



HAL
open science

Approche combinée d'IRM, d'histologie et de modélisation pour étudier la distribution des ressources dans l'architecture de la plante : cas de la tomate et de la réponse au déficit hydrique

Jeanne Simon

► To cite this version:

Jeanne Simon. Approche combinée d'IRM, d'histologie et de modélisation pour étudier la distribution des ressources dans l'architecture de la plante : cas de la tomate et de la réponse au déficit hydrique. Autre [q-bio.OT]. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT : 2021AVIG0365 . tel-03651857

HAL Id: tel-03651857

<https://theses.hal.science/tel-03651857v1>

Submitted on 26 Apr 2022

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.



THÈSE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ

École Doctorale N° 536
Agrosciences et Sciences

Mention de doctorat :
Biologie

UR1115 Plantes et Systèmes de Culture Horticoles,
INRAE Avignon
UMR5221 Laboratoire Charles Coulomb, UM/CNRS

Présentée par
Jeanne Simon

Approche combinée d'IRM, d'histologie et de modélisation pour étudier la distribution des ressources dans l'architecture de la plante - cas de la tomate et de la réponse au déficit hydrique

Soutenue publiquement le 25/03/2021 devant le jury composé de :

M. Hervé Cochard, DR, INRAE Clermont-Ferrand **Rapporteur**
Mme Maja Musse, CR-HDR, INRAE Rennes **Rapporteuse**
Mme Delphine Luquet, CR, CIRAD **Examinatrice**
M. Laurent Urban, Pr, Avignon Université **Examinateur**
Mme Nadia Bertin, DR, INRAE Avignon **Co-directrice de thèse**
M. Christophe Goze-Bac, DR, CNRS **Co-directeur de thèse**

RÉSUMÉ

Face à l'évolution du climat et à la raréfaction d'un certain nombre de ressources, les stress biotiques et abiotiques sont de plus en plus fréquents et de nouvelles stratégies doivent être mises en place dans l'étude du développement et du fonctionnement de la plante. Les ressources en eau et carbone sont des déterminants majeurs de la croissance des fruits, dont la quantification à des échelles temporelles et spatiales variables est un enjeu majeur. Parmi les nombreuses méthodes permettant de quantifier leurs flux, la plupart sont destructives ou indirectes. La démocratisation d'une technologie non invasive basée sur l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) donnant accès à des mesures précises de qualité et quantité des flux dans la plante, permettrait de dépasser les limites des approches actuelles en écophysiologie végétale. Ce travail de thèse porte sur la tomate, une plante modèle et le second fruit le plus consommé dans le monde. Le principal objectif était de développer et d'appliquer des méthodes IRM pour mesurer les flux d'eau dans la plante de tomate. Le second objectif était de coupler ces investigations IRM à des approches histologiques afin d'évaluer les liens structure-fonction des tissus conducteurs. Le troisième enjeu était d'utiliser la modélisation comme outil d'intégration des connaissances acquises afin d'identifier des traits anatomiques et fonctionnels potentiellement impliqués dans la plasticité génétique et environnementale des déterminants des flux. Pour répondre à ces questionnements, nous avons combiné mesures histologiques à différentes échelles de la plante (pédicelle et tige), expérimentations IRM réalisées sur un scanner IRM de 9,4T et modélisation écophysiologique de la tomate pour intégrer les résultats. Nous avons mis en évidence une forte variabilité génétique de la surface des tissus conducteurs à l'entrée des fruits ainsi qu'une réduction en réponse au déficit hydrique. Ces variations contribuaient à expliquer en partie la variabilité de masse fraîche et de matière sèche des fruits. Une méthode IRM basée sur le principe d'entrée de coupe a été développée puis appliquée à différents niveaux de la tige principale en condition témoin et en conditions de déficit hydrique. Nous avons mis en évidence une réduction des flux xylémiens le long de la tige principale qui s'explique par une diminution de la surface active du bas vers le haut de la tige, alors que la vitesse du flux est relativement stable. Enfin, nous avons utilisé un modèle structure fonction afin d'intégrer les principaux résultats obtenus, notamment concernant la conductivité théorique déduite des mesures IRM. Cette intégration a clairement montré l'importance de mesurer *in situ* les flux et les potentiels hydriques pour mieux estimer les conductances dans le xylème. Cette exploration a permis de développer un cadre conceptuel dans le but d'étudier de manière non destructive les flux d'eau chez la tomate et chez d'autres espèces. Ce travail ouvre également des perspectives afin de mesurer des flux phloémiens ainsi que des flux au niveau du pédicelle du fruit, qui sont des données importantes pour améliorer les modèles d'allocation des ressources dans la plante.

Mots-clefs : IRM, *Solanum lycopersicum*, xylème, phloème, flux, histologie, modélisation

ABSTRACT

In the face of climate change and the scarcity of a certain number of resources, biotic and abiotic stresses are increasingly frequent and new strategies must be implemented in the study of plant development and functioning. Water and carbon resources are major determinants of fruit growth, and quantifying them at variable temporal and spatial scales is a major challenge. Among the many methods used to quantify their flows, most are destructive or indirect. The democratization of a non-invasive technology based on Magnetic Resonance Imaging (MRI) giving access to precise measurements of flows, both in quality and quantity, in the plant, would allow to overcome the limits of current approaches in plant ecophysiology. This work focuses on the tomato, a model plant and the second most consumed fruit in the world. The main objective of this thesis work was to develop and apply MRI methods to measure water fluxes in the tomato plant. The second objective was to couple these MRI investigations to histological approaches in order to evaluate the structure-function links of conductive tissues. The third challenge was to use modeling as a tool for integrating the acquired knowledge in order to identify anatomical and functional traits potentially involved in the genetic and environmental plasticity of flow determinants. In response to these questions, we combined histological measurements at different plant scales (pedicel and stem), MRI experiments performed on a 9.4T MRI scanner and tomato ecophysiological modeling to integrate the results. We showed that the high genetic and water deficit-induced variability of the surface of the conductive tissues at the fruit entry partially explained the variability of fresh and dry mass of the fruits. A flow-MRI method based on the inflow principle was developed and then applied at different levels of the main stem and to study the plant's response to water deficit. We demonstrated a reduction in xylem flow along the main stem due to a decrease in the active surface area from the bottom to the top of the stem, while the flow velocity was relatively stable. Finally, we used a structure function model to integrate the main results obtained, in particular concerning the theoretical conductivity deduced from MRI measurements. This integration has clearly shown the importance of measuring flows and water potentials *in situ* to better estimate the conductances in the xylem network. This exploration has allowed the development of a conceptual framework for the non-destructive study of water fluxes in tomato and other species. This work also opens perspectives to measure phloem flows as well as flows at the fruit pedicel level, which are important data to improve mechanistic models of resource allocation in the plant.

Keywords : MRI, *Solanum lycopersicum*, xylem, phloem, flux, histology, modeling

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je souhaiterais remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Un grand merci à Maja Musse et Hervé Cochard d'avoir accepté le rôle de rapporteur, ainsi qu'à Delphine Luquet et Laurent Urban, les examinateurs.

Je tiens à remercier chaleureusement Nadia Bertin et Christophe Goze-Bac, mes deux directeurs de thèse, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir offert l'opportunité de faire cette thèse. Nadia, merci en particulier pour ta disponibilité, ton écoute et tes précieux conseils. Christophe, merci en particulier pour ta bonne humeur et pour ta patience. Tous les deux très complémentaires, vous avez formé une super équipe. Vous m'avez énormément appris et je vous en suis très reconnaissante.

Un très grand merci à Gilles Vercambre, merci pour ton accompagnement pendant cette thèse, ton aide m'a été essentielle tout au long de ces trois ans.

Merci également à Jean-Luc Verdeil, les discussions que nous avons pu avoir au sujet de mon travail m'ont beaucoup aidé.

Un grand merci à Alexandra Jullien, Maja Musse, Michel Génard, Hélène Gautier et Jean-Marie Bonny, pour vos remarques et conseils lors de mes comités de thèse et autres réunions scientifiques. Vos regards neufs sur mes travaux m'ont aidée à mieux définir mes objectifs de thèse et je garderai un bon souvenir des échanges scientifiques que nous avons pu avoir.

Enfin, merci à la fondation Agropolis et à tous les scientifiques du projet APLIM.

J'aimerais maintenant remercier mes collègues, les BioNanos.

Un très grand merci à Maïda, le coeur d'APLIM, la pro de l'installation des plantes dans l'IRM, BAC+20 en installation LEGO et surtout ton aide indispensable au bon déroulement des manip. Rahima, ma bi préférée, merci de m'avoir autant fait rire pendant ces trois ans avec tes Rahimades (petite pensée à la zitoune de Ténérife, sans doute la meilleure...), hebek okthi. Merci pour tout les Zlabibi. Merci beaucoup à Marion, la meilleure maman métalleuse, merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et tes encouragements pendant la rédaction. Merci à Eric Alibert pour ton aide précieuse pendant ces trois ans. Merci à Seb et Coco pour votre générosité, merci aussi à Amandine, Eric, Dominique, Anwar et Michel, mais aussi à Guillaume, Pauline, Claire, Audrey et Alexie. Encore merci à Christophe de maintenir une si bonne ambiance dans ce labo. Il nous reste tellement de choses à faire ensemble : le Canigou, le char à voile, la cargolade, une conférence croisière et peut-être même construire un nid géant. Vous allez tous me manquer.

Je tiens également à remercier l'unité PSH. Un grand merci à Béatrice Brunel de s'être occupée de l'élevage des plantes sans qui je n'aurais pas pu faire toutes ces expérimentations. Merci à Pierre Valsesia pour toute son aide avec PlaNet et Fruit Virtuel. Merci à Guillaume Garcia d'avoir fait de nombreuses fois le trajet Avignon-Montpellier pour m'apporter les plantes. Merci à Valérie Serra grâce à qui j'ai pu faire les mesures de photosynthèse.

