conditions identiques à celles utilisées pour les tomates. Les valeurs moyennes des T_2 et des intensités relatives associées ont été calculées sur les mêmes ROIs (*Figure 5-2*) que celles utilisées pour les estimations des spectres de relaxation.

Les cartographies d'ADC et de microporosité ont été calculées sous Scilab, à l'aide des méthodes décrites dans le chapitre 2.

5.2.4.2. Images 3D

Les images 3D ont été utilisées pour quantifier la perte en volume du péricarpe équatorial lors de la déshydratation et pour évaluer de cette façon la diminution de la taille de cellules. Pour ceci, le péricarpe de chaque tranche de tomate a été segmenté de façon semi-automatique à l'aide du logiciel Avizo [105]. Le volume du péricarpe a été déterminé pour la tranche complète (1.5 mm d'épaisseur avant le séchage) et pour la partie de la tranche correspondante à la coupe IRM virtuelle sélectionnée pour l'imagerie 2D (5mm au centre de la coupe).

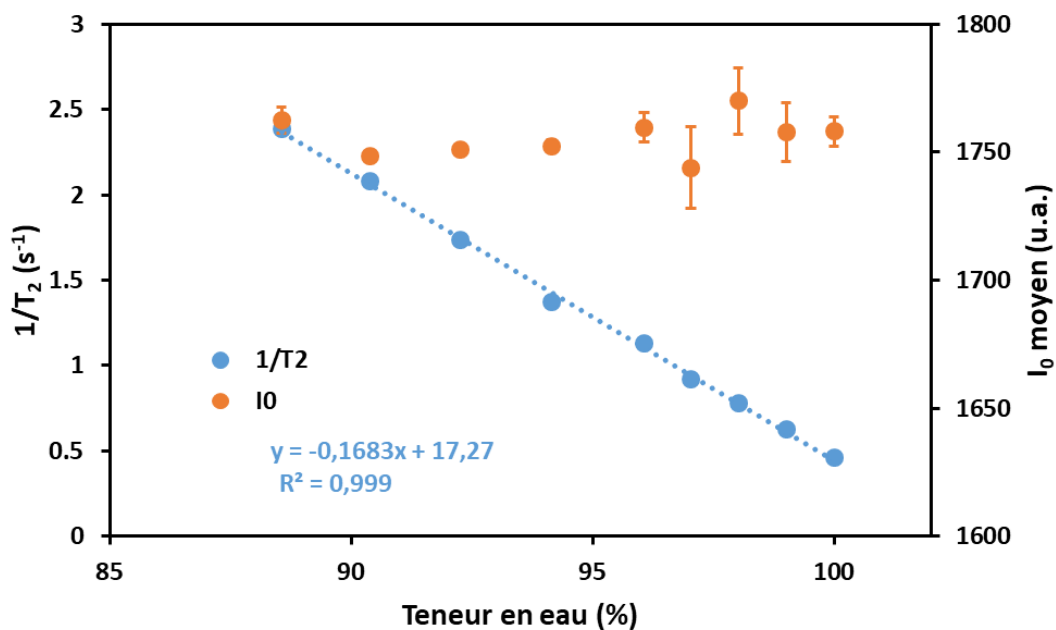
5.2.4.3. Analyse statistique des données

Une analyse statistique de la variance ANOVA à un facteur a été réalisée pour l'IRM paramétrique (T_2 , intensité, coefficient de diffusion) pour le péricarpe équatorial et le placenta afin de déterminer si les paramètres sont statistiquement différents ($P < 0.01$) avant et après déshydratation.

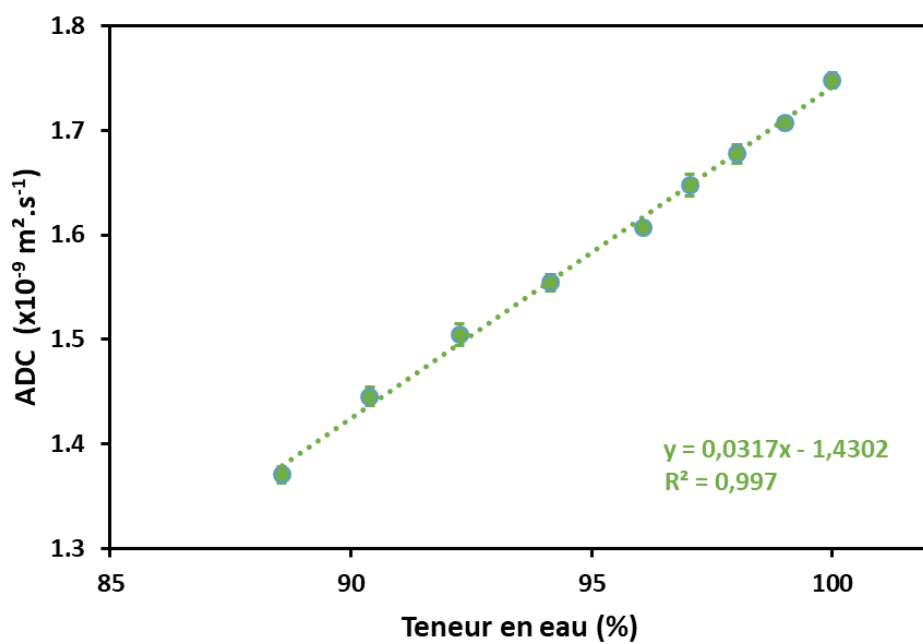
5.3. RESULTATS

5.3.1. IMPACT DE LA CONCENTRATION EN SUCRE SUR LES PARAMETRES DE RELAXATION ET LE COEFFICIENT DE DIFFUSION DES SOLUTIONS AQUEUSES

Comme attendu en cas de régime dilué, la relation entre la vitesse de relaxation ($1/T_2$) et la teneur en eau est linéaire (*Figure 5-3A*). L'ADC augmente également de façon linéaire avec la teneur en eau (*Figure 5-3B*). En revanche, I_0 estimé à partir des mesures des T_2 n'est pas sensible aux variations de la teneur en eau dans la gamme de teneurs en eau analysée (*Figure 5-3A*). L'écart type des mesures de T_2 , I_0 et d'ADC correspond au maximum à 0.5, 0.9 et 0.7% de la valeur mesuré, respectivement.



A



B

Figure 5-3: (A) Vitesse de relaxation ($1/T_2$), intensité du signal (I_0) correspondant à la densité protonique et (B) coefficient de diffusion apparent (ADC) des solutions aqueuses de fructose à pH 4.4 et à $16^\circ C \pm 1^\circ C$ en fonction de la teneur en eau. Les données sont obtenues à partir des cartographies des T_2 et I_0 mono-exponentielles et correspondent aux moyenne des ROIs tracées dans tubes.

5.3.2. IMPACT DE LA DESHYDRATATION SUR LES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET LA COMPOSITION ET DES TISSUS

Les pertes en masses mesurées pour les différentes modalités de déshydratation avant et après l'expérience IRM sont rapportées dans le *Tableau 5-2*.

Tableau 5-2: Perte en masse induite par la déshydratation

	PERTE EN MASSE (%)
MODALITE 1-A	38±1
MODALITE 1-B	30±1
MODALITE 2	40±1
MODALITE 3	44±2

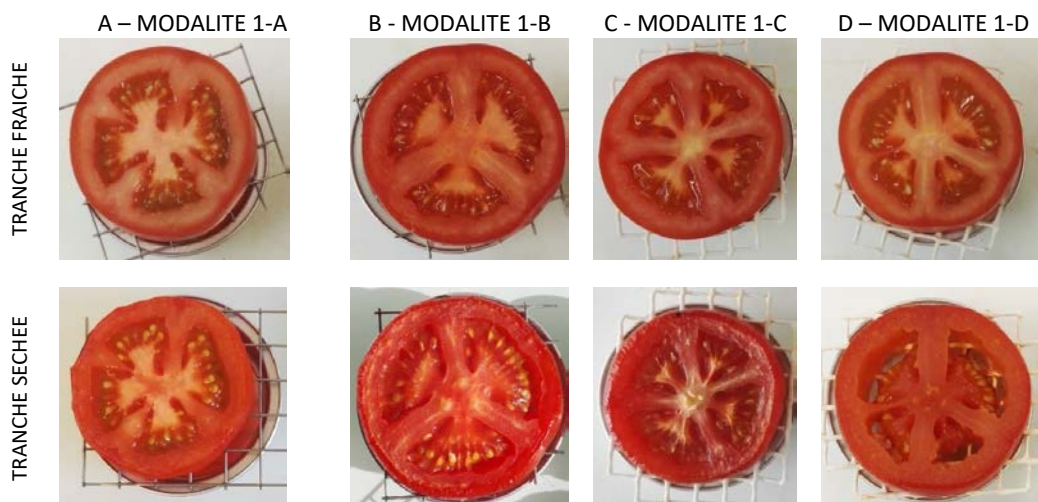


Figure 5-4: Photographies des tranches de tomate avant et après séchage

L'aspect visuel des tomates séchées diffère selon la modalité de déshydratation appliquée. Dans le cadre des modalités 1 (A et B) et 2, la déshydratation semble impacter l'ensemble des tissus de façon similaire. En revanche, dans le cadre de la déshydratation sous vide (modalité 3), c'est le tissu loculaire qui semble subir la principale perte en eau.

Ces observations sont confirmées par les images IRM en 3D (*Figure 5-5*), sur lesquelles on peut clairement observer une diminution de la surface des tranches de tomate dans le cas des deux premières modalités de déshydratation, avec une rétraction partielle du tissu loculaire dans la déshydratation à froid (modalité 1 A et B) et sa quasi disparition dans le cadre de la déshydratation sous vide.

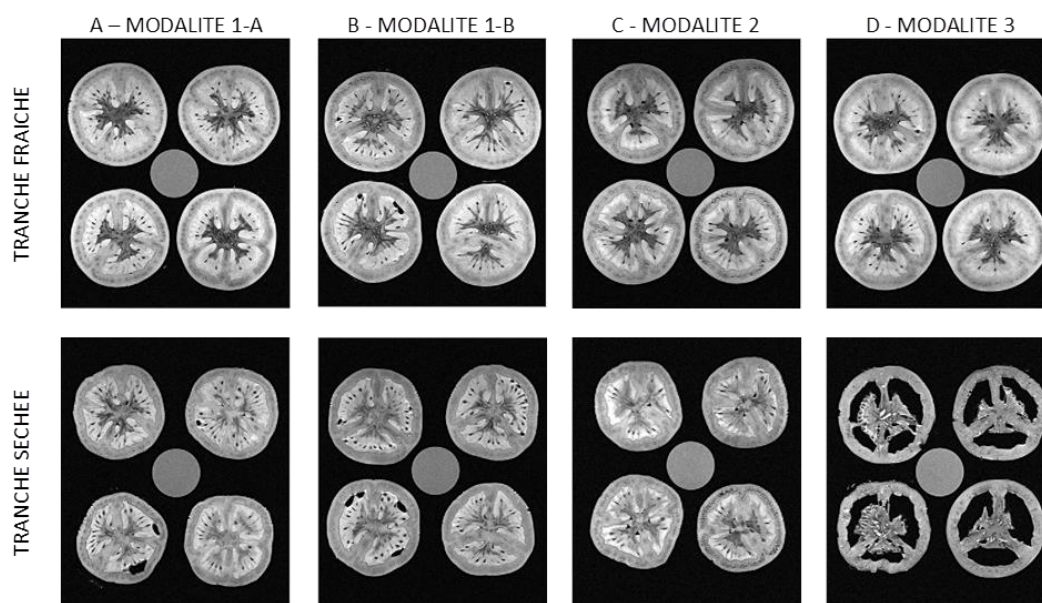


Figure 5-5: Images de tranches de tomate fraîches et séchées acquises avec la séquence TSE 3D. La première coupe ne présentant pas de volume partiel est montrée.

Les valeurs de teneur en eau mesurées dans les tissus frais du péricarpe équatorial et du placenta sont proches (*Tableau 5-3*). Lors de la déshydratation en chambre froide (modalité 1), le péricarpe semble perdre plus d'eau que le placenta quel que soit la perte en masse de la tranche. Ceci n'est pas le cas pour les deux autres modalités de séchage. Dans le cadre de la déshydratation en étuve sous vide (modalité 3), la perte en masse plus importante que dans le cas des deux autres modalités de déshydratation induit une moindre perte en eau dans le péricarpe et le placenta. Ceci est expliqué par la perte en eau subie par le tissu loculaire.

Tableau 5-3: Teneur en eau des échantillons de péricarpe équatorial avant et après déshydratation. Dans le cas de tomates fraîches, les moyennes et les écarts type sont calculés à partir de quatre valeurs, chacune correspondant à une tomate. Dans le cas des tissus séchés, les moyennes et les écarts type sont calculés à partir de 12 valeurs pour le péricarpe (3 par tomate) et 8 valeurs pour le placenta (2 par tomate).

TRAITEMENT	TENEUR EN EAU (%)			
	PERICARPE EQUATORIAL		PLACENTA	
	TISSU FRAIS	TISSU SECHE	TISSU FRAIS	TISSU SECHE
MODALITE 1-A	94.7±0.2	90.6±0.1	94.0± 0.4	91.8± 0.1
MODALITE 1-B	94.1±0.1	91.9±0.5	93.4± 0.1	92.0± 0.2
MODALITE 2	95.4±0.1	92.1±0.5	94.5±0.1	90.9± 0.6
MODALITE 3	95.0±0.2	93.2±0.5	94.2± 0.0	93.7±0.5

Les mesures du pH, selon les différentes modalités de séchage, sont présentées ci-dessous (*Tableau 5-4*). Les valeurs de pH sont similaires avant et après déshydratation pour toutes les modalités, à l'exception de la déshydratation en étuve sous vide où le pH diminue légèrement. Cette diminution n'est pas expliquée.

Tableau 5-4: pH mesuré dans les échantillons de péricarpe équatorial avant et après le séchage. Les moyennes et les écarts type sont calculés à partir de quatre valeurs, chacune correspondant à une tomate.