Je remercie également la plateforme PHIV du CIRAD, en particulier Christelle Baptiste, Marc Lartaud et Jean-Luc Verdeil. Merci Christelle pour toute ton aide en histologie et Marc pour le développement du plugin sous ImageJ qui m'a été indispensable pendant ces trois ans. J'en profite pour également remercier Thibault Crouzet, qui a beaucoup aidé dans le développement du protocole des mesures histologiques.

Merci à Sami Bouzid et Pascal Etienne du L2C qui ont permis le développement de la puce de micro-fluidique.

Un grand merci à tous mes amis qui sont venus me voir et qui m'ont soutenue pendant ces trois ans : Morgane, mon amie de toujours, mais aussi Elise, Marie, Matthieu et Camille, Marion L., Marion G., Yuna, Elsa, Bertin... Merci également à toute la team rando, à Samantha, Camille et Nolwenn, Anne-So, toutes les personnes qui m'ont suivie de près ou de loin pendant ces trois ans. Merci aussi à John et Marion qui m'ont permis de bien me défouler en compagnie des Zlabibi, même pendant le confinement.

Je tenais également à remercier à nouveau Alexandra Jullien, qui m'a appris énormément par son accompagnement lors de mes stages de Master et qui m'a donnée l'envie de faire une thèse.

Un énorme merci à mes parents, à ma soeur, à Elie et Noémie, à mes grands-parents. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien et vos encouragements.

Merci également à ma deuxième famille : Véro, Gilles, Léon, Mathilde et Sélim, Camille, Olivier.

Pour finir, je tenais à remercier Emile. Merci d'avoir toujours été là pour moi, d'avoir su me booster lorsque je me démotivais, merci pour ta gentillesse sans faille, merci de m'avoir supporté pendant cette période de rédaction... Je vais plagier ta fin de remerciements car c'est réciproque : sans toi je n'en serais pas là.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 5 |
| 1. CONTEXTE GENERAL | 5 |
| 2. TRANSPORT ET FLUX D'EAU CHEZ LA TOMATE | 6 |
| <i>a. Les tissus vasculaires : le xylème et le phloème</i> | 6 |
| <i>b. Transport longitudinaux et radiaux de la sève à travers la tige principale</i> | 8 |
| <i>c. Alimentation du fruit</i> | 9 |
| <i>d. Modélisation des flux dans la plante</i> | 11 |
| <i>e. Mesure des flux d'eau et de sucres dans la plante</i> | 13 |
| 3. L'IRM : UNE TECHNIQUE NON DESTRUCTIVE POUR ETUDIER LES FLUX D'EAU DANS LA PLANTE | 15 |
| <i>a. Principe général</i> | 15 |
| <i>b. Etat de l'art de l'utilisation de l'IRM pour mesurer les flux dans les plantes</i> | 21 |
| 4. QUESTIONS DE RECHERCHE | 25 |
| CHAPITRE I : MATÉRIEL ET DÉVELOPPEMENT MÉTHODOLOGIQUE | 29 |
| 1. MATERIEL VEGETAL | 29 |
| 2. CONDITIONS DES MESURES IRM | 31 |
| 3. CONTROLE DE L'ACTIVITE DE LA PLANTE PENDANT LA MESURE IRM | 33 |
| <i>a. Photosynthèse et transpiration des feuilles en fonction de leur rang le long de la tige</i> | 33 |
| <i>b. Croissance des fruits</i> | 41 |
| 4. IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE | 41 |
| <i>a. Développement méthodologique IRM pour la mesure de la surface active et de la vitesse de flux du transport de sève dans la plante entière</i> | 41 |
| <i>b. Mesure de flux par IRM de contraste de phase</i> | 45 |
| <i>c. Mise en oeuvre des différentes méthodes de flux sur « fantômes »</i> | 49 |
| <i>d. Mesures à l'échelle du pédicelle</i> | 54 |
| <i>e. Les différents types d'expérimentations IRM réalisées au cours de la thèse</i> | 55 |
| 5. HISTOLOGIE | 55 |

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE II : VARIABILITY OF STRUCTURAL TRAITS OF VASCULAR TISSUES IN TOMATO : MODELING AND HISTOLOGICAL INVESTIGATIONS | 59 |
| 1. INTRODUCTION | 60 |
| 2. MATERIAL AND METHODS | 61 |
| <i>a. Plant material and growth conditions</i> | 61 |
| <i>b. Pedicel and fruit growth</i> | 62 |
| <i>c. Histological pipeline to quantify the vascular tissue areas</i> | 62 |
| <i>d. Virtual Fruit model</i> | 62 |
| <i>e. Statistical analysis</i> | 64 |
| 3. RESULTS | 64 |
| <i>a. Histological quantification of vascular tissues along tomato pedicel</i> | 64 |
| <i>b. Assessment of the genotypic variability of pedicel diameter and vascular tissue areas</i> | 64 |
| <i>c. Water deficit impact on the pedicel diameter and vascular tissues of the tomato pedicel in relation to fruit growth</i> | 66 |
| <i>d. Model-based analysis of the contribution of vascular tissues to water deficit impact and to genotypic variability on tomato fruit mass</i> | 68 |
| 4. DISCUSSION | 70 |
| <i>a. The decrease in vascular tissue areas along the pedicel is independent of the presence of an abscission zone</i> | 71 |
| <i>b. Pedicel anatomical traits are worth being phenotyped for screening genetic resources</i> | 71 |
| <i>c. The effect of water deficit on the pedicel anatomy and areas of vascular tissues partially explains its effects on fruit mass and dry matter content</i> | 71 |
| <i>d. Concluding remarks and perspectives</i> | 72 |
| CHAPITRE III : CARACTÉRISATION PAR IRM DES FLUX XYLÉMIENS DANS L'ARCHITECTURE DE LA PLANTE ET MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA RÉPONSE AU DÉFICIT HYDRIQUE | 75 |
| 1. INTRODUCTION | 75 |
| 2. MATERIEL ET METHODES | 76 |
| <i>a. Matériel végétal et conditions expérimentales</i> | 76 |
| <i>b. Mesures histologiques et estimation des conductivités théoriques du xylème</i> | 76 |
| <i>c. Acquisitions IRM</i> | 78 |
| 3. RESULTATS | 80 |
| <i>a. Caractérisation anatomique de la tige</i> | 80 |

| | |
|--|------------|
| <i>b. Caractérisation fonctionnelle du xylème de la tige par IRM</i> | 84 |
| 4. DISCUSSION | 89 |
| CHAPITRE IV : UTILISATION D’UN MODÈLE STRUCTURE-FONCTION POUR INTÉGRER LES DONNÉES ACQUISES PAR IRM ET HISTOLOGIE | 93 |
| 1. INTRODUCTION | 93 |
| 2. MATERIEL ET METHODES | 93 |
| <i>a. Présentation du modèle</i> | 93 |
| <i>b. Estimation des paramètres architecturaux</i> | 96 |
| <i>c. Conditions aux limites</i> | 98 |
| 3. RESULTATS | 98 |
| <i>a. Estimation des paramètres associés à la conductivité hydraulique</i> | 98 |
| <i>b. Simulations des flux et des champs de potentiels hydriques</i> | 99 |
| <i>c. Analyse de sensibilité du modèle vis à vis de la conductivité hydraulique</i> | 106 |
| 4. DISCUSSION | 112 |
| DISCUSSION GENERALE | 115 |
| BIBLIOGRAPHIE | 125 |
| ANNEXES | 137 |

INTRODUCTION GENERALE

1. CONTEXTE GENERAL

Face à l'évolution du climat et à la raréfaction d'un certain nombre de ressources, l'écophysiologie végétale doit permettre de répondre à de nouvelles questions pour permettre à l'agriculture d'adapter ses pratiques et assurer sa durabilité. En effet, les stress biotiques et abiotiques sont de plus en plus fréquents et de nouvelles contraintes doivent être prises en compte dans l'étude du fonctionnement de la plante. La diminution des ressources en eau fait partie des contraintes majeures pour de nombreuses cultures. Une restriction en eau impacte fortement le développement et la croissance de la plante, l'acquisition des ressources hydriques, carbonées et minérales, le rendement et la composition des organes récoltés (Tardieu et al., 2011). La forte variabilité génétique de la réponse des plantes aux contraintes environnementales représente un levier d'adaptation majeur (Ripoll et al., 2016), à condition d'identifier les traits anatomiques ou fonctionnels de cette adaptation, ainsi que les gènes sous-jacents (Chaves et al., 2003 ; Albert et al., 2016). Une autre condition est de pouvoir quantifier les flux d'eau et de carbone dans la plante à des échelles temporelles et spatiales variables et de développer des outils d'intégration des réponses de la plante aux contraintes environnementales.

Améliorer notre capacité à mesurer les flux *in situ* dans la plante est l'un des objectifs du projet APLIM (« Advanced Plant Life Imaging and Metrology ») dans lequel s'inscrit mon travail de thèse. Ce projet étandard soutenu par la fondation Agropolis associe des physiciens, des physiologistes et des écophysiologistes et a pour objectif de développer des technologies de résonance magnétique nucléaire (RMN) et d'imagerie par résonance magnétique (IRM) adaptées à l'étude de la réponse des plantes à des contraintes abiotiques et biotiques. Ma thèse s'insère dans l'un des volets, centré sur l'intégration multi-échelle de l'étude des flux de sève dans la plante en réponse à une contrainte hydrique en combinant mesures *in situ* par IRM et modélisation écophysiologique de la plante. L'utilisation d'une technologie telle que l'IRM, non invasive et non destructive, a pour objectif de dépasser les limites des approches actuelles en physiologie végétale.

Mon travail porte sur la tomate qui est une plante modèle en génétique, physiologie et écophysiologie végétale, de par son cycle de vie relativement court et sa plasticité face aux conditions environnementales. C'est aussi le second fruit le plus consommé dans le monde (FAO, 2018) et une importante source de minéraux et caroténoïdes, en particulier de lycopène, connu pour ses propriétés antioxydantes (Cheng et al., 2017). Le fruit de la tomate est composé de 90 à 95% d'eau (Ho et al., 1987) et est particulièrement sensible au déficit hydrique qui, selon son intensité et la sensibilité génotypique, affecte la nouaison, les processus de croissance et les métabolismes primaires et secondaires, donc le rendement et la qualité de la production (Mitchell et al., 1991a, 1991b ; Ripoll et al., 2014 ; Guichard et al., 2015 ; Albert et al., 2016 ; Ripoll et al., 2016).

Dans ce contexte, mon projet de thèse avait pour objectif principal de développer et appliquer des méthodes IRM pour mesurer les flux d'eau dans la plante et identifier des traits anatomiques et fonctionnels potentiellement impliqués dans la plasticité des réponses à la contrainte hydrique. Le second objectif était d'intégrer les connaissances apportées par l'IRM dans un modèle de fonctionnement de la plante pour mieux prédire la production et la qualité des fruits en réponse à des contraintes environnementales.

2. TRANSPORT ET FLUX D'EAU CHEZ LA TOMATE

a. Les tissus vasculaires : le xylème et le phloème

L'eau et les sucres sont transportés par le réseau de vaisseaux conducteurs de la plante : le xylème et le phloème. La sève transportée dans le xylème, aussi appelée sève brute, est principalement composée d'eau et de minéraux et se dirige des racines vers les organes aériens. Elle est transportée dans les éléments conducteurs du xylème qui sont entourés par un ensemble de cellules parenchymateuses et de fibres ligneuses constituant le tissu xylémien. Le système conducteur du xylème est composé de trachéides et d'éléments de vaisseau; il est formé de cellules « mortes », qui ne contiennent ni membrane ni organelle (Taiz et Zeiger, 2006). Les trachéides sont constituées de cellules allongées et étroites, terminées en biseau, qui se superposent (Figure 0.1) et sont caractéristiques des Gymnospermes. L'eau circule par les nombreuses ponctuations présentes dans la paroi de ces cellules. Les éléments de vaisseaux sont des cellules plus larges et plus courtes que les trachéides (Figure 0.1) et sont caractéristiques de la majorité des Angiospermes (Esau, 1977). A la fin de chacune de ces cellules, se trouvent de nombreuses perforations, qui sont également présentes sur leurs parois latérales. Les éléments de vaisseaux se superposent au niveau des perforations formant alors ce qu'on appelle un vaisseau (Figure 0.1). Ces éléments de vaisseaux peuvent mesurer entre 150 μm et 2 mm de longueur et avoir un diamètre allant de quelques μm jusqu'à presque 1mm (Wenzel et al., 1989 ; Pate et al., 1995). Dans la suite du manuscrit, ce que nous appellerons vaisseaux xylémiens sera bien la superposition des éléments de vaisseaux.

Les sucres sont produits dans les organes photosynthétiques ou organes sources, principalement les feuilles, puis ils sont transportés avec l'eau et d'autres composés tels que les acides aminés, les acides organiques et les sels minéraux vers les organes puits, à travers les tubes criblés du phloème. La sève transportée par le phloème est aussi appelée sève phloémienne ou sève élaborée. Le phloème est une structure complexe composée de cellules parenchymateuses, de cellules compagnes et de tubes criblés (Taiz et Zeiger, 2006). Les cellules compagnes et les tubes criblés sont associés sous forme de complexes (Figure 0.1). Les cellules compagnes sont nécessaires pour que les tubes criblés se chargent en photo-assimilats car elles assurent certaines fonctions métaboliques essentielles qui sont réduites ou perdues lors de la différenciation des tubes criblés (Taiz et Zieger, 2006).

Les tubes criblés sont dix à cent fois plus petits (quelque dizaines de μm de diamètre, avec des cribles de 1 à plus de 10 μm de diamètre et une longueur de l'ordre de 100 μm) que les vaisseaux du xylème et donc le transport phloémien présente une résistance plus grande que le transport xylémien. De plus, la concentration en sucres faisant augmenter la viscosité de la sève (Bussièrès et al., 2011), la sève élaborée, transportée par le phloème, est plus visqueuse que la sève brute, ce qui joue également sur son transport. Chez les dicotylédones, comme la tomate, le xylème et le phloème sont formés au niveau de la zone cambiale de la tige. Du côté extérieur du cambium se trouve le phloème (appelé phloème externe) et de l'autre le xylème (interne). Chez la tomate et les autres Solanaceae, il existe également un autre type de phloème, le phloème interne, situé entre la moelle (centre de la tige) et le xylème. Ces mêmes tissus sont présents dans le pédoncule et dans le pédicelle. La figure 0.2 représente des sections transversales de tiges, de pédoncule et de pédicelle de tomate (génotype WVA106) et illustre la distribution de ces tissus au sein d'une plante de tomate. Le développement des tissus conducteurs est sensible au statut hydrique des plantes. En effet de nombreuses études ont montré qu'un déficit hydrique provoque une diminution de la taille des vaisseaux xylémiens, dans le pédicelle de tomate (Rancic et al., 2008), dans la tige chez la vigne (Lovisolò et Schubert, 1998) et chez le maïs (Abdel-Rahim et al., 1998 ; Liu et al., 2019), ou encore chez le peuplier (Arend et Fromm, 2007). Concernant la tomate cultivée en conditions de déficit hydrique, la conductance du xylème diminue au niveau de la zone d'abscission mais elle augmente

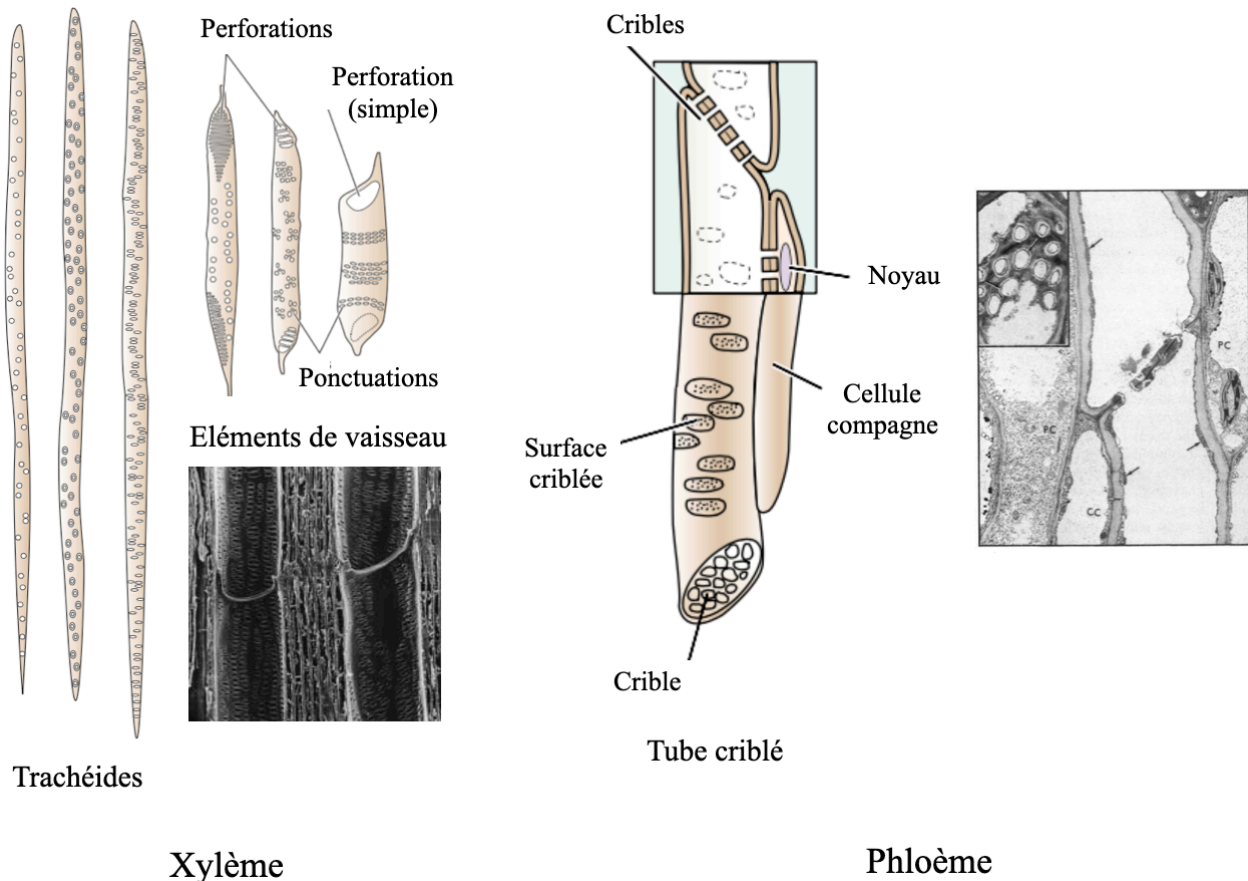


Figure 0.1 : Représentation schématique des éléments conducteurs du xylème et d'un tube criblé du phloème associé à une cellule compagne. Les éléments conducteurs du xylème sont formés par les trachéides et les éléments de vaisseau. Les trachéides sont des cellules mortes, allongées, vides, avec des parois très lignifiées. La paroi contient de nombreuses ponctuations. Les éléments de vaisseaux sont des cellules plus larges et plus courtes que les trachéides et sont connectées entre elles par les perforations. L'assemblage de ces éléments de vaisseaux forme un vaisseau. Sous les schémas des éléments de vaisseaux est représentée une image en microscopie électronique de deux éléments de vaisseaux dans du bois de chêne. De larges ponctuations sont visibles sur les parois (420x) (D'après Zimmermann 1983). Les tubes criblés du phloème sont formés par un assemblage d'éléments de tube criblé. Les cribles entre les différents éléments de tube criblé permettent à la sève élaborée de circuler. La membrane plasmique d'un élément de tube criblé est continue avec celle de l'élément de tube criblé voisin. Chaque élément de tube est associé avec au moins une cellule compagne, qui se charge de l'essentiel des fonctions métaboliques. Ces schémas sont issus et traduits du livre « Plant physiology » de Taiz et Zeiger, 2006. L'image de microscopie électronique (à droite) montre une portion de deux éléments de tubes criblés matures, coupés de manière longitudinale dans un hypocotyle de Potiron (d'après Evert 1982). (3685x) CC : cellule compagne, PC : cellule du parenchyme. L'insert montre des cribles vus de face (4280x). Les cribles ne sont pas obstrués par les P-protéines (indiqués par les flèches)