TRAITEMENT	pH	
	TISSU FRAIS	TISSU SECHE
MODALITE 1-A	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,0
MODALITE 1-B	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,1
MODALITE 2	4,5 ± 0,1	4,5 ± 0,1
MODALITE 3	4,4 ± 0,0	4,0 ± 0,1

La *Figure 5-6* montre la représentation en trois dimensions des tranches de tomate fraîches montrées dans la *Figure 5-5*. La *Figure 5-6A* correspond au résultat de la segmentation du péricarpe équatorial, les *Figure 5-6B, C* et *D* correspondent aux vues orthogonales de la représentation 3D. Le volume du péricarpe équatorial avant et après déshydratation est reporté dans le *Tableau 5-5*, montrant que la perte en volume est similaire dans les cas de déshydratation selon la modalité 1-A et la modalité 2 (49 et 48 %, respectivement), tandis qu'elle est considérablement plus faible pour la déshydratation selon la modalité 3 (26 %). Dans le cas de modalité 1-B, la perte en volume est d'environ 39%. En considérant uniquement les 5 mm au centre des tranches correspondant à la section imagée par IRM, la perte en volume diminue dans tous les cas d'environ 50% par rapport à la tranche entière. Il est à noter que la diminution de volume sur la coupe centrale de 5mm tient compte uniquement de la rétraction du tissu dans le plan de la tranche.

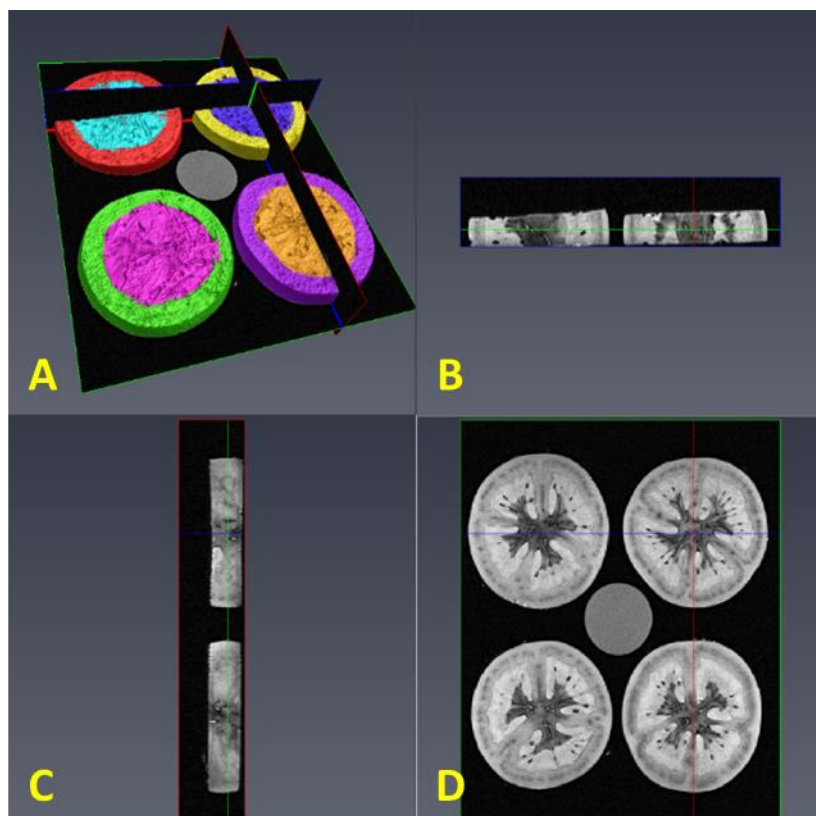


Figure 5-6: Représentation en 3D des tranches de tomate fraîches (Figure 5-5) avec A résultat de la segmentation du péricarpe équatorial et B, C D les vues orthogonales de la représentation 3D. Les images ont été acquises avec la séquence TSE 3D.

Tableau 5-5: Volume du péricarpe équatorial avant et après déshydratation effectuées à partir des images 3D. A – tranche Complete, B- tranche centrale de 5mm. Les moyennes et les écarts type sont calculés à partir de quatre valeurs, chacune correspondant à une tomate.

TRAITEMENT	A – PERICARPE DE LA TRANCHE DE TOMATE ENTIERE			B - PERICARPE DE LA TRANCHE DE TOMATE CENTRALE (5mm)		
	VOLUME x 10 ⁻⁵ (m ³)		DIFFERENCE (%)	VOLUME x 10 ⁻⁵ (m ³)		DIFFERENCE (%)
	FRAICHE	SECHEE		FRAICHE	SECHEE	
MODALITE 1-A	2.32±0.08	1.18±0.03	49	0.84±0.03	0.61±0.02	27
MODALITE 1-B	2.52±0.26	1.54±0.18	39	0.85±0.05	0.69±0.05	19
MODALITE 2	2.37±0.20	1.24±0.08	48	0.89±0.03	0.67±0.01	25
MODALITE 3	2.53±0.09	1.88±0.04	26	0.88±0.02	0.79±0.02	10

5.3.3. VARIATION DES PARAMETRES DE RELAXATION EN FONCTION DES MODALITES DE SECHAGE

La reproductibilité des mesures des paramètres de relaxation sur les tranches de tomates fraîches et séchées a été estimée à partir des mesures réalisées sur la solution hydrique de manganèse (T_2 mono-exponentiel et intensité I_0 associée). Entre les mesures réalisées sur les tomates fraîches et séchées d'une même condition, le maximum de la variation d' I_0 était de 5%. Cette valeur est plus élevée que l'écart type des mesures réalisées sur les tubes de solution de fructose (0.9%), probablement à cause des variations de température et d'une moindre stabilité de l'imageur dans le cas des mesures réalisées sur plusieurs jours. Le T_2 du tube était stable pour les huit mesures réalisées (112 ± 1 ms), avec un écart type similaire que dans le cas de l'expérience sur les solutions de fructose représentée sur la *Figure 5-3* (0.5%). L'estimation de répétabilité n'a pas pu être réalisée pour les mesures d'ADC, car les vibrations du tube d'eau rendaient les mesures de ce dernier impossible.

5.3.3.1. Distributions des temps de relaxation mesurée dans des tissus frais et séchés

La *Figure 5-7* montre un exemple typique des distribution des temps de relaxation obtenues pour trois région d'intérêt (*Figure 5-2*) dans le péricarpe équatorial et deux régions de placenta, avant et après déshydratation selon la modalité 1-A. Ces spectres des temps de relaxation démontrent que le signal de relaxation suit le modèle tri-exponentiel pour les deux types de tissu avant et après le séchage, indiquant que trois pools d'eau peuvent être distingués. Dans le cas des deux tissus, le premier pic est centré entre 40 et 20. Les pics 2 et 3, centrés respectivement autour des valeurs de 200-400 et 750-800 ms pour le péricarpe équatorial de tissus frais, se déplacent vers des valeurs de 150 et 450 ms après le séchage. Dans le cas du placenta, les pics 2 et 3, sont centrés respectivement sur des valeurs de 200-300 et 500-600 ms avant la déshydratation et sur des valeurs de 150 et 400-500 ms après le séchage.

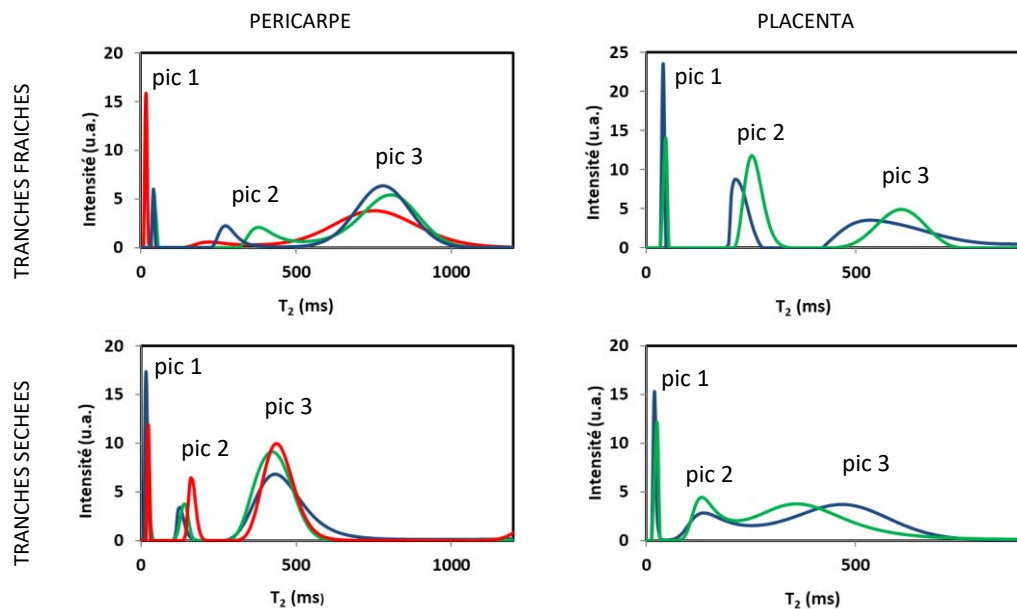
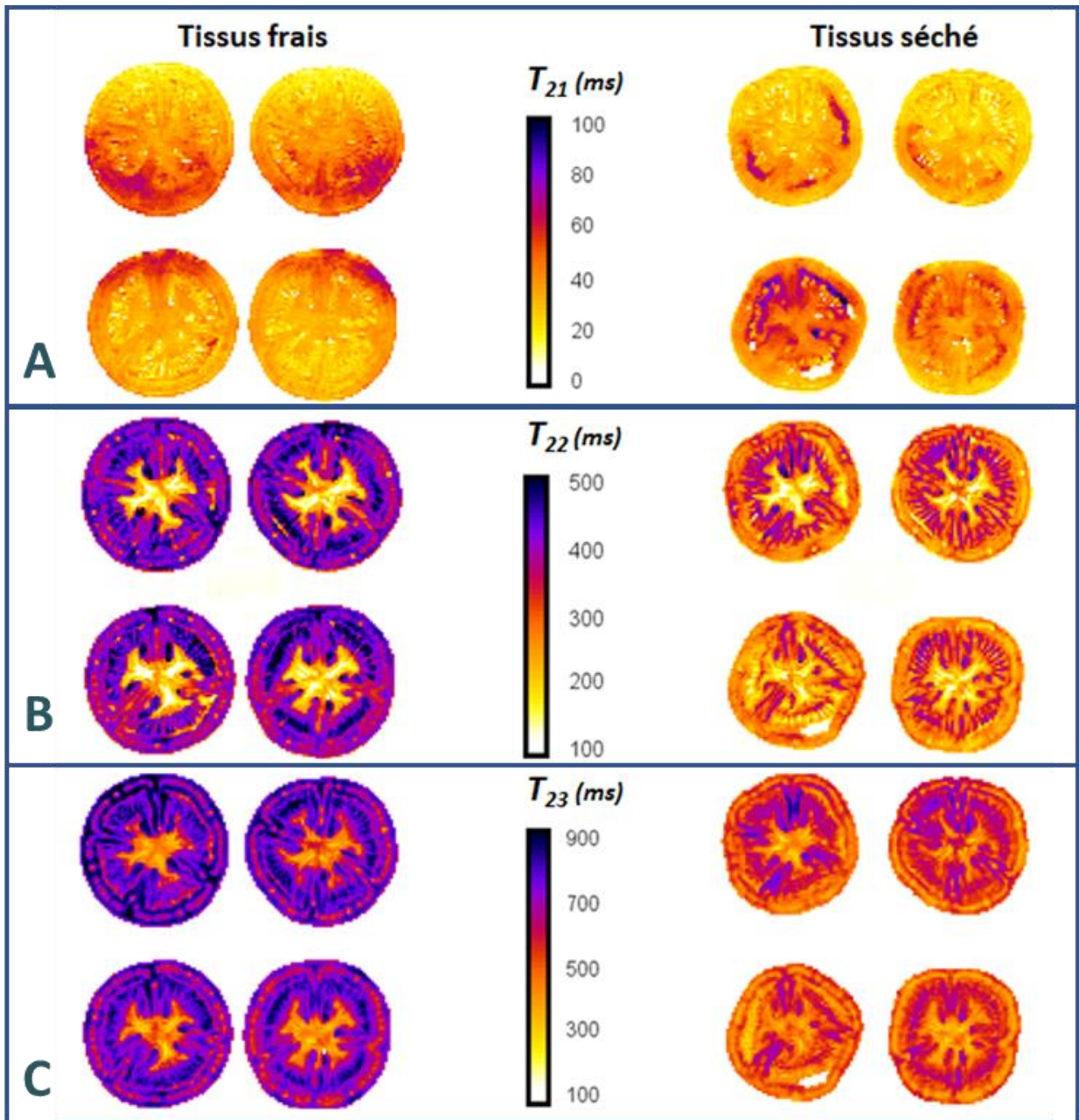
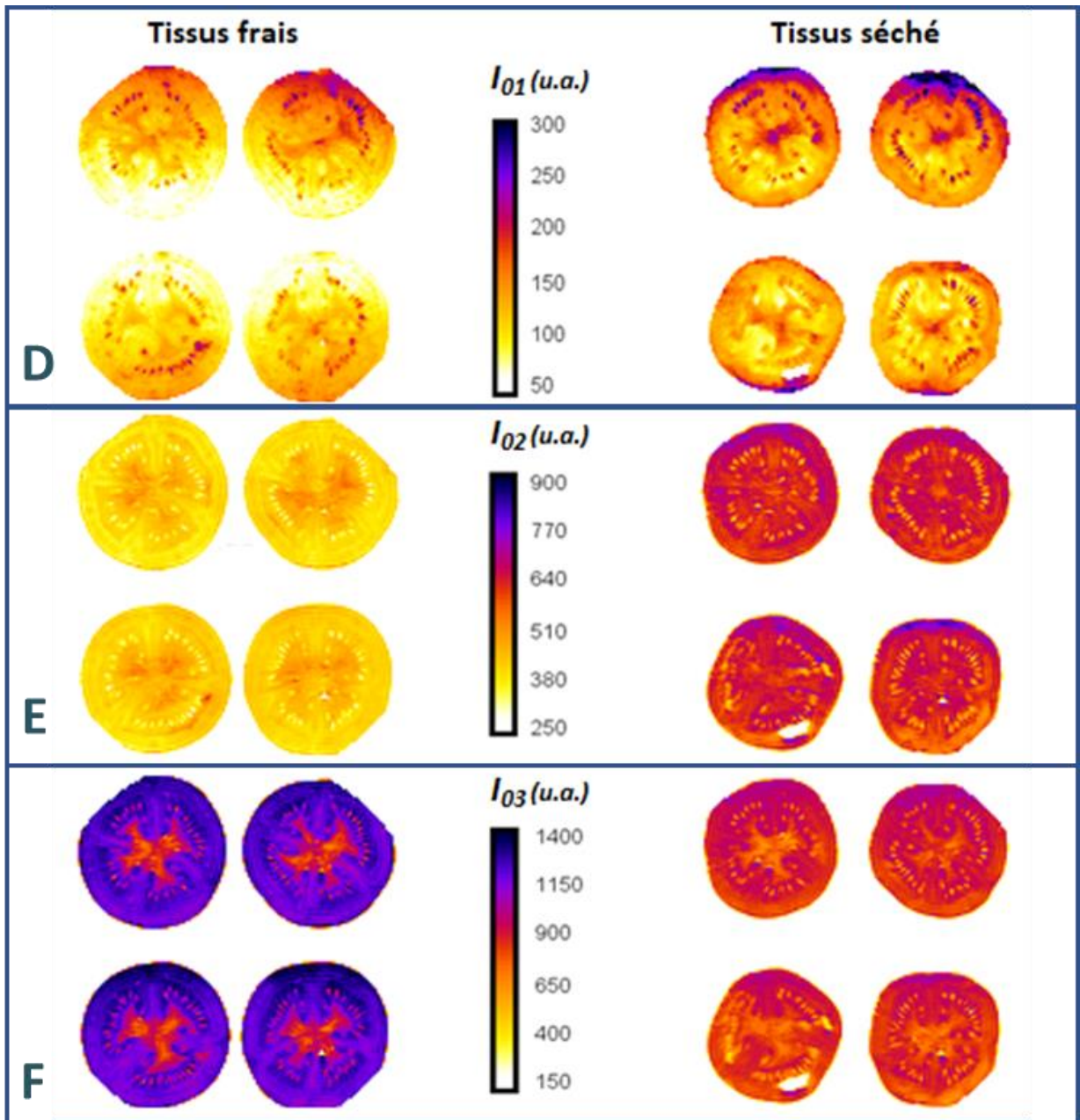


Figure 5-7: Exemple de courbes de distribution des T_2 mesurées dans des tissus frais et séchés selon la modalité 1-A pour le péricarpe et le placenta. Les courbes de la même couleur correspondent aux ROIs tracées aux mêmes endroits des tissus.