de part et d'autre de cette zone avec la formation de nouveaux vaisseaux (van Ieperen et al., 2003). Une étude récente sur la tige de pomme de terre combinant IRM et microscopie a mis en évidence que des plantes exposées à un déficit hydrique avait une densité de xylème par unité de surface plus élevée que les plantes témoins, mais un diamètre moyen des vaisseaux xylémiens plus faible lié à un plus grand nombre de vaisseaux étroits et à une diminution du nombre de gros vaisseaux (Aliche et al., 2020). Le nombre et la taille des vaisseaux jouant un rôle sur la conductivité des tissus, il est donc primordial de caractériser finement ces différents tissus à l'échelle des vaisseaux conducteurs.

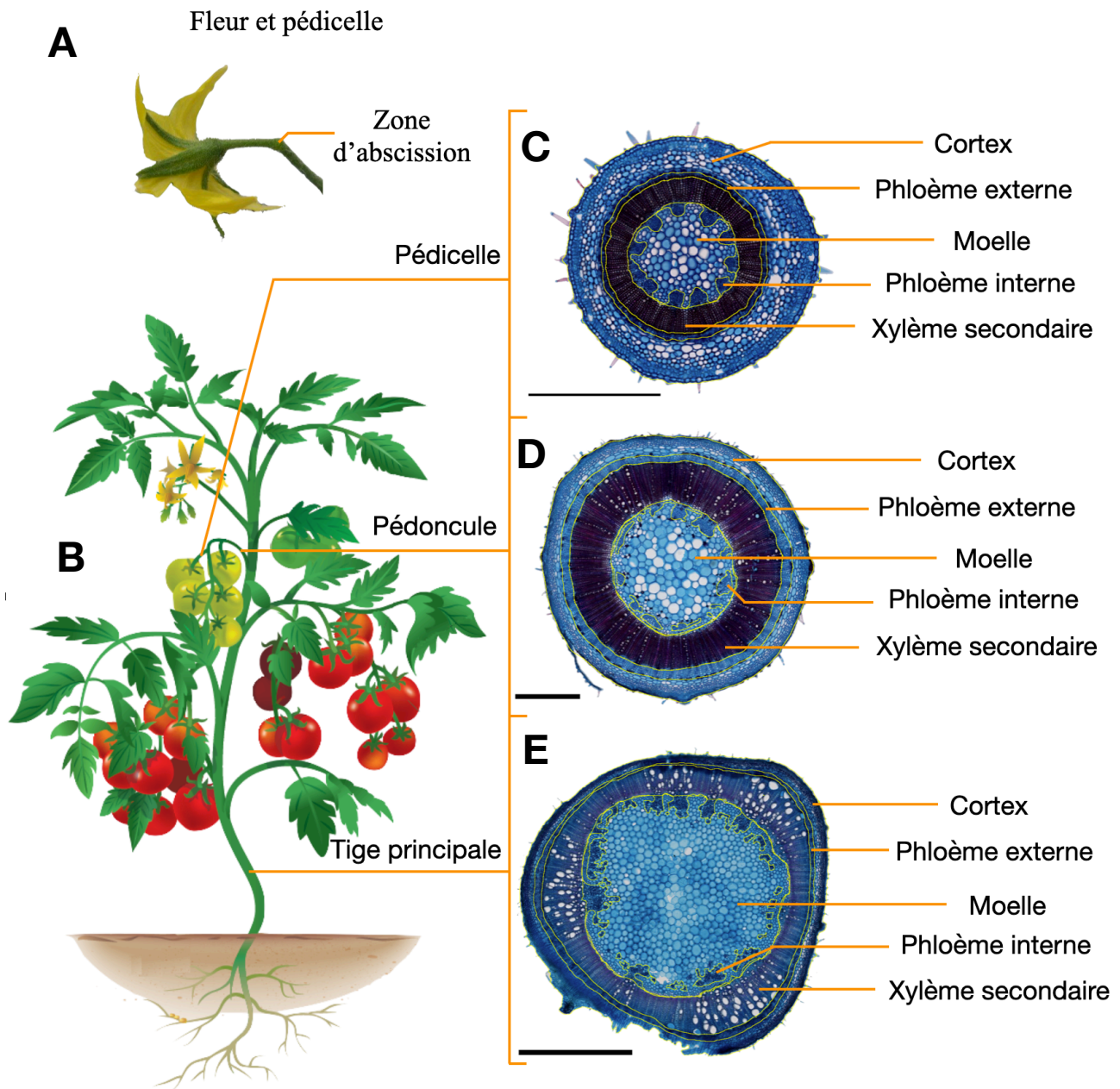


Figure 0.2 : (A) Photo d'une fleur de tomate de génotype WVA106 et de son pédicelle. (B) Représentation schématique d'un plant de tomate avec des fruits rouges matures et des fruits en croissance sur quelques bouquets le long de la tige principale. (C) Section transversale du pédicelle de fruit (côté fruit, donc après la zone d'abscission) (épaisseur de coupe : 60 μm , barre d'échelle : 1 mm). (D) Section transversale du pédoncule du bouquet (épaisseur de coupe : 80 μm , barre d'échelle : 1 mm). (E) Section transversale de la tige principale (épaisseur de coupe : 60 μm , barre d'échelle 2 mm). Ces coupes sont colorées au FASGA (voir Chapitre I) : les zones rouges/roses indiquent des cellules avec des parois lignifiées (xylème secondaire et fibres de soutien) et les zones bleues indiquent les cellules avec des parois non lignifiées cellulosiques (phloème et parenchyme). Les lignes jaunes correspondent à la segmentation des différents types de tissus.

b. Transport longitudinal et radiaux de la sève à travers la tige principale

Le transport de l'eau suit des gradients de potentiel hydrique (ψ_w), du potentiel le plus élevé vers les potentiels les plus faibles. Le transport ascendant de l'eau dans les vaisseaux conducteurs du xylème est entraîné par l'évapotranspiration à la surface des feuilles. Cette théorie appelée « Cohésion-Tension » a été proposée par Dixon et Joly (1895) et est basée sur la tension de l'eau dans les vaisseaux du xylème créée par la transpiration des feuilles et sur la cohésion des molécules d'eau à travers leurs liaisons hydrogènes. Cette théorie est largement acceptée par la communauté

scientifique (Steudle, 2001; Angeles et al., 2004; Cochard, 2006). Il existe cependant des controverses quant à savoir si la colonne d'eau dans le xylème peut supporter les fortes pressions négatives et maintenir ainsi un état stable (Zimmermann et al., 2004).

Contrairement à la sève xylémienne, la sève phloémienne se dirige aussi bien vers le haut (partie apicale en particulier) que vers le bas de la plante (partie racinaire en particulier). Chez la tomate, il a notamment été montré que les bouquets étaient principalement alimentés en photo-assimilats par les feuilles en dessous du bouquet via le phloème interne et dans une moindre mesure par les feuilles au dessus du bouquet, via le phloème externe (Bonnemain, 1968 ; André et al., 1999). Des transports d'assimilats sur de longues distances ont été mis en évidence via des expériences d'ablation de bouquets et de feuilles, suggérant que les deux types de phloème sont impliqués dans l'allocation des ressources vers les fruits (Slack and Calvert 1977; Heuvelink, 1995).

D'après l'hypothèse de Münch (pressure flow hypothesis; Münch, 1930) (Figure 0.3), le flux de sève phloémienne est généré par des gradients de pression de turgescence entre les organes sources et les organes puits (Lacointe, 2000). Au niveau des organes sources, le chargement en sucre engendre une forte augmentation de la pression osmotique phloémienne, entraînant une entrée d'eau de l'apoplasme dans le phloème, participant ainsi à la mise en pression du phloème. A contrario, au niveau des organes puits, le déchargement de sucre entraîne une réduction de la pression osmotique et un flux d'eau du phloème vers l'apoplasme, diminuant la pression de turgescence phloémienne localement. La différence de pression de turgescence entre les organes sources et puits entraîne un flux de sève, les sucres étant alors transportés par flux de masse. Ce gradient résulte du chargement en sucre au niveau des organes source et du déchargement au niveau des organes puits (Figure 0.3).

Contrairement aux flux de sève phloémiens ou xylémiens, les transferts d'eau entre les tubes criblés du phloème et les vaisseaux du xylème ne sont pas des flux longitudinaux mais des flux radiaux. Peu d'études se sont intéressées aux relations entre ces deux tissus conducteurs, pourtant les connexions structurelles et physiologiques qui existent entre ces tissus pourraient être déterminantes dans les relations plante-environnement (Savage et al., 2015).