5.3.3.2. Cartographies des paramètres de relaxation, coefficient de diffusion et microporosité apparente

La Figure 5-8 montre les cartographies des temps de relaxation transversale tri-exponentielle (A-C), de l'intensité (I_0) associées (D-F), du coefficient de diffusion apparent (G) et de la microporosité apparente (H) des tranches de tomates fraîches et séchées selon la modalité 1-A. Elles permettent de visualiser les variations spatiales des paramètres et leurs modifications suite à la déshydratation. Les tubes de référence ne sont pas représentés sur ces images, car le modèle de relaxation multi-exponentielle ne convient pas à l'eau dopée.





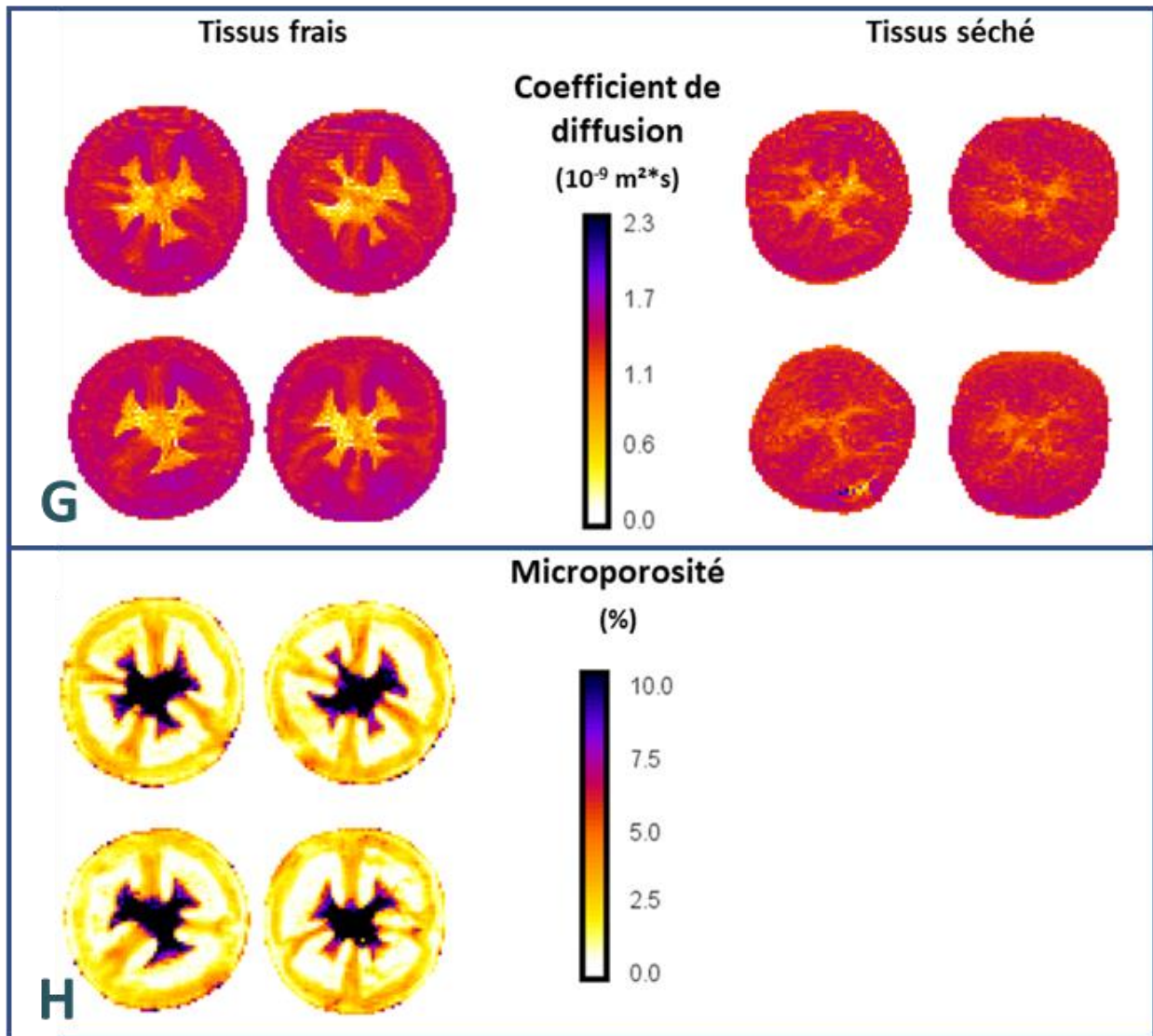


Figure 5-8: Cartographies des paramètres de relaxation transversale (A-F), coefficient de diffusion (G) et microporosité apparente (H) avant et après séchage.

Les cartographies des temps de relaxation T_{22} et T_{23} des tomates fraîches permettent de distinguer clairement le péricarpe, le placenta et le tissu loculaire. Cette différenciation est également possible sur des cartographies d' I_{03} , d'ADC et de microporosité apparente. On peut noter les valeurs de microporosité apparente de l'ordre de 2-3% dans le péricarpe et de 9-11% dans le placenta de tranches fraîches, en accord avec les données obtenues précédemment [55]. Les cartographies de T_{22} et T_{23} permettent également de mettre en évidence un tissu en forme d'anneaux au milieu du péricarpe équatorial avec des valeurs de T_{23} plus courtes (d'environ 100-200ms), qui semble correspondre aux faisceaux.

La déshydratation ne semble pas affecter significativement les valeurs de T_{21} , alors que les T_{22} et T_{23} diminuent considérablement. Les valeurs de l'intensité totale ($I_{0T} = I_{01} + I_{02} + I_{03}$) additionnées sur l'ensemble des voxels des chaque tranche de tomate ($I_{0T- \text{tomate}}$) diminue respectivement de 20 ± 4 , 10 ± 1 , 18 ± 5 et $40 \pm 2\%$ pour les séchages selon les modalités 1-A et 1-B, modalité 2 et modalité 3, (*Tableau 5-6*). Cette diminution est expliquée par la réduction de la surface de la tranche séchée (seul les voxels contenant les tissus sont pris en compte). En effet, la surface des tissus diminue de 17 ± 2 , 12 ± 1 , 18 ± 2 et $38 \pm 1\%$ pour les quatre modalités (1-A, 1-B, 2 et 3, respectivement). Cette analyse confirme que I_{0T} n'est pas impacté par le séchage en accord avec les résultats présentés sur la *Figure 5-3*, et que la densité protonique n'est pas sensible aux variations de la teneur en eau dans la gamme des valeurs analysée.

Tableau 5-6: Diminution, après séchage, de l'intensité totale des trois composantes du signal de relaxation additionnées sur l'ensemble des voxels de chaque tranches de tomate (I_{0T} image). Les moyennes et les écarts types sont calculés à partir de quatre valeurs, chacune correspondant à une tomate.

	DIMINUTION DE $I_{0T- \text{tomate}}$ (%)	DIMINUTION DE SURFACE (%)
MODALITE 1-A	20 ± 4	17 ± 2
MODALITE 1-B	10 ± 1	12 ± 1
MODALITE 2	18 ± 5	18 ± 2
MODALITE 3	40 ± 2	38 ± 1

Enfin, nous observons que la distinction tissulaire devient moins évidente sur les cartographies d'ADC après la déshydratation (G), tandis que les cartographies de microporosité apparente présentent des artefacts et ne peuvent donc pas être utilisée pour l'analyse. Ces artefacts proviennent de la diminution de l'épaisseur de la coupe, ce qui entraîne des artefacts de susceptibilité magnétique dans la coupe imagée dû aux interfaces entre l'air et les tissus.

5.3.3.3. Péricarpe équatorial et placenta

5.3.3.3.1. Paramètres de relaxation

Les valeurs moyennes des paramètres de relaxation multi-exponentielle et de la microporosité apparente des régions d'intérêt, dans le péricarpe équatorial et dans le placenta (*Figure 5-2*) des quatre tomates, sont présentés pour l'ensemble de traitements dans les *Tableau 5-7* et *5-8* respectivement.

Comme attendu d'après la *Figure 5-3* et le *Tableau 5-6*, l'intensité totale du signal de relaxation ($I_0\text{-tot}$) dans la région du péricarpe n'est pas impactée par le séchage. Le T_{23} des tissus séchés selon les modalités 1-A et 2 diminue dans des proportions similaires (-28%), alors que la diminution du T_{23} lors de la déshydratation selon la modalité 1-B est plus faible (-9%).

En revanche, le T_{23} des tissus séchés en étuve sous vide (modalité 3) augmente légèrement (7%). Parallèlement, l'intensité de la troisième composante (I_{03}) diminue avec la déshydratation d'environ 20-25% quel que soit le traitement. Les T_{22} des tissus séchés selon les modalités 1-A, 2 et 3 diminuent d'environ 30-35% tandis que ceux des tissus séchés selon la modalité 1-B restent stables avec le séchage. L'intensité de la deuxième composante (I_{02}) augmente pour l'ensemble des traitements en proportion dépendante de la modalité de séchage. En effet, I_{02} augmente de 69, 51, 69 et 27% en moyenne pour les modalités de déshydratation 1-A, 1-B, 2 et 3. Le T_{21} n'est pas impacté par le séchage, quel que soit la modalité de traitement et reste stable autour de 30-40 ms. Par contre, I_{01} double avec la déshydratation pour toutes les conditions de séchage, à l'exception de la modalité 1A.

Ainsi, pour le péricarpe, nous observons des variations similaires des T_2 et I_0 associés aux composantes 2 et 3 pour les tomates séchées selon les modalités 1-A et 2. Ceci est en accord avec une diminution en teneur en eau similaire (-4.1 et -3.3%, respectivement ; *Tableau 5-3*) et les mêmes pertes en volume observées (49 et 48%, respectivement ; *Tableau 5-5*). Les variations des T_2 et I_0 sont légèrement différentes pour la modalité 1-B (pertes en volume 39% et diminution de teneur en eau de 2.2%) et très différent pour la modalité 3 (pertes en volume 26% et diminution de teneur en eau de 1.8%).

Les variations des intensités relatives observées pour l'ensemble des modalités démontrent qu'elles sont potentiellement liées à des changements de répartition de l'eau au sein des tissus provoqués par la déshydratation.

Dans le cas du placenta, I_0 -tot semble augmenter lors de la déshydratation pour l'ensemble de modalités à l'exception de l'étuve sous vide (modalité 3). Le T_{23} des tissus séchés selon les modalités 1-A et 2 reste stable ou diminue légèrement (-9%), alors que dans le cas des tissus séchés selon la modalité 1-B et modalité 3 (étuve sous vide à 44% de perte en masse) le T_{23} augmente (16% et 39%, respectivement). Parallèlement, I_{03} diminue légèrement avec la déshydratation dans le cas des modalités 1-A et 2 (-8%), alors qu'il reste stable pour les deux autres conditions de séchage. Le T_{22} des tissus séchés selon les modalités 1-A et 2 reste stable avec le séchage, tandis que dans le cas de la modalité 1-B et modalité 3, T_{22} augmente après la déshydratation (37% et 55%, respectivement). I_{02} augmente avec la déshydratation quel que soit les conditions de séchage. Cette augmentation est modulée entre 35%, 28%, 50% et 53%, respectivement pour les modalités 1-A, 1-B, 2 et 3. Comme pour le péricarpe, les valeurs de T_{21} sont autour de 30-40 ms et restent stables indépendamment du traitement. L'intensité d' I_{01} ne varie pas, à l'exception du cas de modalité 2 où elle augmente d'environ 50%.

Comme dans le cas du péricarpe, les modalités de déshydratation 1-A et 2 semblent induire les effets similaires sur les paramètres de relaxation mesurés dans le placenta. En revanche, les effets observés diffèrent considérablement entre les deux tissus. L'augmentation du I_{tot} dans le placenta lors de la déshydratation selon les modalités 1 et 2 peut être expliquée par une éventuelle diminution de la microporosité de ce tissu, initialement plus élevée (~9-11%) que celle du péricarpe (~2%). Ceci pourrait également expliquer l'absence ou une moindre diminution des temps de relaxation suite au séchage. En effet, la microporosité des tissus entraîne une diminution des temps de relaxation observée, via les effets de susceptibilité magnétiques [106].