Il existe également des transports radiaux entre le xylème et les tissus de stockage qui l'entourent. En effet, à la levée du jour, lorsque la plante commence à transpirer, le flux transpiratoire est supérieur au flux d'absorption et des réserves en eau de la plante sont sollicitées. Ces réserves sont principalement associées au parenchyme corticale entourant le xylème. Cette participation des tissus au flux transpiratoire provoque alors une contraction du diamètre de la tige (Hinckley et Bruckerhoff, 1975). Le soir, la transpiration de la plante diminue, ce qui provoque une augmentation du potentiel hydrique du xylème et on observe alors un flux radial du xylème vers le parenchyme, entraînant une augmentation du diamètre de la tige (Molz et Klepper, 1972).

c. Alimentation du fruit

Le fruit de tomate est rattaché au bouquet floral par le pédicelle et le bouquet est rattaché à la plante par le pédoncule (Figure 0.2). La plupart des études écophysiologicals basées sur des méthodes destructives ou indirectes ont mis en évidence que la majorité de l'eau (80 à 90%) qui entre dans le fruit de la tomate passe par les tubes criblés du phloème et les 10 à 20 % restants passent par le xylème (Ehret et Ho, 1986 ; Ho et al., 1987 ; Lang et Thorpe 1989 ; Van Bel, 1990 ; Grange et Andrews, 1995; Plaut et al., 2004; Guichard et al., 2005). Au fur et à mesure du développement du fruit, la contribution du xylème aux flux d'eau vers le fruit diminue (de 8-15% à 1-2% à maturité) (Ho et al., 1987) en lien avec une diminution de la continuité des tissus au niveau de la zone d'abscission.

Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) (Windt et al., 2009), mettant en évidence que la majorité de l'eau entrant dans le fruit était d'origine xylémienne. Dans cette étude cependant, les mesures ont été réalisées à la base du

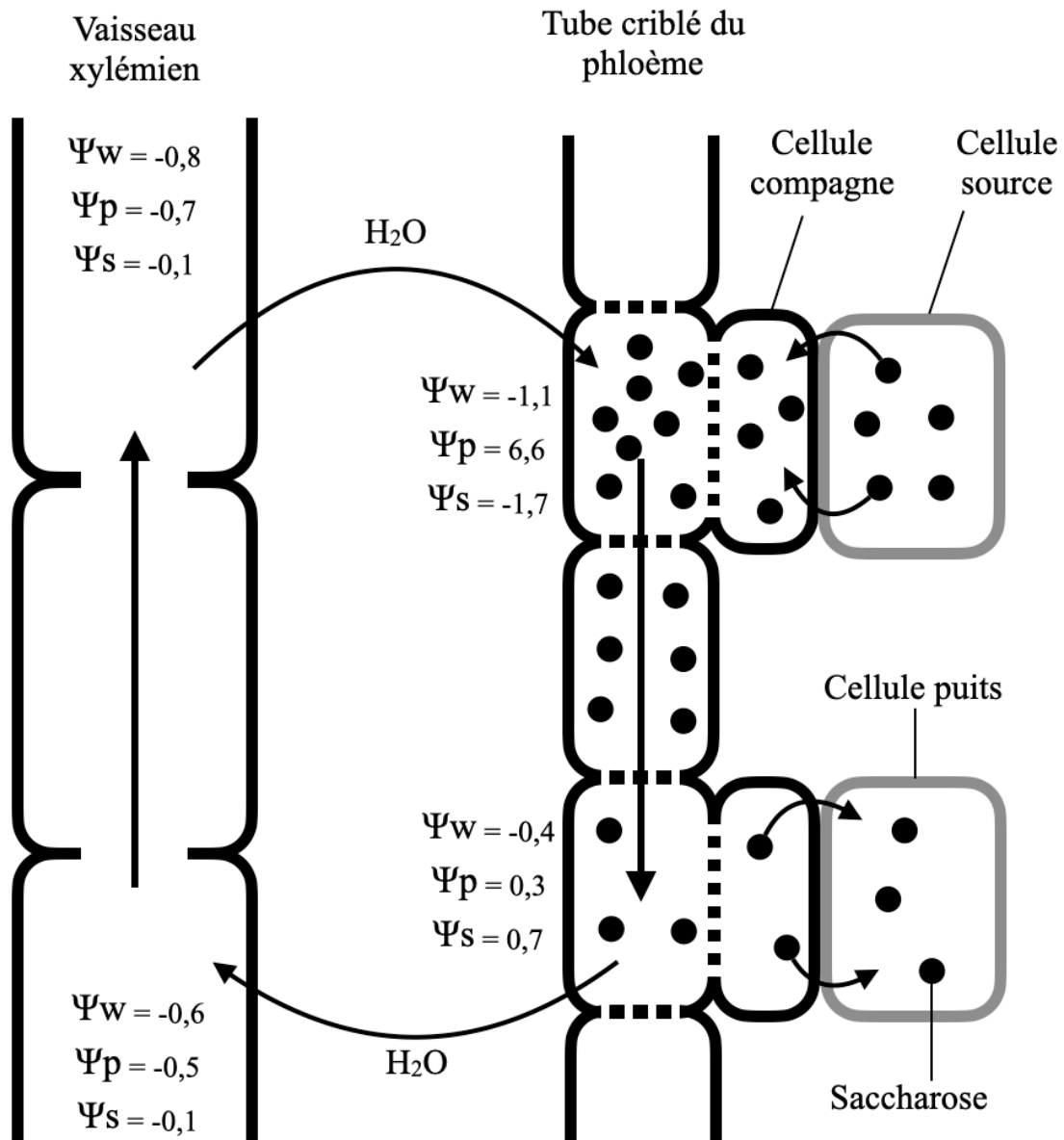


Figure 0.3 : Représentation schématique du modèle issu de l'hypothèse de Münch. Les valeurs du potentiel hydrique total ($\psi_w = \psi_p + \psi_s$), du potentiel hydrostatique (ψ_p) et du potentiel osmotique (ψ_s) sont des valeurs théoriques exprimées en MPa. le flux de sève phloémienne est généré par des gradients de pression de turgescence entre les organes sources et les organes puits. Cette figure a été adaptée du livre de Nobel (1999).

bouquet et pas au niveau du pédicelle. L'alimentation en eau du fruit varie également avec le statut hydrique de la plante. Il a notamment été montré chez la tomate qu'un déficit de pression de vapeur élevé provoque une réduction des flux xylémiens vers le fruit et une augmentation de la transpiration du fruit, sans vraiment impacter l'influx phloémien (Guichard et al., 2005).

Le système vasculaire du pédicelle se développe précocement pendant les phases de développement du bourgeon floral puis, pendant le développement du fruit, la croissance secondaire et la formation de nouveaux vaisseaux provoquent une augmentation de la conductance hydraulique dans le pédoncule et le pédicelle (André et al., 1999; van Ieperen et al., 2003; Rancic et al., 2010). Au niveau de la zone d'abscission (Figure 0.2), la différenciation et la lignification du xylème sont retardées et, comparé au reste du pédicelle, le nombre de vaisseaux différenciés ainsi que leur

surface de section sont plus faibles, ayant pour conséquence une augmentation locale de la résistance hydraulique (Lee, 1989; André et al. 1999; van Ieperen et al., 2003).

Le rôle de la résistance de la zone d'abscission pour limiter les flux xylémiens du fruit vers la plante en situation de déficit hydrique a été largement discuté (Lee, 1989; Guichard et al., 2001; Malone and Andrews, 2001). En effet, la résistance hydraulique de la zone d'abscission augmente en réponse au déficit hydrique contrairement au reste du pédicelle, dans lequel de nouveaux vaisseaux secondaires sont formés (van Ieperen et al., 2003). Dans le pédicelle, le déficit hydrique réduit la surface de xylème mais augmente la proportion de vaisseaux conducteurs de chaque côté de la zone d'abscission (Rancic et al., 2008). Le déficit hydrique en réduisant les flux d'eau vers le fruit et entraîne une réduction du rendement et une modification de la qualité des fruits (Ho et al. 1987 ; Mitchell et al. 1991a; Ripoll et al., 2016).

Au sein du fruit lui-même, l'architecture des vaisseaux conducteurs est assez peu décrite. Une étude basée sur l'utilisation d'un modèle structure-fonction pour étudier l'impact de différents traits architecturaux et biophysiques sur les flux à l'intérieur du fruit de tomate a montré qu'il existe une forte interaction entre la forme du fruit et la densité de vaisseaux conducteurs dans le fruit (Cieslak et al., 2016). Cette interaction est indépendante de la taille du fruit et provoque un gradient important des flux d'eau entre la zone proximale attachée au pédicelle et la zone apicale à l'extrémité du fruit. Herremans et al. (2015) ont mis en évidence par micro-tomographie à rayons X que le système vasculaire dans la pomme est très ramifié et que la longueur cumulée de ce système conducteur passe d'un total de 5 m de long à 9 semaines après floraison à plus de 20 m de long à la fin de la croissance du fruit.

d. Modélisation des flux dans la plante

Les modèles écophysologiques qui simulent le fonctionnement de la plante et de ses organes sont utiles pour intégrer des connaissances, mieux appréhender le comportement de systèmes biologiques complexes et les interactions entre processus opérant aux différentes échelles et en interaction avec l'environnement (Génard et al., 2010). Les grandes lois qui décrivent les flux xylémiens et phloémiens sont représentées sous forme mathématique dans ces modèles. Par exemple, afin de modéliser les flux de sève xylémien, une analogie ohmique est utilisée : une valeur de conductance moyenne est associée à chaque organe et les conductances sont traitées en série (Tyree et Ewers 1991 ; Cruziat et al., 2001). Le flux d'eau entre deux points dépend de la différence de potentiel hydrique entre ces deux points et de la conductance hydraulique qui est une caractéristique du niveau de résistance au flux :

$$F_{AB} = k_{hAB} \times (\psi_A - \psi_B) = k_{hAB} \times \Delta\psi_{AB} \quad (\text{eq. 0.1})$$

avec F_{AB} le flux d'eau entre A et B ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), k_{hAB} la conductance hydraulique ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$), ψ_A et ψ_B les potentiels hydriques aux points A et B (MPa) et $\Delta\psi_{AB}$ la différence de potentiel entre A et B (MPa). La conductance hydraulique entre A et B (k_{hAB}) est égale à la conductivité hydraulique (K_{hAB}) divisée par la distance entre A et B (m). K_{hAB} est un indicateur de la résistance au transfert et de l'efficacité avec laquelle la sève brute circule le long du xylème.

Ces lois ont été intégrées au modèle fruit virtuel initialement développé pour la pêche (Fishman and Génard, 1998) et adapté à la tomate (Liu et al., 2007). Il a été utilisé pour concevoir des idéotypes de fruit adaptés à la contrainte hydrique et a conduit à l'hypothèse que la conductance des tissus conducteurs pourrait être un trait d'adaptation permettant de concilier croissance et qualité chez la tomate en cas de déficit hydrique (Constantinescu et al., 2016). Le modèle Fruit Virtuel est un modèle biophysique de l'expansion du fruit, qui a été étendu pour décrire les flux d'eau longitudinaux dans le pédicelle et les flux longitudinaux et radiaux dans le fruit (Hall et al., 2013) (Figure 0.4). Récemment, Constantinescu et al. (2020) se sont intéressés à la modélisation des flux

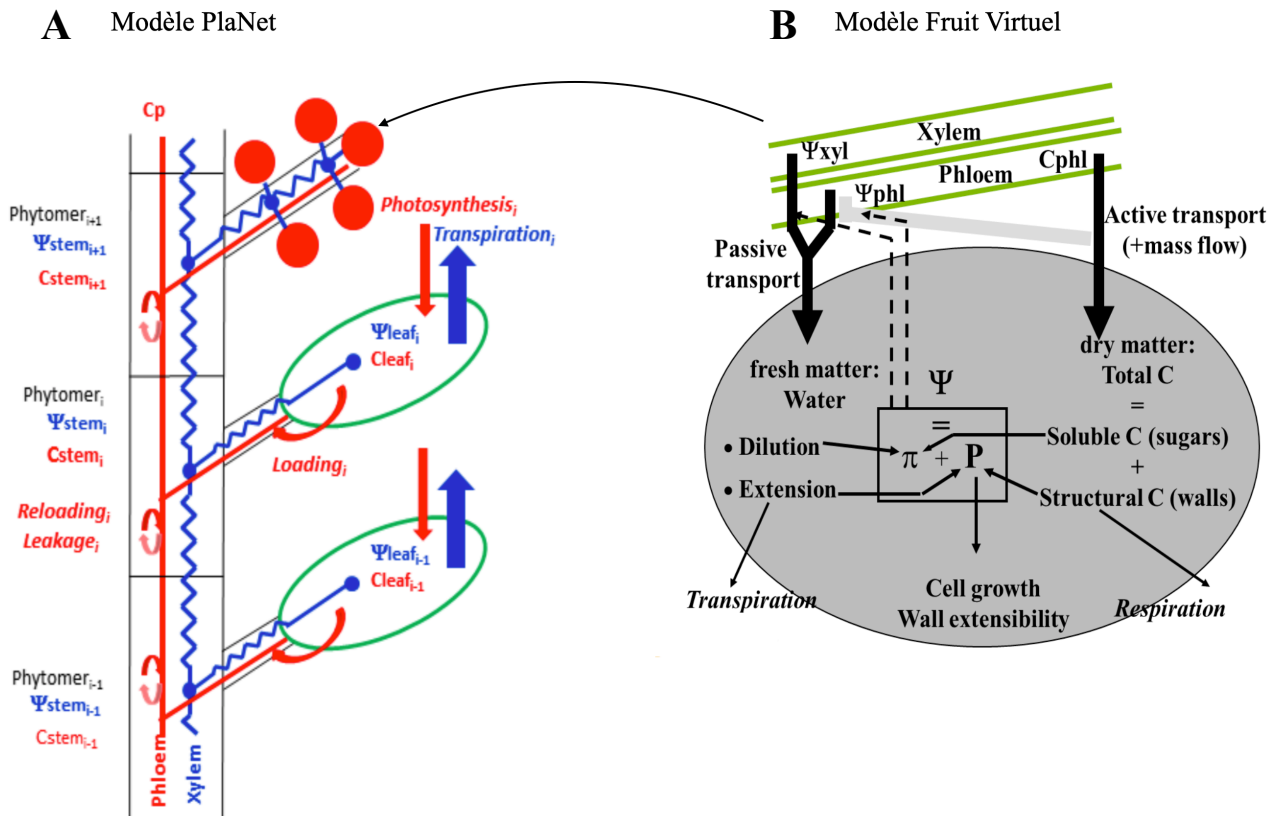


Figure 0.4 : (A) Représentation schématique de la modélisation de l'acquisition des ressources et de leur transfert dans la plante dans le modèle structure-fonction PlaNet, figure issue de Baldazzi et al. (2013). Chaque fruit du modèle PlaNet est un modèle fruit Virtuel, modèle biophysique de l'expansion du fruit, représenté schématiquement (B) (Fishman et Génard, 1998 ; Liu et al., 2007). Avec ψ le potentiel hydrique, π le potentiel osmotique, P le potentiel hydrostatique ou pression de turgescence et C la concentration carbone.

de sucre et d'eau entre le pédicelle et le fruit en utilisant un modèle proche du Fruit Virtuel. Ils ont montré que les échanges bi-directionnels entre le phloème et le xylème pourraient réguler les flux journaliers de sucre vers le fruit et réduire les variations de disponibilité en sucre dans le pédicelle, tandis que la re-circulation du transport de l'eau entre le xylème et le fruit via le phloème permettrait de réduire les pertes d'eau du fruit vers le xylème en milieu de journée. Dans le modèle Fruit Virtuel, les conductances phloémienne et xylémienne sont paramétrées de façon empirique, en faisant l'hypothèse qu'elles sont proportionnelles à la surface du fruit et que ces conductances sont constantes le long du pédicelle. Une autre approche de modélisation des flux d'eau dans le pédicelle et dans le fruit de tomate a suggéré que la résistance du pédicelle et la conductivité du phloème, liée à la viscosité de la sève, pourraient limiter l'importation d'eau dans le jeune fruit en croissance (Bussièrès 2002 ; Bussièrès et al., 2011).

Le modèle Fruit virtuel a été couplé à un modèle structure-fonction qui relie l'architecture de la plante, l'assimilation spatialisée du carbone et des flux transpiratoires, entraînant des transferts d'eau et les apports de carbone dans la plante (Baldazzi et al., 2013; Najla et al., 2009) (Figure 0.4). La croissance de chaque fruit présent sur la plante est alors simulée par le modèle de Fruit virtuel. Le modèle est capable de prédire la distribution des ressources hydriques et leurs variations à travers l'architecture de la plante, au travers d'un arbre des flux et des potentiels hydriques. La concentration en sucre phloémienne est supposé uniforme dans la plante. Le modèle permet de prédire l'impact de l'environnement sur les flux d'eau et la disponibilité en carbone dans la plante, ainsi que les potentiels hydriques et osmotiques associés (Baldazzi et al. 2013). L'évaluation et la

validation d'un tel modèle dépend de l'acquisition de données qui peuvent être difficiles à mesurer expérimentalement.

Des données expérimentales sont donc nécessaires pour évaluer et valider les hypothèses de ces modèles mécanistes, aussi bien à l'échelle fruit qu'à l'échelle plante. En particulier des données quantitatives sur les surfaces de tissus conducteurs, la conductance et les flux permettraient de mieux valider ces modèles ainsi que d'améliorer leur calibration. Les résultats expérimentaux pourraient également permettre de mieux formaliser et expliciter certaines fonctions associées à l'acquisition ou au transfert des ressources. Ces modèles, outils d'intégration pour simuler les flux dans des conditions de stress environnemental, permettraient alors de mieux appréhender le fonctionnement de la plante sous différentes contraintes abiotiques.

e. Mesure des flux d'eau et de sucres dans la plante

Les flux xylémiens et phloémiens sont très sensibles aux variations de gradients de potentiels hydriques ou osmotiques dans la plante, ce qui rend leur évaluation difficile (Tixier, 2013 ; Van Bel, 2003). C'est pourquoi des méthodes non invasives ont été développées pour mesurer les flux d'eau dans les plantes. Les plus classiques utilisent des capteurs de variations de diamètre de tige ou bien des capteurs de flux de sève qui mesurent la vitesse ou la densité du flux de sève en se basant sur la dissipation thermique d'une source de chaleur (Smith et Allen 1996 ; Vandegehutchte and Steppe, 2013 ; De Swaef et al., 2015). La mesure des variations de diamètre de tige est un indicateur de l'état hydrique des plantes (Huguet et al., 1985 ; Gallardo et al., 2006 ; De Swaef et Steppe, 2010). Par exemple, en condition de déficit hydrique, la tension du xylème augmente et les tissus qui stockent l'eau se déchargent plus qu'en condition témoin, ce qui provoque une contraction plus forte du diamètre de la tige (De Swaef et al., 2009). La combinaison des mesures de diamètre de tige aux mesures de flux de sève permet une bonne évaluation du statut hydrique de la plante (De Swaef et al., 2010, 2012, figure 0.5). Chez la tomate, les flux de sève xylémienne mesurés en bas de la tige varient entre environ 10 g.h⁻¹ la nuit et plus de 200 g.h⁻¹ la journée. Ces flux varient également en fonction de la saison, avec des flux significativement plus élevés au printemps qu'en automne (1108 g.jour⁻¹ contre 859 g.jour⁻¹) (De Swaef, 2011).