Tableau 5-7: Moyenne et écart types des paramètres de relaxation transversale du péricarpe équatorial avant et après la déshydratation pour l'ensemble des traitements. Les champs grisés indiquent les cas pour lesquels la différence (%) entre les paramètres mesurés dans les tissus frais et séchés est significative ($P < 0.01$). Les valeurs de microporosité sont présentées uniquement pour les tranches de tomate fraîches. F-test value (F) and probability for the null hypothesis (P) are presented for each MRI parameter

MODALITE 1-A											
	I_{0T} (u.a.)	I_{01} (u.a.)	I_{01} (%)	T_{21} (ms)	I_{02} (u.a.)	I_{02} (%)	T_{22} (ms)	I_{03} (u.a.)	I_{03} (%)	T_{23} (ms)	μ -porosité(%)
FRAIS	1629±80	100±42	6±2	40±14	373±20	23±1	414±39	1156±59	71±2	727±69	2±1
SECHE	1655±143	150±47	9±2	33±7	628±41	38±1	293±26	877±70	53±1	526±42	---
P	0.579	0.011	0.004	0.165	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	---
DIFFERENCE	N.S.	N.S.	48%	N.S.	69%	66%	-29%	-24%	-25%	-28%	---
MODALITE 1-B											
	I_{0T} (u.a.)	I_{01} (u.a.)	I_{01} (%)	T_{21} (ms)	I_{02} (u.a.)	I_{02} (%)	T_{22} (ms)	I_{03} (u.a.)	I_{03} (%)	T_{23} (ms)	μ -porosité(%)
FRAIS	1605±98	75±46	5±2	31±8	405±22	25±1	390±18	1125±52	70±2	690±46	2±1
SECHE	1676±116	141±60	8±3	29±8	611±33	37±2	370±34	923±49	55±2	628±50	---
P	0.132	0.007	0.003	0.421	0.000	0.000	0.082	0.000	0.000	0.005	---
DIFFERENCE	N.S.	87%	81%	N.S.	51%	45%	N.S.	-18%	-21%	-9%	---
MODALITE 2											
	I_{0T} (u.a.)	I_{01} (u.a.)	I_{01} (%)	T_{21} (ms)	I_{02} (u.a.)	I_{02} (%)	T_{22} (ms)	I_{03} (u.a.)	I_{03} (%)	T_{23} (ms)	μ -porosité(%)
FRAIS	1597±100	74±54	4±3	27±7	360±21	23±1	465±27	1164±55	73±2	772±45	3±1
SECHE	1698±196	154±64	9±3	32±9	607±84	36±2	314±19	938±86	55±2	554±30	---
P	0.126	0.003	0.001	0.176	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	---
DIFFERENCE	N.S.	109%	99%	N.S.	69%	58%	-32%	-19%	-24%	-28%	---
MODALITE 3											
	I_{0T} (u.a.)	I_{01} (u.a.)	I_{01} (%)	T_{21} (ms)	I_{02} (u.a.)	I_{02} (%)	T_{22} (ms)	I_{03} (u.a.)	I_{03} (%)	T_{23} (ms)	μ -porosité(%)
FRAIS	1627±80	99±49	6±3	43±18	386±16	24±1	403±34	1142±56	70±2	696±44	2±1
SECHE	1693±139	230±39	14±1	40±6	491±29	29±1	260±28	972±85	57±1	745±33	---
P	0.171	0.000	0.000	0.670	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	---
DIFFERENCE	N.S.	132%	125%	N.S.	27%	22%	-36%	-15%	-18%	7%	---

Tableau 5-8: Moyenne et écart types des paramètres de relaxation transversale du placenta avant et après la déshydratation pour l'ensemble des traitements. Les champs grisés indiquent les cas pour lesquels la différence (%) entre les paramètres mesurés dans les tissus frais et séchés est significative (P<0.01). Les valeurs de microporosité sont présentées uniquement pour les tranches de tomate fraîches.

MODALITE 1-A											
	I_{0T} (u.a.)	I_{01} (u.a.)	I_{01} (%)	T_{21} (ms)	I_{02} (u.a.)	I_{02} (%)	T_{22} (ms)	I_{03} (u.a.)	I_{03} (%)	T_{23} (ms)	μ -porosité(%)
FRAIS	1421±32	128±21	9±1	34±5	463±25	33±2	176±32	830±37	58±2	449±79	11±2
SECHE	1537±48	144±19	9±1	35±8	626±14	41±1	196±26	768±34	50±1	431±47	---
P	0,000	0,127	0,555	0,764	0,000	0,000	0,197	0,003	0,000	0,590	---
DIFFERENCE	8%	N.S.	N.S.	N.S.	35%	25%	N.S.	-8%	-15%	N.S.	---
MODALITE 1-B											
	I_{0T} (u.a.)	I_{01} (u.a.)	I_{01} (%)	T_{21} (ms)	I_{02} (u.a.)	I_{02} (%)	T_{22} (ms)	I_{03} (u.a.)	I_{03} (%)	T_{23} (ms)	μ -porosité(%)
FRAIS	1382±29	103±26	7±2	35±8	460±23	33±2	164±27	819±43	59±3	438±42	11±1
SECHE	1508±21	145±31	10±2	36±9	589±13	39±1	225±35	775±32	51±2	509±52	---
P	0,000	0,011	0,039	0,906	0,000	0,000	0,002	0,034	0,000	0,010	---
DIFFERENCE	9%	N.S.	N.S.	N.S.	28%	17%	37%	N.S.	-13%	16%	---

MODALITE 2											
	I_{0T} (u.a.)	I_{01} (u.a.)	I_{01} (%)	T_{21} (ms)	I_{02} (u.a.)	I_{02} (%)	T_{22} (ms)	I_{03} (u.a.)	I_{03} (%)	T_{23} (ms)	μ -porosité(%)
FRAIS	1424±12	86±24	6±2	34±7	420±18	29±1	219±19	919±22	65±2	449±20	9±1
SECHE	1610±55	133±34	8±2	29±7	630±11	39±2	214±16	847±37	53±1	408±30	---
P	0,000	0,006	0,025	0,168	0,000	0,000	0,590	0,000	0,000	0,006	---
DIFFERENCE	13%	56%	N.S.	N.S.	50%	33%	N.S.	-8%	-18%	-9%	---
MODALITE 3											
	I_{0T} (u.a.)	I_{01} (u.a.)	I_{01} (%)	T_{21} (ms)	I_{02} (u.a.)	I_{02} (%)	T_{22} (ms)	I_{03} (u.a.)	I_{03} (%)	T_{23} (ms)	μ -porosité(%)
FRAIS	1428±38	123±13	9±1	37±9	447±22	31±1	164±19	859±29	60±1	409±39	9±1
SECHE	1524±12 4	127±13	8±1	49±16	682±36	45±5	254±39	715±14 5	47±6	569±26	---
P	0,058	0,543	0,621	0,085	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	0,000	---
DIFFERENCE	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	53%	44%	55%	N.S.	-23%	39%	---

5.3.3.3.2. Coefficient de diffusion

Tableau 5-9: Moyenne et écart types de coefficient de diffusion apparent du péricarpe équatorial (ADC) avant et après la déshydratation pour l'ensemble des traitements. Les champs grisés indiquent les cas pour lesquels la différence (%) entre les paramètres mesurés dans les tissus frais et séchés est significative (P<0.01).

ADC ($\times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$)				
	MODALITE 1-A	MODALITE 1-A	MODALITE 2	MODALITE 3
FRAIS	1.43±0.05	1.42±0.05	1.42±0.08	1.43±0.04
SECHE	1.38±0.05	1.41±0.04	1.41±0.06	1.47±0.04
P	0,032	0.713	0,664	0,036
DIFFERENCE	NS	NS	NS	NS

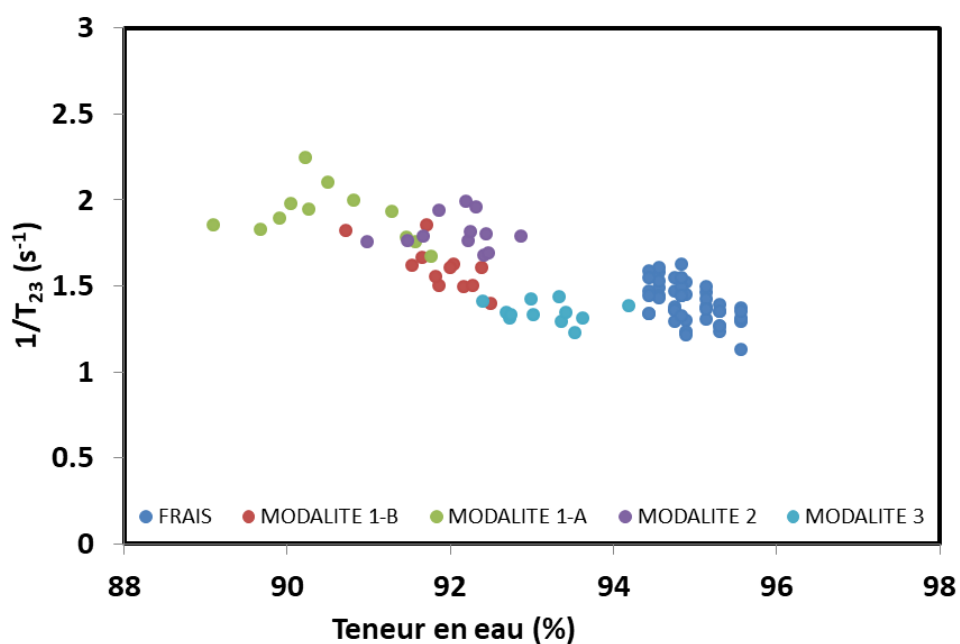
La valeur de l'ADC mesuré du péricarpe de tomate fraîches est relativement stable ($1.42-1.43 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$). D'après la *Figure 5-3*, cette valeur correspond à une teneur en eau de 89%, ce qui est plus bas que la valeur de la teneur en eau mesurée dans le péricarpe (*Tableau 5-3*). Même si on observe une légère tendance à diminution de l'ADC dans le cas des séchages selon la modalité 1-A et la modalité 3, ces différences ne sont pas significatives à $P < 0.01$.

Dans le cas du placenta, une analyse préliminaire a démontré que les points expérimentaux s'écartent fortement de la relation linéaire attendue entre $\ln\left(\frac{I(b)}{I(b=0)}\right)$ et b . Ceci est expliqué par la porosité relativement élevée de ce tissu, introduisant un déphasage des spins additionnel dû aux gradients de champs magnétique créé aux interfaces entre l'eau et l'air, caractérisés par des susceptibilités magnétiques différentes. Ces résultats ne sont donc pas discutés.

5.4. DISCUSSION

5.4.1. IMPACT DE LA COMPOSITION ET DES CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES TISSUS SUR LES TEMPS DE RELAXATION

En supposant que la perte en eau provoquée par la déshydratation affecte principalement la vacuole qui dans ce type de processus joue le rôle de tampon vis-à-vis des autres compartiments, il est attendu que le T_2 du contenu vacuolaire soit modifié via le phénomène des échanges chimiques. Afin de vérifier cette hypothèse, et on supposant que la troisième composante du signal correspond au pool d'eau vacuolaire, la vitesse de relaxation ($1/T_{23}$) mesurée dans le péricarpe et le placenta est tracée en fonction la teneur en eau (Figure 5-9). Il est cependant important de noter que la teneur en eau du contenu vacuolaire est seulement approximée par celle du tissu, car d'un côté le tissu du parenchyme de fruit charnu contient environ 50% de la matière sèche sous forme de composée solubles [66, 104] et que de l'autre côté la totalité de l'eau n'est pas dans la vacuole. Ainsi la teneur en eau vacuolaire ne peut pas être directement déduite de la teneur en eau tissulaire, d'autant que la proportion d'eau que contient ce compartiment semble être impactée par le séchage. Il est également important de noter que nous supposons que la stabilisation des tissus après la déshydratation a éliminé des éventuels gradients de teneur en eau dans l'épaisseur du péricarpe.



A

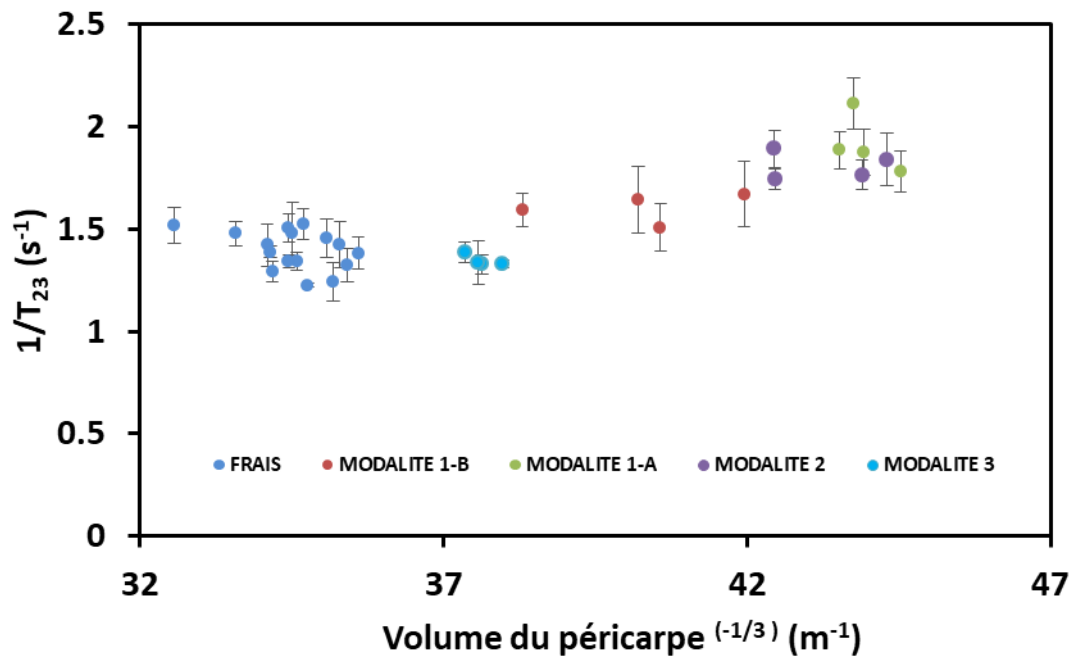


Figure 5-10: Vitesse de relaxation de la troisième composante du signal de relaxation transversale ($1/T_{23}$) en fonction de la dimension des cellules du parenchyme exprime comme racine cubique du volume du péricarpe. Les points correspondent aux moyennes et écarts types calculés pour chaque tomate.

Afin d'approfondir cette analyse, les valeurs des temps de relaxation mesurés dans les tranches de tomates fraîches et séchées ont été projetées sur la *Figure 5-11* extraite de [63] montrant la relation entre la vitesse de relaxation et le rayon des cellules du parenchyme de fruits de pomme et pêche en cours de croissance. Pour ce faire, le diamètre des cellules des tissus du parenchyme de tomates a été fixé à la valeur reportée dans [101] et la diminution du rayon des cellules après la déshydratation est supposés proportionnelle à la diminution du volume totale du péricarpe (*Tableau 5-5*). Cette représentation des résultats montre que, même si la taille de cellule n'est pas l'unique mécanisme qui explique la variation du T_2 , elle semble être le facteur significatif sur la valeur du temps de relaxation. Notons que la comparaison des données IRM obtenues dans cette étude et dans [63] a été possible car elles ont été acquises dans des conditions très similaires (même B_0 , séquence MSE et TE).

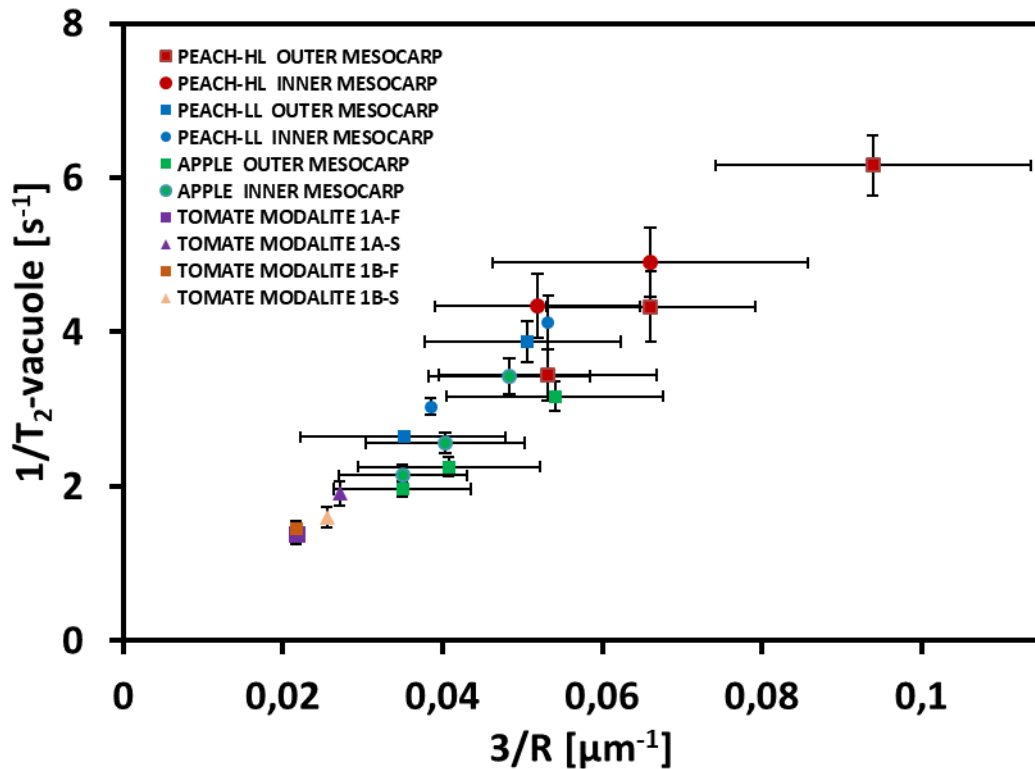


Figure 5-11: Vitesse de relaxation de la troisième composante du signal de relaxation transversale ($1/T_{23}$) en fonction de la dimension des cellules du parenchyme de fruits de pomme et de pêche (extrait de [63]), avec les données correspondant à la déshydratation selon les modalités 1-A et 1-B. Dans le cas de la tomate, le rayon des cellules des tissus du parenchyme frais a été estimé à environ $277\mu\text{m}$ [101], sa diminution suite à la déshydratation était supposée proportionnelle à celle estimée à partir de la diminution du volume totale du péricarpe équatorial (Tableau 5-5).

5.4.2. ATTRIBUTION DES COMPOSANTES DU SIGNAL RELAXATION AUX COMPARTIMENTS CELLULAIRES

Dans le paragraphe précédent, nous avons discuté des mécanismes de relaxation en adoptant l'hypothèse que la troisième composante du signal de relaxation, caractérisée par le T_2 le plus long et correspondant à environ 70% du signal total est associée à l'eau vacuolaire. Cette hypothèse, retenue dans la littérature [39, 40, 58], associe une composante du signal de relaxation multi-exponentielle à un compartiment cellulaire (vacuole, cytoplasme, eau d'hydratation de la paroi). Lors du séchage, nous observons une diminution des temps de relaxation des composantes 2 et 3, avec en même temps la diminution de l'intensité relative de la troisième composante en faveur de l'intensité de la deuxième composante.

Ceci peut être difficilement expliqué par un transfert d'eau entre la vacuole et le cytoplasme, car ce phénomène résulterait potentiellement à une augmentation du T_2 de l'eau cytoplasmique. Une hypothèse que nous pouvons avancée au regard de ces observations et des résultats obtenus sur différents tissus hétérogènes (fruit de pêche [63], oignon [61] et feuille de colza [62]) est que la deuxième et la troisième composante reflètent d'avantage une hétérogénéité de taille de cellules, que la compartimentation intracellulaire. Ainsi la troisième composante du signal correspondrait à des larges vacuoles tandis que la composante intermédiaire correspondrait à des petites vacuoles.

En se basant sur la *Figure 5-11* et sur les valeurs des temps de relaxation de la deuxième et la troisième composante du signal (414 ± 39 et 728 ± 69 ms et, respectivement pour le péricarpe frais, modalité 1-A), le rayon des deux populations de cellules correspondraient à environ 120 et $80 \mu\text{m}$, ce qui serait en accord avec l'hétérogénéité du péricarpe équatorial observé dans [66, 101, 107]. On peut alors penser que les plus grandes cellules perdent d'avantage d'eau au cours de la déshydratation que les petites cellules. Ceci expliquerait les variations des intensités relatives observées pour l'ensemble des modalités.

La validation de cette hypothèse demanderait des analyses supplémentaires, notamment des observations des tissus par microscopie ou macro-vision. Il serait également important d'estimer le biais potentiel induit par l'algorithme d'estimation des paramètres de relaxation sur les intensités relatives, car I_{02} et I_{03} sont généralement les plus impactés [63]. En effet, dans le cas de distribution continue des temps de relaxation, les estimations des temps de relaxation par la méthode de Levenberg-Marquardt peuvent entraîner des biais. Par exemple, un changement de distribution sans changement de temps de relaxation peut favoriser des répartitions différentes entre des temps de relaxation. Dans ce contexte, une certaine prudence doit être portée dans le cas où l'amplitude de chaque composante serait utilisée comme un estimateur direct de la teneur en eau.

5.5. CONCLUSION

Les différentes modalités de déshydratation appliquées à la tomate et l'analyse conjointe du parenchyme équatorial et du placenta ont permis de dégager plusieurs conclusions.

L'intensité totale du signal, correspondant à la densité de protons des molécules mobiles, n'est pas sensible aux variations de la teneur en eau et ne peut donc pas être utilisée comme indicateur d'une perte en eau des tissus dans la gamme analysée. En revanche, il permet d'en déduire des changements de microporosité apparente, car dans le cas du placenta, I_0 augmente suite à la déshydratation dans la majorité des cas étudiés.

Les variations de teneur en eau impactent les temps de relaxation dans le cas du péricarpe équatorial qui présente une très faible quantité d'air. Cette variation résulte de deux mécanismes parallèles, un changement de la teneur en eau intra-vacuolaire qui impacte les T_2 par les échanges chimiques des protons des molécules d'eau et des solutés et un changement du ratio entre le volume de la vacuole et la surface de la membrane qui agira via la relaxation de surface. Dans le cas du placenta, l'impact de la microporosité apparente induit un biais dans la relation entre le T_2 et le teneur en eau. Dans ce contexte, le coefficient de diffusion, mesuré sur des distances de diffusion courtes, peut-être une alternative pour accéder à l'information sur les changements de la teneur en eau. Il devrait être cependant mesuré avec une précision plus élevée que celle qui est possible sur le système d'imagerie utilisé dans cette étude.

Les résultats obtenus montrent également que le modèle d'interprétation des temps de relaxation, supposant que le caractère multi-exponentiel de la courbe de relaxation reflète les compartiments cellulaires, présente des limitations. Nos résultats semblent démontrer qu'un modèle privilégiant un effet de la distribution de taille des vacuoles, donc un effet de l'hétérogénéité présente au sein d'un même tissu, déjà démontré dans d'autres plantes, serait donc généralisable à la tomate.

CHAPITRE 6: DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

6.1. COMMENT INTERPRETER LES INFORMATIONS DU SIGNAL DE RELAXATION DANS LES VEGETAUX ?

Les objectifs de ce travail était d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la relaxation de tissus végétaux en considérant la composition du contenu cellulaire et la microstructure des tissus et de disposer ainsi de règles pour interpréter la variation du signal de relaxation lors de processus de déshydratation. Pour apporter des réponses à la problématique posée, nous nous sommes intéressés aux mécanismes régissant la relaxation de l'eau dans les cellules du parenchyme des fruits. Comme décrit dans le premier chapitre, le tissu végétal peut être modélisé par un système compartimenté où chaque compartiment est délimité par une membrane semi-perméable (*Figure 6-1*). Le phénomène de relaxation peut alors être décomposé selon deux mécanismes : la relaxation du liquide cellulaire d'une part, et d'autre part, la relaxation de surface due à la présence de membranes.

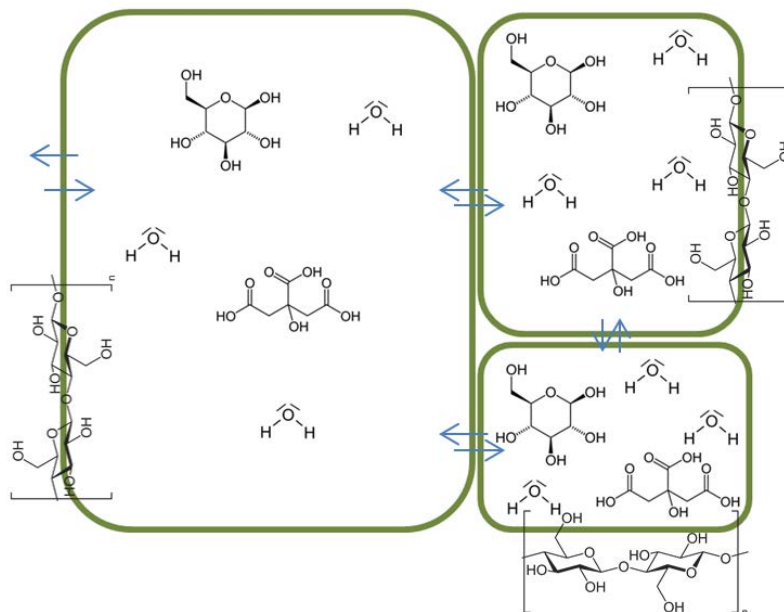


Figure 6-1: Représentation schématique des compartiments hydriques dans le parenchyme de fruit. Chaque compartiment est délimité par une membrane semi-perméable (en vert) constituée de phospholipides et de polysaccharides (ex. cellulose) et contient une solution aqueuse de sucres et acides (ex. glucose et acide citrique).

6.1.1. RELAXATION EN L'ABSENCE DE COMPARTIMENTATION

La première étape de notre travail a été consacrée à l'étude des mécanismes d'échanges chimiques sur la relaxation transversale en l'absence de compartimentation, donc en l'absence de membranes (*Figure 6-1*) et par conséquent d'effets de relaxation de surface. Pour cela nous avons analysé la relaxation des solutions aqueuses de sucrose, de fructose et de glucose, en première approximation du contenu cellulaire des végétaux.

Nous avons pour la première fois caractérisé les effets des échanges chimiques sur la relaxation dans des conditions d'imagerie à 1.5T à l'aide du modèle de Carver-Richard et démontré leur importance dans ces conditions de champs magnétique relativement faible. Nous avons également démontré qu'il est essentiel de prendre en compte rigoureusement les conditions de mesures en compte pour interpréter des résultats de relaxométrie, en absence de quoi la confrontation des données reportées en littérature n'est pas pertinente. De plus, grâce aux données de simulation, mais également grâce aux résultats issus de l'ajustement de ce modèle sur nos données expérimentales, nous avons pu expliquer les différentes variations de T_2 observées pour les solutions qui ont servies de modèle du contenu vacuolaire. Dans ces solutions, la relaxation est gouvernée par la mobilité des molécules d'eau et des solutés et par les échanges chimiques des protons engagés dans ces molécules, selon les lois dépendant de différents paramètres physico-chimiques (Tableau 6-1).

Tableau 6-1: facteurs influençant la mobilité moléculaire et leur impact sur les échanges chimiques

Facteur	Paramètres impliqués dans les échanges chimiques
Concentration en soluté	P_b et $T_{2b}(*)$ (*à forte concentration)
pH	k_b
Structure du soluté	$\Delta\omega$ et T_{2b}
Température	K_b, $\Delta\omega$ et T_{2b}

Plus spécifiquement, nous avons vu précédemment (*Figure 5-3*) que la relation entre la concentration en soluté et l'inverse des temps de relaxation transversale est linéaire, indépendamment de l'intensité du champ magnétique. En revanche, la pente de cette relation linéaire est fortement dépendante du champ magnétique. Cela est dû au fait que lorsque la concentration en soluté change, les échanges chimiques ne sont impactés que par le biais de la fraction de protons échangeables du soluté (P_b), tant que les interactions entre les molécules du soluté sont négligeables. Nous avons aussi pu expliquer par ce modèle le comportement non intuitif et complexe du T_2 avec la température. Dans ce cas, les T_{2a} et T_{2b} sont modulés par la température via le temps de corrélation (Eq.1-17 et Eq.1-18), tandis que k_b varie avec la température selon les équations (Eq.1-37 et Eq.1-38) et en moindre mesure $\Delta\omega$ [23]. En effet, nous avons observé une diminution du T_2 dans le cas du glucose entre 5 et 20°C (*Figure 6-2*). Nous observons également une différence de T_2 entre glucose et fructose pour des concentrations identiques, les deux molécules ayant pourtant la même formule chimique. La différence de T_2 , entre fructose et glucose mais aussi la différence de tendance de T_2 en fonction de la température, sont expliquées par une valeur de déplacement chimique différente $\Delta\omega$ entre les deux sucres. Notons qu'à un autre TE, ces tendances de T_2 ne seront pas forcément les mêmes.