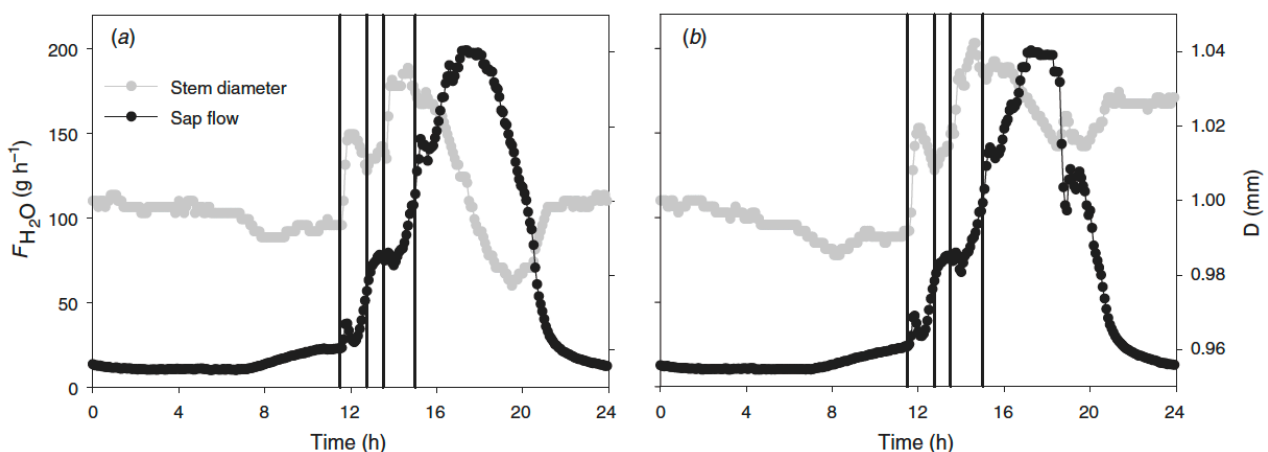


Figure 0.5 : Mesures simultanées des variations de diamètre de la tige de tomate (D, en gris) et du flux de sève xylémienne (F_{H_2O} , en noir) pendant deux jours consécutifs (Jour 132 (a) et jour 133 (b)). Les mesures sont effectuées au bas de la tige. Les lignes verticales indiquent les irrigations. Figure issue de De Swaef et Steppe (2010).

Les entrées d'eau dans le fruit sont classiquement estimées indirectement par la méthode du *heat girdling*, développée par Lang et Thorpe (1989) et notamment utilisée dans l'étude de Guichard et al. (2005). Cette méthode consiste à détruire le phloème du pédicelle par la chaleur et à comparer la croissance de ces fruits à la croissance de fruits intacts et de fruits détachés (perte d'eau uniquement liée à la transpiration du fruit) (Guichard et al., 2005). Avec cette méthode, il est alors possible de calculer le flux xylémien et phloémien vers le fruit. Ces auteurs ont estimé un flux entrant dans le fruit de 2,6 g j⁻¹. Ces valeurs sont en accord avec des études qui analysent l'accumulation de carbone et ou de minéraux dans le fruit de tomate (Ho et al., 1987 ; Wolterbeek et al., 1987 ; Plaut et al., 2004). La méthode repose sur le principe que le xylème n'est pas affecté par la chaleur qui détruit le phloème, ce qui a été confirmé par une étude récente basée sur des techniques d'IRM (Van de Wal et al., 2017). Elle a également été utilisée par Hanssens et al. (2015), combinée avec de la modélisation pour étudier l'effet de l'environnement sur les contributions relatives du xylème et du phloème à la croissance des fruits de tomate. Ils ont mis en évidence que la contribution relative du xylème à la croissance des fruits augmente significativement lorsque l'intensité lumineuse diminue. Les simulations montrent un flux xylémien moyen (entre 12h et 18h) égal à 0,19 mg.g⁻¹MF.h⁻¹ en condition de lumière témoin contre 0,62 mg.g⁻¹MF.h⁻¹ en condition d'ombrage. Au niveau des flux phloémiens, les simulations montrent un flux moyen (entre 12h et 18h) égal à 3,2 mg.g⁻¹MF.h⁻¹ en condition de lumière contre 2,4 mg.g⁻¹MF.h⁻¹ en condition d'ombrage. Cette technique suppose cependant que le flux xylémien reste identique, alors même que le flux phloémien est nulle et que les interactions entre les flux xylémien et phloémien sont forts. Cette technique entraîne vraisemblablement un fort biais expérimental.

Des isotopes radioactifs ont également été utilisés depuis longtemps pour suivre les flux de sève phloémienne. Par exemple, Bonnemain (1968) et MacRobbie (1971) ont utilisés le ¹⁴C et Minchin and Thorpe (2003) le ¹¹C pour étudier les flux phloémiens. La visualisation de ces flux est ensuite réalisée par autoradiographie qui est une technique destructive et limitée à des pas de temps relativement courts. Les variations de pression osmotique et de concentration en sucre pendant le chargement/déchargement du phloème peuvent être directement évaluées par stylectomie en utilisant des pucerons au niveau d'un organe source/puits (Najla et al., 2009) mais cette technique est complexe du point de vue expérimental. A l'échelle de la plante, la fluxomique étudie les flux d'éléments et molécules entre divers compartiments/organes et notamment la ré-allocation du carbone (Salon et al., 2017). L'hypothèse de flux de masse pour le transport phloémien a notamment été discutée au regard des échanges de carbone, d'azote et d'eau entre le phloème et le xylème (Salon et al., 2017). Enfin, des méthodes plus récentes telles que la tomographie par émission de position (TEP) appliquées aux plantes permettent de décrypter *in vivo* la fonction du flux d'eau xylémien (à partir de ¹⁵O ou ¹⁸F) et le flux de sève phloémien (avec ¹¹C ou ¹⁸F) permettant une mesure couplée des deux types de flux (Hubeau et Steppe, 2015).

Toutes ces méthodes intègrent les flux sur l'ensemble des tissus de la tige ou du pédicelle, mais ne permettent pas de mesurer les caractéristiques des flux à l'échelle des vaisseaux conducteurs. De plus la plupart de ces études permettent de mesurer un flux mais pas une vitesse, une surface conductrice ou bien une conductivité. Or ce sont des informations nécessaires pour alimenter les modèles.

3. L'IRM : UNE TECHNIQUE NON DESTRUCTIVE POUR ETUDIER LES FLUX D'EAU DANS LA PLANTE

a. Principe général

Spectroscopie et Relaxométrie RMN

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est basée sur les propriétés électromagnétiques du spin du noyau de certains atomes (les plus couramment étudiés étant : ^1H , ^{19}F , ^{23}Na , ^{13}C ...). Dans cette étude, nous travaillons sur l'hydrogène, l'atome le plus communément observé en IRM des plantes, donnant des informations directes sur leur statut hydrique par les mesures de la teneur, la mobilité, le confinement, la physico-chimie... de l'eau dans les tissus des végétaux (Van As, 2007). La RMN nécessite un champ magnétique (B_0) homogène et puissant (Figure 0.6), produit généralement par un aimant supra-conducteur. En l'absence de B_0 , l'orientation des spins des noyaux est aléatoire et la somme des moments magnétiques des spins, autrement dit, l'aimantation M_0 est nulle. Lorsque le champ magnétique B_0 est appliqué le long d'un axe O_z , une levée de dégénérescence des niveaux énergétiques des spins apparaît, induisant l'apparition d'une aimantation M_z précessant autour de cet axe O_z à la fréquence de Larmor (ω_0), égale à :

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \quad (\text{eq. 0.2})$$

où γ représente le rapport gyromagnétique qui est spécifique au noyau étudié. Dans le cas du proton, $\gamma = 267,513 \cdot 10^6 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$, ce qui donne dans le cas de nos travaux à $B_0 = 9,4 \text{ T}$ une

fréquence de Larmor égale à $\omega_0 = \frac{267,513 \cdot 10^6}{2\pi} \cdot 9,4 \text{ Hz} = 400,21 \text{ MHz}$.

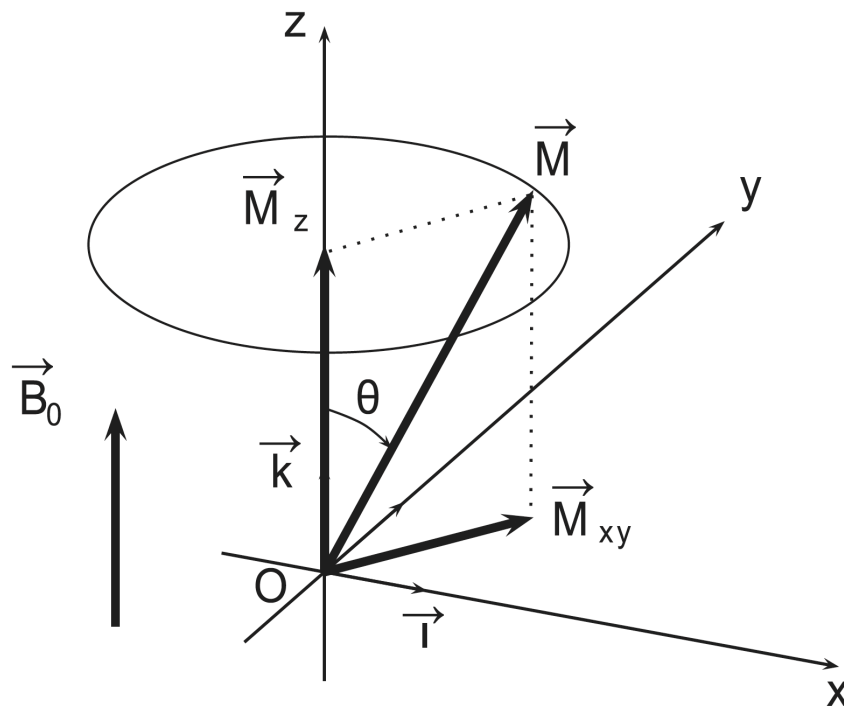


Figure 0.6 : Trajectoire de l'aimantation \vec{M} en présence d'un champ B_0 . Composantes longitudinale (\vec{M}_z) et transversale (\vec{M}_{xy}) de l'aimantation. θ représente l'angle azimutal, \vec{B}_0 champ magnétique statique, x, y, z repère orthonormé du laboratoire.