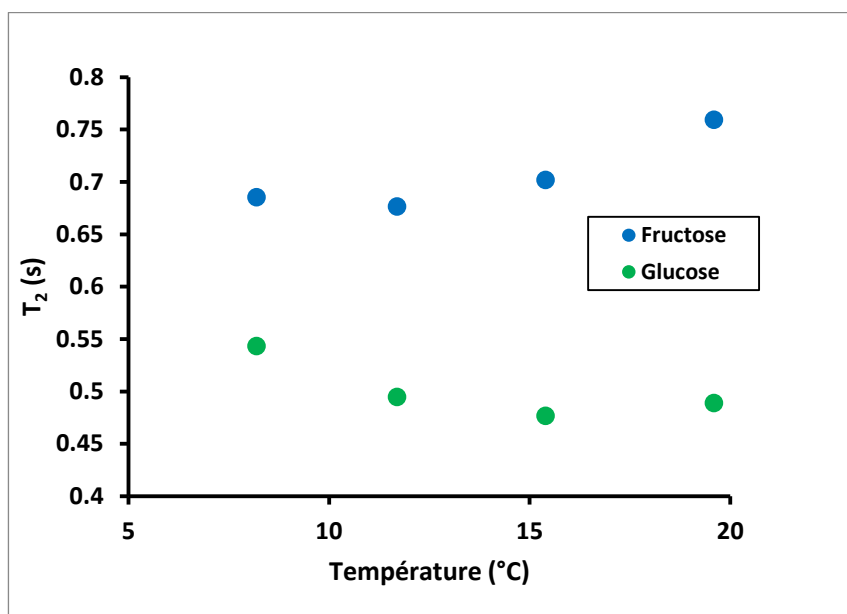


Figure 6-2: Variations du T_2 (s) avec la température (°C) pour des solutions de fructose et de glucose concentrées à 29 g/L à pH neutre. Ces données ont été acquises en IRM avec la séquence MSE et un TE de 6.5ms, dans le cadre de l'étude présentée dans le chapitre 3.

Cette étude de l'impact des échanges chimiques a également démontré que le pH était un facteur ayant un effet considérable sur la relaxation transversale, puisqu'une faible variation de pH modifie fortement la valeur de la vitesse d'échange et donc celle du T_2 . Or, dans les végétaux ce paramètre peut évoluer au cours de processus tels que la maturation ou la transformation. Ainsi, le contrôle du pH au cours du processus étudié est essentiel pour interpréter des variations des temps de relaxation transversale.

6.1.2. RELAXATION DANS LES SYSTEMES COMPARTIMENTES

Dans la continuité de notre étude, nous avons cherché à comprendre comment variaient les temps de relaxation transversale en présence des effets de relaxation de surface liés aux membranes, qui sont dus à la fois aux échanges chimiques entre le liquide vacuolaire et les molécules qui constituent la membrane (*Figure 6-1*), mais également aux échanges entre les compartiments à travers cette membrane semi-perméable. Nos études ont été réalisées sur la tomate, utilisée comme modèle de fruits charnus. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux effets de la température sur les temps de relaxation (chapitre 4). Dans la gamme de températures comprises entre 7 et 32°C, le signal de relaxation transversale était multi-exponentiel. De façon surprenante, pour la majorité des tomates la transition entre le modèle de relaxation bi- et tri-exponentielle a eu lieu entre 7 et 15°C (*Figure 4-2*). L'absence de variations du T_2 en fonction du TE observée à la fois pour la solution modèle et pour le pic de relaxation caractérisé par le T_2 le plus long du péricarpe de tomate, s'explique par une vitesse d'échange chimique élevée compte tenu du faible pH de ce fruit (≈ 4.4). Ceci démontre donc que le modèle de Carver et Richard peut être utilisé pour décrire le comportement de la relaxation du contenu vacuolaire. Néanmoins, nous constatons des comportements différents vis-à-vis de la température. Dans ce cas de la solution modèle, le T_2 augmente avec la température tandis que dans le péricarpe, le T_2 long reste stable alors que le T_2 moyen diminue. Ceci montre qu'un autre mécanisme de relaxation, probablement celui de la relaxation de surface, doit être pris en compte. Ces effets expliquent la sensibilité de la relaxation à la taille du compartiment et dépendent aussi de la relaxation T_2 des molécules impliqués dans la membrane. Il est peu probable que dans cette gamme restreinte de températures, une modification significative de la taille de cellule apparaisse.

Les interactions des molécules de l'eau avec la membrane via des échanges chimiques ou des échanges diffusionnels avec les compartiments voisins seraient plutôt à l'origine des différences observées.

Enfin la dernière étape de ce travail a consisté à étudier les variations des temps de relaxation au cours de la déshydratation des tissus de tomate. Au cours de ce processus, la concentration en soluté, la taille des compartiments ainsi que la perméabilité membranaire sont modifiées. Nous avons observé une corrélation des T_2 longs mesurés dans le péricarpe, avec la teneur en eau (*Figure 5-9*), mais aussi avec la taille du compartiment (*Figure 5-10*). Dans ce cas deux mécanismes associés sont impliqués, d'une part une diminution de la teneur en eau ce qui entraîne donc une diminution de la relaxation par les échanges chimiques avec les solutés en proportion plus importante et d'autre part au travers un accroissement des effets de la relaxation de surface du fait de la diminution de la taille cellulaire.

Au cours de la déshydratation de tomates, les T_2 long et moyen du signal de relaxation tri-exponentiel diminuent alors que l'intensité de la composante au T_2 long diminue au profit de l'intensité du T_2 moyen, l'intensité totale ne variant pas significativement. Pour expliquer ces variations, nous avons avancé l'hypothèse selon laquelle les cellules du péricarpe présentent différentes tailles et que les vacuoles des grandes cellules sont plus impactées par la déshydratation que les vacuoles des petites cellules. Ainsi au cours du séchage, la proportion des grandes vacuoles diminuerait au profit de celle des petites vacuoles. Cette hypothèse suppose donc que dans ces conditions expérimentales, la distribution des temps de relaxation observée, reflète majoritairement l'hétérogénéité de la taille des cellules, et non pas une répartition intracellulaire. En effet les variations d'intensité entre les deux temps de relaxation semblent trop importantes pour être attribuable à une diminution du contenu vacuolaire au profit de l'accroissement de la quantité d'eau au sein du cytoplasme. Pour ce type de tissus, l'attribution d'une composante du signal de relaxation à un compartiment cellulaire en particulier, peut-être remise en cause. Ce résultat est en cohérence avec les conclusions de travaux récents réalisés sur la pêche [63], la feuille de colza [62] et l'oignon [61].

Nous pouvons également réinterpréter les variations des temps de relaxation avec la température (chap.4) selon ce modèle. En associant la composante du signal de relaxation caractérisée par le T_2 le plus long aux vacuoles des grandes cellules et la composante intermédiaire aux vacuoles des petites cellules, on peut supposer que les petites vacuoles sont plus fortement impactées que les grandes par les variations de relaxation de surface avec la température. Dans le cas des grandes vacuoles, les effets de relaxation de surface se compensent avec ceux de l'augmentation de la mobilité moléculaire dans la fraction aqueuse et donc le T_2 reste stable. Dans le cas des petites vacuoles, la proportion d'eau vacuolaire en contact avec la surface est plus importante, ainsi, les effets de relaxation de surface deviennent prépondérants devant ceux de l'augmentation de la mobilité moléculaire de la fraction aqueuse, entraînant une baisse des temps de relaxation.

A la lumière des différents résultats acquis dans le cadre de ce travail, nous avons évalué ce modèle en le confrontant à des résultats déjà décrits dans la littérature.

Par exemple, Musse et al. ont observé des variations minimales des temps de relaxation dans le cas du séchage du péricarpe de tomate en RMN à 20MHz et à $TE=0.2ms$ [72]. Nous avons montré que dans ces conditions expérimentales, la variation de concentration de solutés vacuolaires impactait peu le temps de relaxation (*Figure 3-7*), dans la gamme de variations de teneur en eau observée dans cette expérience. Ceci permet d'expliquer l'absence de variations de T_2 observée, et suppose également que la variation du T_2 vacuolaire due à la relaxation de surface est négligeable dans la gamme de variations de tailles de cellules considérée. Cependant si les temps de relaxation restent constants, l'intensité varie fortement. Ce paramètre serait alors un bon indicateur dans le cas de changements de taille de cellule.

Des travaux étudiant l'évolution des temps de relaxation en fonction du temps de séchage du parenchyme de carotte où la perte en masse atteint 65% à 100MHz [40], ont montré une diminution du T_2 de la composante du signal caractérisée par le T_2 le plus long (composante 1, Tableau 6-2). Les auteurs ont attribué cette baisse à la diminution du volume vacuolaire ainsi qu'à la perte en eau consécutives au séchage du tissu.

Tableau 6-2: Données issues de [40], temps de relaxation et intensités relatives correspondantes mesurées dans le parenchyme de carotte à 100MHz en fonction du temps de séchage.

Drying time (min)	First component		Second component		Third component	
	T_2 (ms)	Population (%)	T_2 (ms)	Population (%)	T_2 (ms)	Population (%)
0	462	97.2	59.5	2.8	—	—
20	454	88.5	74.4	11.5	—	—
40	433	75.3	80.1	24.7	—	—
60	433	58.4	165	27.5	43.9	14.1
80	391	66.3	132	16.4	56.8	17.3
100	201	62.7	68	26.8	18.3	10.5
120	—	—	69.2	95.0	5.5	5.0

L'évolution de la distribution des temps de relaxation au cours du séchage appuierait l'hypothèse selon laquelle les temps de relaxation long et moyen correspondent à des vacuoles de cellules de différentes tailles au sein du parenchyme de carotte. En effet, le T_2 long diminue de façon monotone avec le temps de séchage tandis que le T_2 moyen augmente durant les 60 premières minutes puis diminue par la suite. On note également que l'intensité relative de la composante associée au T_2 long diminue lorsque celle associée au T_2 moyen augmente, en accord avec ce qui a été observé dans notre expérience de déshydratation de tomates (chapitre 5). Si l'on considère que les grandes vacuoles sont les premières impactées par les effets du séchage, l'intensité et les T_2 de la première composante diminuent en raison de la diminution de taille et de l'augmentation de la concentration en soluté vacuolaire. La population des vacuoles de taille « moyenne » augmente alors en raison de ces changements, expliquant ainsi les variations de T_2 et d'intensité observées.

Dans l'étude de Snaar et Van As [58] à 100MHz (*Figure 1-9*), le signal de relaxation des tissus de pomme a été mesuré au cours de leur immersion dans une solution de chlorure de manganèse. On observe alors une diminution successive des temps de relaxation transversale court, intermédiaire et long, respectivement, ainsi qu'une diminution de l'intensité de la composante majoritaire associée à la vacuole (T_2 long). Les variations des temps de relaxation ont été interprétées selon l'hypothèse que ces composantes soient associées respectivement au milieu extracellulaire, au cytoplasme et à la vacuole.

Néanmoins, on peut suggérer comme hypothèse que la migration de Mn^{2+} dans le tissu n'est pas homogène, peut-être en raison de la taille et de la position des cellules dans le tissu ou de leur fonction (ex. cellules des faisceaux).

Dans cette étude, du mannitol est ajouté à la solution de chlorure de manganèse afin de préserver l'équilibre osmotique. Toutefois, les auteurs ne commentent pas la diminution d'intensité de la troisième composante qui pourrait être due à la perte en eau due au déséquilibre osmotique engendré par l'immersion dans cette solution de chlorure de manganèse.

L'attribution du signal de relaxation qui tient compte de la distribution des tailles de cellules (et donc de vacuoles) permet dans certains cas l'interprétation des variations du signal de relaxation observées. Toutefois, elle ne peut pas être généralisée, car le modèle d'interprétation du signal de relaxation multi-exponentielle dépend du tissu étudié.

6.2. QUELLES SONT LES INFORMATIONS ACCESSIBLES PAR LA MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION ?

Dans le cas des solutions modèles, le coefficient de diffusion mesuré dans nos conditions d'imagerie à 1.5T, ne varie qu'en fonction de la concentration et la température conformément à ce qui est attendu selon les lois physiques. On observe alors une diminution linéaire du coefficient de diffusion quand la teneur en eau diminue et une variation en fonction de la température simplement décrite par une loi d'Arrhenius.

La mesure du coefficient de diffusion de l'eau n'est pas sensible à la taille des molécules de soluté [108], mais uniquement à la concentration massique. Ainsi, nous obtenons la même valeur de coefficient de diffusion pour le glucose, le fructose et le saccharose à la même concentration massique, glucose et fructose étant des isomères, alors que la molécule de saccharose est environ deux fois plus grande. Ceci indique que la mesure du coefficient de diffusion peut ainsi être directement reliée à la teneur en eau du contenu des compartiments cellulaires.

Dans le cas du péricarpe tomate, nous avons pu voir que le coefficient de diffusion était très sensible aux variations de température, et se comporte exactement comme la solution modèle (*Figure 4-7*). Néanmoins, on peut également observer que l'ADC mesuré dans le péricarpe est plus faible que celui mesuré dans la solution fabriquée de façon à mimer le contenu vacuolaire, ce que nous expliquons en grande partie par l'hétérogénéité du péricarpe. L'ADC mesuré est alors le résultat d'un coefficient de diffusion moyenné sur un ensemble de compartiments, de taille et de teneur en eau différentes. Le biais résultant de cette approximation a été estimé à environ 7%, après correction, cela donne des valeurs d'ADC similaires entre péricarpe et solution modèle.

Lorsque l'on déshydrate le tissu de tomate selon différentes modalités, la taille et la teneur en eau des compartiments hydriques sont impactés. Cependant aucune variation significative de l'ADC n'a été observée, alors que nous nous attendions à une diminution de 5 à 10% en se référant à la solution modèle (*Figure 3-8*). Notons que l'écart type de la moyenne de quatre mesures d'ADC dans le péricarpe de tomate correspond à environ 3-6% de la valeur de l'ADC. Notons également qu'il est difficile d'estimer la diminution de l'ADC attendue, car la teneur en eau est mesurée à l'échelle de tissus et intègre la matière sèche insoluble qui n'intervient pas dans le contenu vacuolaire. La valeur plus faible d'ADC dans le péricarpe que dans la solution peut être expliquée en ayant le même raisonnement que dans le précédent paragraphe.

La mesure du coefficient de diffusion réalisée dans les conditions d'imagerie employées dans ce travail de thèse est donc suffisamment sensible pour contrôler les variations de température au sein d'un échantillon mais pas assez sensible pour mesurer l'effet de faibles variations de teneur en eau.

6.3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de caractériser les mécanismes engagés dans le phénomène de relaxation de l'eau contenue dans les tissus végétaux, permettant ainsi de proposer un modèle pour interpréter les résultats de nos expériences mais également dans certains cas, des résultats de la littérature.

Les différents travaux menés sur la tomate ont permis d'estimer la sensibilité des paramètres de relaxation au cours de différents processus tels que les variations de température ou la déshydratation en prenant en compte les différents mécanismes impliqués au cours de ces processus.

La mesure des temps de relaxation transversale à différents temps d'écho permet d'estimer l'impact des échanges chimiques. Ainsi à 1.5T, une faible variation de T_2 avec le temps d'écho indique généralement une faible valeur du pH de l'échantillon mesuré, tandis qu'à l'inverse de fortes variations indiqueraient plutôt un pH neutre. Il serait alors possible d'imaginer un protocole de suivi des variations de pH non-destructif, par exemple au cours de la maturation des fruits pour de faibles changements de concentration en sucre. L'utilisation d'un champ magnétique plus intense permettrait d'observer une courbe de dispersion présentant des amplitudes de variations également plus fortes, rendant ainsi l'estimation de la valeur de k_b par ajustement du modèle de Carver-Richards plus précise. Il serait alors possible de déterminer les variations de pH au sein de l'échantillon compte-tenu de la forte dépendance du paramètre k_b vis-à-vis de ce dernier.

Nous avons vu que les variations de T_2 mesurées au cours de certains processus pouvaient être complexes en raison des effets liés à la composition et à ceux liés à la relaxation de surface. Néanmoins les résultats de la simulation (chap.3), ont montré qu'un choix adapté des différents paramètres expérimentaux permet de favoriser l'accès à certaines informations. Par exemple, une mesure des temps de relaxation à haut champ et pour des temps d'écho longs permettra d'atteindre une sensibilité des T_2 vis-à-vis de la concentration plus élevée qu'à bas champ et pour des TE courts. Néanmoins cette solution n'est pas adaptée aux tissus présentant une forte porosité compte tenu des artefacts de susceptibilité magnétiques qui sont amplifiés à haut champ.

La précision de l'estimation des T_2 dépend, en plus du RSB et de l'échantillonnage de la courbe de relaxation, des outils mathématiques utilisés pour l'ajustement des données expérimentales. La méthode d'estimation des T_2 à l'échelle du voxel, à l'aide de cartographie pourrait être couplée à la classification, ce qui permettrait de comparer les variations de T_2 au sein d'une même classe et pas à l'échelle d'une région d'intérêt. Les variations observées seraient alors plus représentatives.

Les variations de l'ADC dans la gamme de concentration observée dans les tissus végétaux sont de faible amplitude. Cependant, l'ADC permettait en théorie d'accéder à l'information sur la teneur en eau si la précision de la mesure est suffisamment élevée et si le temps diffusion Δ est suffisamment court (assurant l'insensibilité de l'ADC à la structure). Ceci pourrait être faisable sur des systèmes d'imagerie avec des gradients de champ magnétique plus intenses. Le développement d'une séquence de mesure CPMG pondérée par la diffusion, permettrait d'accéder à des cartographies D- T_2 et ainsi d'assigner des valeurs de coefficients de diffusion à des compartiments hydriques, permettant ainsi une estimation plus précise de la teneur en eau à l'échelle subcellulaire. Cette perspective est très intéressante puisqu'il n'existe pas aujourd'hui de technique permettant de mesurer la teneur en eau dans des compartiments hydriques.

VALORISATION DU TRAVAIL EFFECTUE DANS LE CADRE DE CETTE THESE

7.1. PUBLICATIONS:

Leforestier R, Mariette F, Musse M. Impact of chemical exchange on transverse relaxation at low and moderate magnetic field strengths for sugar solutions representative of fruit tissues analyzed by simulation and MRI experiments. J. Magn. Reson. 2021: 322, 106872. DOI: 10.1016/j.jmr.2020.106872

R. Leforestier, F. Mariette, M. Musse, MRI study of temperature dependence of multi-exponential transverse relaxation times in tomato. **Soumis en décembre 2020 à: Applied Magnetic Resonance. Processus de révision en cours.**

7.2. COMMUNICATIONS:

Leforestier R, Musse M, Mariette F. Temperature dependence of T_2 relaxation times in fresh tomato pericarp. International Conference on Magnetic Resonance Microscopy (ICMRM) 18-22/08 2019, Paris, FR.

Leforestier R, Mariette F, Collewet G, Musse M. Impact of chemical exchanges on the water transverse relaxation of fruit tissues measured by magnetic resonance imaging. **Accepté pour une présentation orale à: International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science (MRFood) 2020, Aarhus, DK. Conférence reportée à 2022 cause de la crise sanitaire**

REFERENCES

- [1] R. Damadian, Tumor detection by nuclear magnetic resonance, *Science*, 171 (1971) 1151-1153.
- [2] P. Lauterbur, Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance, (1973).
- [3] P. Mansfield, A. Maudsley, Medical imaging by NMR, *The British journal of radiology*, 50 (1977) 188-194.
- [4] H.A. Pooya, B. Seguin, R.L. Tucker, P.R. Gavin, K.M. Tobias, Magnetic resonance imaging in small animal medicine: clinical applications, *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, (2004).
- [5] B. Hills, C. Clark, Quality assessment of horticultural products by NMR, *Annual Reports on NMR spectroscopy*, 50 (2003) 76-121.
- [6] M. Musse, H. Van As, NMR Imaging of Air Spaces and Metabolites in Fruit and Vegetables, *Modern Magnetic Resonance*, (2017) 1-15.
- [7] H. Van As, T. Scheenen, F.J. Vergeldt, MRI of intact plants, *Photosynthesis Research*, 102 (2009) 213.
- [8] H. Van As, J. van Duynhoven, MRI of plants and foods, *Journal of magnetic resonance*, 229 (2013) 25-34.
- [9] F. Mariette, A. Davenel, P. Marchal, B. Chaland, Etude de l'eau par RMN et IRM dans les procédés laitiers, *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, 53 (1998) 521-525.
- [10] P. Coussot, Imagerie par résonance magnétique appliquée aux matériaux du génie civil, *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, 53 (1998) 527-529.
- [11] T. Bultreys, W. De Boever, V. Cnudde, Imaging and image-based fluid transport modeling at the pore scale in geological materials: A practical introduction to the current state-of-the-art, *Earth-Science Reviews*, 155 (2016) 93-128.
- [12] M. Mantle, A. Sederman, Dynamic MRI in chemical process and reaction engineering, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1 (2003) 3-60.
- [13] E.L. Hahn, Spin Echoes, *Physical Review*, 80 (1950) 580-594.
- [14] S. Meiboom, D. Gill, Modified spin - echo method for measuring nuclear relaxation times, *Review of scientific instruments*, 29 (1958) 688-691.
- [15] M. Hammer, Simplified pulse diagram of the spin echo sequence., in: S.p.d.o.t.s.e. sequence. (Ed.), <http://xrayphysics.com/sequences.html>, 2014.

- [16] M. Hammer, Pulse diagram of the spin echo sequence, now including the spatial localization gradients., in: n.i.t.s.l.g. Pulse diagram of the spin echo sequence (Ed.), <http://xrayphysics.com/sequences.html>, 2014.
- [17] N. Bloembergen, E.M. Purcell, R.V. Pound, Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption, *Physical review*, 73 (1948) 679.
- [18] S. Akoka, Une introduction à la RMN, Université de Nantes, 2020.
- [19] A.M. Bernard, J.D. De Certaines, J.J. Le Jeune, Résonance Magnétique Nucléaire, Masson, 1988.
- [20] P.T. Callaghan, Principles of nuclear magnetic resonance microscopy, Oxford University Press on Demand, 1993.
- [21] J.P. Dillenseger, E. Moerschel, Guide des technologies de l'imagerie médicale et de la radiothérapie: quand la théorie éclaire la pratique, Elsevier Masson, 2009.
- [22] J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, A.G. Palmer III, N.J. Skelton, Protein NMR spectroscopy: principles and practice, Elsevier, 1995.
- [23] D. Fabri, M.A. Williams, T.K. Halstead, Water T2 relaxation in sugar solutions, *Carbohydrate research*, 340 (2005) 889-905.
- [24] B. Hills, The proton exchange cross-relaxation model of water relaxation in biopolymer systems, *Molecular Physics*, 76 (1992) 489-508.
- [25] J. Snaar, NMR of Porous Bio-systems, 2002.
- [26] J.R. Zimmerman, W.E. Brittin, Nuclear Magnetic Resonance Studies in Multiple Phase Systems: Lifetime of a Water Molecule in an Adsorbing Phase on Silica Gel, *The Journal of Physical Chemistry*, 61 (1957) 1328-1333.
- [27] J. Carver, R. Richards, A general two-site solution for the chemical exchange produced dependence of T2 upon the Carr-Purcell pulse separation, *Journal of Magnetic Resonance* (1969), 6 (1972) 89-105.
- [28] F. Bloch, Nuclear Induction, *Physical Review*, 70 (1946) 460-474.
- [29] H.C. Torrey, Bloch equations with diffusion terms, *Physical review*, 104 (1956) 563.
- [30] E. Hahn, D. Maxwell, Spin echo measurements of nuclear spin coupling in molecules, *Physical Review*, 88 (1952) 1070.
- [31] H.M. McConnell, Reaction rates by nuclear magnetic resonance, *The Journal of chemical physics*, 28 (1958) 430-431.
- [32] Z. Luz, S. Meiboom, Nuclear magnetic resonance study of the protolysis of trimethylammonium ion in aqueous solution—order of the reaction with respect to solvent, *The Journal of Chemical Physics*, 39 (1963) 366-370.

- [33] A. Allerhand, H. Gutowsky, Spin-echo studies of chemical exchange. II. Closed formulas for two sites, *The Journal of chemical physics*, 42 (1965) 1587-1599.
- [34] B. Hills, S. Takacs, P. Belton, The effects of proteins on the proton NMR transverse relaxation times of water: I. Native bovine serum albumin, *Molecular Physics*, 67 (1989) 903-918.
- [35] B. Hills, S. Takacs, P.S. Belton, The effects of proteins on the proton NMR transverse relaxation time of water: II. Protein aggregation, *Molecular Physics*, 67 (1989) 919-937.
- [36] B. Hills, K. Wright, P.S. Belton, Proton NMR studies of chemical and diffusive exchange in carbohydrate systems, *Molecular Physics*, 67 (1989) 1309-1326.
- [37] B.P. Hills, Nuclear magnetic resonance relaxation studies of proton exchange in methanol–water mixtures, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 86 (1990) 481-487.
- [38] B. Hills, C. Cano, P. Belton, Proton NMR relaxation studies of aqueous polysaccharide systems, *Macromolecules*, 24 (1991) 2944-2950.
- [39] B.P. Hills, B. Remigereau, NMR studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing, *International journal of food science & technology*, 32 (1997) 51-61.
- [40] B. Hills, K. Nott, NMR studies of water compartmentation in carrot parenchyma tissue during drying and freezing, *Applied Magnetic Resonance*, 17 (1999) 521-535.
- [41] A.D. Stock, Phd Thesis, in, University of California, Santa Barbara, 1974.
- [42] R. Leforestier, F. Mariette, M. Musse, Impact of chemical exchange on transverse relaxation at low and moderate magnetic field strengths for sugar solutions representative of fruit tissues analyzed by simulation and MRI experiments, *Journal of magnetic resonance*, 322 (2021) 106872.
- [43] H. Eyring, The activated complex in chemical reactions, *The Journal of Chemical Physics*, 3 (1935) 107-115.
- [44] B. Hills, S. Duce, The influence of chemical and diffusive exchange on water proton transverse relaxation in plant tissues, *Magnetic resonance imaging*, 8 (1990) 321-331.
- [45] B. Hills, Multinuclear NMR studies of water in solutions of simple carbohydrates. I. Proton and deuterium relaxation, *Molecular physics*, 72 (1991) 1099-1121.
- [46] N.N. Yadav, J. Xu, A. Bar - Shir, Q. Qin, K.W. Chan, K. Grgac, W. Li, M.T. McMahon, P.C. van Zijl, Natural D - glucose as a biodegradable MRI relaxation agent, *Magnetic resonance in medicine*, 72 (2014) 823-828.
- [47] V. Aroulmoji, M. Mathlouthi, L. Feruglio, E. Murano, M. Grassi, Hydration properties and proton exchange in aqueous sugar solutions studied by time domain nuclear magnetic resonance, *Food chemistry*, 132 (2012) 1644-1650.
- [48] K.R. Brownstein, C. Tarr, Spin-lattice relaxation in a system governed by diffusion, *Journal of Magnetic Resonance* (1969), 26 (1977) 17-24.

- [49] Parenchyma plant cell diagram. Retrieved 15 December, 2020, from <https://www.sciencefacts.net/wp-content/uploads/2020/02/Parenchyma.jpg>
- [50] A. Blicher, K. Wodzinska, M. Fidorra, M. Winterhalter, T. Heimbürg, The temperature dependence of lipid membrane permeability, its quantized nature, and the influence of anesthetics, *Biophysical journal*, 96 (2009) 4581-4591.
- [51] Y. Niu, Y. Xiang, An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress, *Frontiers in plant science*, 9 (2018) 915.
- [52] B. Li-Ping, S. Fang-Gong, G. Ti-Da, S. Zhao-Hui, L. Yin-Yan, Z. Guang-Sheng, Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize, *Pedosphere*, 16 (2006) 326-332.
- [53] P. Belton, R. Ratcliffe, NMR and compartmentation in biological tissues, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 17 (1985) 241-279.
- [54] K.R. Brownstein, C. Tarr, Importance of classical diffusion in NMR studies of water in biological cells, *Physical review A*, 19 (1979) 2446.
- [55] M. Musse, F. De Guio, S. Quéllec, M. Cambert, S. Challos, A. Davenel, Quantification of microporosity in fruit by MRI at various magnetic fields: comparison with X-ray microtomography, *Magnetic resonance imaging*, 28 (2010) 1525-1534.
- [56] G. Winisdorffer, M. Musse, S. Quéllec, A. Barbacci, S.L. Gall, F. Mariette, M. Lahaye, Analysis of the dynamic mechanical properties of apple tissue and relationships with the intracellular water status, gas distribution, histological properties and chemical composition, *Postharvest Biology and Technology*, 104 (2015) 1-16.
- [57] G. Winisdorffer, M. Musse, S. Quéllec, M.-F. Devaux, M. Lahaye, F. Mariette, MRI investigation of subcellular water compartmentalization and gas distribution in apples, *Magnetic resonance imaging*, 33 (2015) 671-680.
- [58] J. Snaar, H. Van As, Probing water compartments and membrane permeability in plant cells by ¹H NMR relaxation measurements, *Biophysical Journal*, 63 (1992) 1654-1658.
- [59] T. Sibgatullin, A. Anisimov, P. De Jager, F. Vergeldt, E. Gerkema, H. Van As, Analysis of diffusion and relaxation behavior of water in apple parenchymal cells, *Biofizika*, 52 (2007) 268-276.
- [60] B. Hills, G. Le Floc'h, NMR studies of non-freezing water in cellular plant tissue, *Food Chemistry*, 51 (1994) 331-336.
- [61] M.E. Gonzalez, D.M. Barrett, M.J. McCarthy, F.J. Vergeldt, E. Gerkema, A.M. Matser, H. Van As, ¹H - NMR study of the impact of high pressure and thermal processing on cell membrane integrity of onions, *Journal of food science*, 75 (2010) E417-E425.
- [62] C. Sorin, M. Musse, F. Mariette, A. Bouchereau, L. Leport, Assessment of nutrient remobilization through structural changes of palisade and spongy parenchyma in oilseed rape leaves during senescence, *Planta*, 241 (2015) 333-346.

- [63] M. Musse, K. Bidault, S. Quellec, B. Brunel, G. Collewet, M. Cambert, N. Bertin, Spatial and temporal evolution of quantitative magnetic resonance imaging parameters of peach and apple fruit—relationship with biophysical and metabolic traits, *The Plant Journal*, 105 (2021) 62-78.
- [64] H. Adriaensen, M. Musse, S. Quellec, A. Vignaud, M. Cambert, F. Mariette, MSE-MRI sequence optimisation for measurement of bi-and tri-exponential T2 relaxation in a phantom and fruit, *Magnetic resonance imaging*, 31 (2013) 1677-1689.
- [65] C.J. Clark, L.N. Drummond, J. Mac Fall, Quantitative NMR imaging of kiwifruit (*actinidia deliciosa*) during growth and ripening, *Journal of Science and Food Agriculture*, 78 (1998) 349-358.
- [66] M. Musse, S. Quellec, M. Cambert, M.-F. Devaux, M. Lahaye, F. Mariette, Monitoring the postharvest ripening of tomato fruit using quantitative MRI and NMR relaxometry, *Postharvest Biology and Technology*, 53 (2009) 22-35.
- [67] A. Raffo, R. Gianferri, R. Barbieri, E. Brosio, Ripening of banana fruit monitored by water relaxation and diffusion 1H-NMR measurements, *Food Chemistry*, 89 (2005) 149-158.
- [68] M. Mortensen, A.K. Thybo, H.C. Bertram, H.J. Andersen, S.B. Engelsen, Cooking effects on water distribution in potatoes using nuclear magnetic resonance relaxation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (2005) 5976-5981.
- [69] H. Van As, Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long distance water transport, *Journal of Experimental Botany*, 58 (2006) 743-756.
- [70] F. Mariette, S. Rodriguez, T. Lucas, P. Marchal, Influence de la déshydratation sur la répartition cellulaire de l'eau étudiée par relaxation RMN, in: *Les produits alimentaires et l'eau*, Agoral 99, Edition Tec & Doc, Nantes, 1999, pp. 417-422.
- [71] B.P. Hills, B. Remigereau, NMR studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing, *Int J Food Sci Technol*, 32 (1997).
- [72] M. Musse, M. Cambert, F. Mariette, NMR study of water distribution inside tomato cells: effects of water stress, *Applied Magnetic Resonance*, 38 (2010) 455-469.
- [73] F. Xu, X. Jin, L. Zhang, X.D. Chen, Investigation on water status and distribution in broccoli and the effects of drying on water status using NMR and MRI methods, *Food Research International*, 96 (2017) 191-197.
- [74] F.J. Vergeldt, H. Van As, L. van der Weerd, M.M.A.E. Claessens, T.J. Schaafsma, T. Ruttink, Quantitative NMR microscopy of osmotic stress responses in maize and pearl millet, *Journal of Experimental Botany*, 52 (2001) 2333-2343.
- [75] C. Sorin, F. Mariette, M. Musse, L. Leport, F. Cruz, J.-C. Yvin, Leaf Development Monitoring and Early Detection of Water Deficiency by Low Field Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in *Nicotiana tabacum* Plants, *Applied Sciences*, 8 (2018) 943.
- [76] C.J. Clark, L.N. Drummond, J.S. MacFall, Quantitative nmr imaging of kiwifruit (*actinidia deliciosa*) during growth and ripening, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78 (1998) 349-358.

- [77] C. El-Hajj, S. Moussaoui, G. Collewet, M. Musse, Multi-exponential Transverse Relaxation Times Estimation from Magnetic Resonance Images under Rician Noise and Spatial Regularization, *IEEE Transactions on Image Processing*, (2020).
- [78] J.M. Bonny, M. Zanca, J.Y. Boire, A. Veyre, T2 maximum likelihood estimation from multiple spin - echo magnitude images, *Magnetic resonance in medicine*, 36 (1996) 287-293.
- [79] F. Mariette, J. Guillement, C. Tellier, P. Marchal, Continuous relaxation time distribution decomposition by MEM, in: *Data handling in science and technology*, Elsevier, 1996, pp. 218-234.
- [80] O. Brihuega-Moreno, F.P. Heese, L.D. Hall, Optimization of diffusion measurements using Cramer-Rao lower bound theory and its application to articular cartilage, *Magnetic Resonance in Medicine*, 50 (2003) 1069-1076.
- [81] D.A. Yablonskiy, E.M. Haacke, Theory of NMR signal behavior in magnetically inhomogeneous tissues: the static dephasing regime, *Magnetic resonance in medicine*, 32 (1994) 749-763.
- [82] M. Musse, L. De Franceschi, M. Cambert, C. Sorin, F. Le Caherec, A. Burel, A. Bouchereau, F. Mariette, L. Leport, Structural changes in senescing oilseed rape leaves at tissue and subcellular levels monitored by nuclear magnetic resonance relaxometry through water status, *Plant physiology*, 163 (2013) 392-406.
- [83] J.M. Harvey, M.C. Symons, The hydration of monosaccharides—an NMR study, *Journal of Solution Chemistry*, 7 (1978) 571-586.
- [84] E.L. Kovrigin, J.G. Kempf, M.J. Grey, J.P. Loria, Faithful estimation of dynamics parameters from CPMG relaxation dispersion measurements, *Journal of magnetic resonance*, 180 (2006) 93-104.
- [85] B. Hills, *Magnetic resonance imaging in food science*, (1998).
- [86] T.J. Swift, R.E. Connick, NMR - relaxation mechanisms of O17 in aqueous solutions of paramagnetic cations and the lifetime of water molecules in the first coordination sphere, *The Journal of Chemical Physics*, 37 (1962) 307-320.
- [87] H. Adriaensen, M. Musse, S. Quellec, A. Vignaud, M. Cambert, F. Mariette, MSE-MRI sequence optimisation for measurement of bi- and tri-exponential T2 relaxation in a phantom and fruit., *Magn Reson Imaging*, 31 (2013) 1677-1689.
- [88] H.Y. Carr, E.M. Purcell, Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance experiments, *Phys. Rev.*, 94 (1954) 630-638.
- [89] M. Symons, J. Benbow, J. Harvey, Hydroxyl-proton resonance shifts for a range of aqueous sugar solutions, *Carbohydrate Research*, 83 (1980) 9-20.
- [90] K. Szutkowski, P. Stilbs, S. Jurga, Proton chemical exchange in aqueous solutions of dodecylammonium chloride: Effects of micellar aggregation, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111 (2007) 15613-15619.
- [91] P. Muller, *Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994)*, *Pure and Applied Chemistry*, 66 (1994) 1077-1184.

- [92] S. Aime, R. Nano, M. Grandi, A new class of contrast agents for magnetic resonance imaging based on selective reduction of water-T2 by chemical exchange, *Investigative radiology*, 23 (1988) S267-270.
- [93] H. Van As, J. van Duynhoven, MRI of plants and foods, *Journal of Magnetic Resonance*, 229 (2013) 25-34.
- [94] L. Van Der Weerd, M.M.A.E. Claessens, C. Efdé, H. Van As, Nuclear magnetic resonance imaging of membrane permeability changes in plants during osmotic stress, *Plant, Cell & Environment*, 25 (2002) 1539-1549.
- [95] M. Musse, K. Bidault, S. Quéllec, B. Brunel, G. Collewet, M. Cambert, N. Bertin, Spatial and temporal evolution of quantitative magnetic resonance imaging parameters of peach and apple fruit—relationship with biophysical and metabolic traits, *The Plant Journal*, (2020).
- [96] B.P. Hills, K.P. Nott, NMR studies of water compartmentation in carrot parenchyma tissue during drying and freezing, *Appl Magn Reson*, 17 (1999) 521-535.
- [97] R. Leforestier, F. Mariette, M. Musse, Impact of chemical exchange on transverse relaxation at low and moderate magnetic field strengths for sugar solutions representative of fruit tissues analyzed by simulation and MRI experiments, *Journal of magnetic resonance*, (2020) 106872.
- [98] P. Ilík, M. Špundová, M. Šicner, H. Melkovičová, Z. Kučerová, P. Krchňák, T. Fürst, K. Večeřová, K. Panzarová, Z. Benediktyová, Estimating heat tolerance of plants by ion leakage: a new method based on gradual heating, *New Phytologist*, 218 (2018) 1278-1287.
- [99] P. Ahmad, M.N.V. Prasad, Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change, Springer Science & Business Media, 2011.
- [100] F.P. Duval, M. Cambert, F. Mariette, NMR study of tomato pericarp tissue by spin-spin relaxation and water self-diffusion, *Applied Magnetic Resonance*, 28 (2005) 29.
- [101] D. Legland, M.F. Devaux, B. Bouchet, F. Guillon, M. Lahaye, Cartography of cell morphology in tomato pericarp at the fruit scale, *Journal of Microscopy*, 247 (2012) 78-93.
- [102] T.A. Sibgatullin, P.A. de Jager, F.J. Vergeldt, E. Gerkema, A.V. Anisimov, H. Van As, Combined analysis of diffusion and relaxation behavior of water in apple parenchyma cells, *Biophysics*, 52 (2007) 196-203.
- [103] J. Hou, Y. Zhang, Y. Sun, N. Xu, Y. Leng, Prediction of Firmness and pH for “Golden Delicious” Apple Based on Elasticity Index from Modal Analysis, *Journal of food science*, 83 (2018) 661-669.
- [104] C. Agius, S. von Tucher, B. Poppenberger, W. Rozhon, Quantification of sugars and organic acids in tomato fruits, *MethodsX*, 5 (2018) 537-550.
- [105] T.F. Scientific. Avizo Software for Materials Science. from <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/industrial/electron-microscopy/electron-microscopy-instruments-workflow-solutions/3d-visualization-analysis-software/avizo-materials-science.html>
- [106] H. Donker, H. Van As, H. Edzes, A. Jans, NMR imaging of white button mushroom (*Agaricus bisporis*) at various magnetic fields, *Magnetic resonance imaging*, 14 (1996) 1205-1215.

[107] J.-P. Renaudin, C. Deluche, C. Cheniclet, C. Chevalier, N. Frangne, Cell layer-specific patterns of cell division and cell expansion during fruit set and fruit growth in tomato pericarp, *Journal of Experimental Botany*, 68 (2017) 1613-1623.

[108] S. Le Feunteun, F. Mariette, Impact of casein gel microstructure on self-diffusion coefficient of molecular probes measured by ^1H PFG-NMR, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (2007) 10764-10772.

Titre : Etat hydrique des tissus végétaux mesuré par IRM

Mots clés : IRM, relaxation, T2 multi-exponentiels, échanges chimiques, diffusion, fruits.

Résumé : L'objectif de cette thèse était d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la relaxation de tissus végétaux en prenant en compte la composition du contenu cellulaire et la microstructure des tissus. L'effet de la température, du pH et de la teneur en soluté sur les temps de relaxation T_2 ont été décrits dans le cas de solutions de sucres simples, en première approximation du contenu vacuolaire de fruits charnus. Cela a permis de mettre en évidence, l'impact non négligeable des effets des échanges chimiques sur la relaxation à 1.5T dans des conditions d'imagerie. Par la suite, les effets combinés des échanges chimiques et de la structure compartimentée sur les paramètres de relaxation des tissus végétaux ont été étudiés en prenant la tomate comme modèle de fruit charnu.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés aux changements induits par des variations de température dans de gammes de températures où l'intégrité cellulaire est maintenue, la taille des compartiments et la concentration vacuolaire étant supposée constantes au cours de ce processus. Enfin, l'influence de la taille des cellules ainsi que de la teneur en eau a été abordée grâce à l'étude de l'impact de la déshydratation sur des tissus de tomate. Ce travail a permis d'estimer la sensibilité des paramètres de relaxation au cours de ces différents processus, permettant ainsi de proposer une interprétation des variations de T_2 observées, prenant en compte les divers mécanismes impliqués.

Title : Water status in plant tissues measured by MRI

Keywords : MRI, relaxation, multi-exponential T2, chemical exchanges, diffusion, fruits.

Abstract : The main objective of this PhD thesis was to improve the understanding of the mechanisms involved in the relaxation of plant tissues by taking into account the composition of cell content and tissue microstructure. The effect of temperature, pH and solute content on T_2 relaxation times has been described in the case of solutions of simple sugars, as a first approximation of the vacuolar content of fleshy fruits. This made it possible to highlight the non-negligible impact of the effects of chemical exchanges on relaxation at 1.5T under imaging conditions. Subsequently, the combined effects of chemical exchange and compartmental structure on the relaxation parameters of plant tissues were studied using the tomato as a model of fleshy fruit.

In the framework of this study, we were interested in the changes induced by temperature variations in temperature ranges where cellular integrity is maintained, the size of the compartments and the vacuolar concentration being assumed constant during this process. Finally, the influence of cell size as well as water content was addressed through the study of the impact of dehydration on tomato tissues. This work made it possible to estimate the sensitivity of the relaxation parameters during these different processes, thus making it possible to propose an interpretation of the T_2 variations observed, taking into account the various mechanisms involved.