L'équilibre thermodynamique de l'ensemble des spins peut être perturbé par une impulsion de radio fréquence (RF) B_1 à la fréquence de Larmor permettant ainsi d'induire une aimantation transversale M_{xy} dans un plan perpendiculaire à B_0 en mettant l'aimantation de l'ensemble des spins en phase. Cette impulsion RF est produite par une bobine placée autour de l'échantillon. Cette même bobine est utilisée dans une deuxième étape pour mesurer la composante de l'aimantation M_{xy} appelée le signal RMN, lors de la relaxation du système de spins et de son retour à l'équilibre au cours du temps (t).

La figure 0.7 illustre cette dernière étape de relaxation exécutée par le système de spins lors d'une expérimentation RMN. Ce phénomène de relaxation correspond à une décroissance exponentielle de la composante de l'aimantation M_{xy} après l'impulsion RF lorsque l'aimantation de l'ensemble des spins se déphase et retourne progressivement à son état d'équilibre le long de B_0 . Cette relaxation est caractérisée par des constantes de temps appelées temps de relaxation magnétique nucléaire T_1 et T_2 . Le temps de relaxation T_1 implique un échange d'énergie entre les protons et l'environnement moléculaire dans lequel ils se trouvent (spin-réseau). Le temps de relaxation T_2 implique un échange d'énergie inter protons (spin-spin). Ces deux mécanismes de relaxation provoquent une diminution de l'aimantation sur le plan transversal M_{xy} (qui dépend de T_2) et une augmentation de l'aimantation sur l'axe longitudinal M_z (qui dépend de T_1), selon les équations suivantes (Brown et al., 2014) :

$$\vec{M} = \begin{cases} M_z(t) = M_0 \cdot (1 - e^{-t/T_1}) \\ M_x(t) = M_0 \cdot \cos(\omega_0 t) \cdot e^{-t/T_2} \\ M_y(t) = M_0 \cdot \sin(\omega_0 t) \cdot e^{-t/T_2} \end{cases} \quad (\text{eq. 0.3})$$

T_1 est donc qualifié de temps de relaxation longitudinale (temps pour que M_z retourne à 63% de sa valeur maximale M_0) et T_2 de temps de relaxation transversal (temps pour que M_{xy} retourne à 37% de sa valeur initiale). Les courbes de retour à l'équilibre de ces deux temps de relaxation sont représentés figure 0.7.

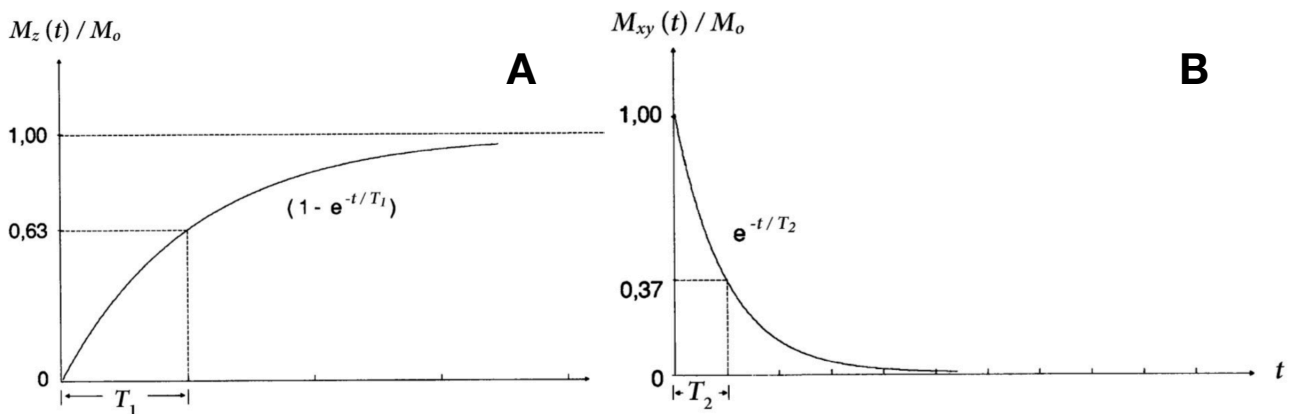


Figure 0.7 : Courbes de retour à l'équilibre de l'aimantation (A) et courbe de disparition de l'aimantation le long de l'axe M_{xy} (B). Le T_1 correspond au temps que l'aimantation longitudinale (M_z) met pour retourner à 63% de sa valeur maximale M_0 . Le temps de relaxation transversale, ou T_2 , correspond au temps nécessaire pour que l'aimantation transversale (M_{xy}) retourne à 37% de sa valeur initiale.

Toutes les expérimentations IRM présentées dans ce manuscrit sont des séquences dites de spin-echo (Figure 0.8). Cette séquence schématisée sur la figure 0.9 consiste en une première impulsion à 90° suivant l'axe y' , qui est donc perpendiculaire à B_0 et appliquée à la fréquence de Larmor. Elle fait basculer l'aimantation en x' . Si l'impulsion est ajustée pour réaliser une déviation de 90° , la composante de l'aimantation M_z devient alors nulle et celle en $M_{x'}$ devient maximale c'est-à-dire égale à M_0 . Par la suite, on observe une décroissance du signal liée au déphasage et à la relaxation dû au mouvement Brownien des spins. Une seconde impulsion après un délai $TE/2$, cette fois-ci à 180° suivant l'axe x' vient inverser l'aimantation dans le plan $x'y'$. Un écho de spin est ainsi formé après un délai $TE/2$. On appelle TE le temps d'écho. Par la suite, la séquence d'impulsion est répétée après un délai T_R , nommé Temps de Répétition. Le signal peut être décrit par :

$$M_{x'y'} = M_0 \cdot (1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}}) \cdot e^{-\frac{TE}{T_2}} \quad (\text{eq. 0.4})$$

Selon les tissus étudiés, on observe de fortes variations des valeurs d'aimantation M_0 et des temps de relaxation T_1 et T_2 plus ou moins courts. Ainsi, il a été montré chez les plantes que M_0 peut être utilisé pour quantifier la teneur en eau des tissus et que les distributions de T_1 et de T_2 sont liées aux tailles des cellules et à la mobilité et au transport de l'eau dans les tissus xylémiens et phloémiens (Windt et al., 2009; Musse et al., 2009). Chez les plantes, les différents temps de relaxation peuvent être plus ou moins attribués à l'eau comprise dans la vacuole (T_1 et T_2 longs), à l'eau comprise dans le cytoplasme ($T_1 > T_2$, plus courts que les temps de relaxation dans la vacuole) ou bien à l'eau comprise dans les parois des cellules ou dans les espaces extra-cellulaires (T_2 dépend fortement de la teneur en eau de ces compartiments et vont d'autour de 5 ms jusqu'à des centaines de ms) (Snaar et Van As, 1992; Van Dusschoten et al., 1995; Van As, 2007). Cette diversité des temps de relaxation permet d'obtenir des contrastes entre les tissus (Figure 0.10).

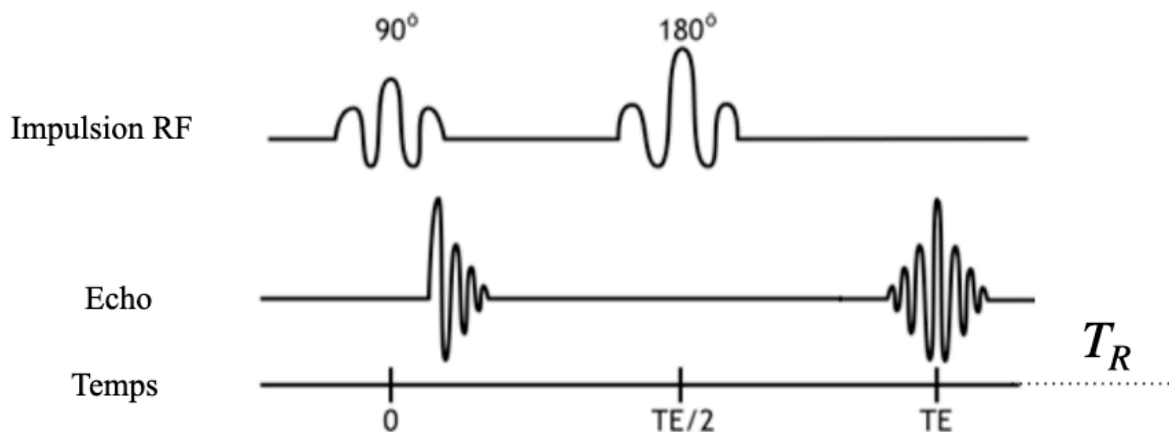


Figure 0.8 : Séquence de spin-écho. Temps d'écho TE et temps de répétition T_R .

Signal et bruit en RMN

Le signal RMN est obtenu par la détection de la composante transversale M_{xy} . En effet, seule cette composante transversale de l'aimantation crée un flux magnétique qui peut être détecté par une bobine de réception. La force électromotrice intégrée sur le volume de l'échantillon induit un signal électrique qui est amplifié, digitalisé, filtré... puis exploité en RMN et IRM. Ce signal temporel analysé dans le domaine fréquentiel après transformée de Fourier est enregistré avec un

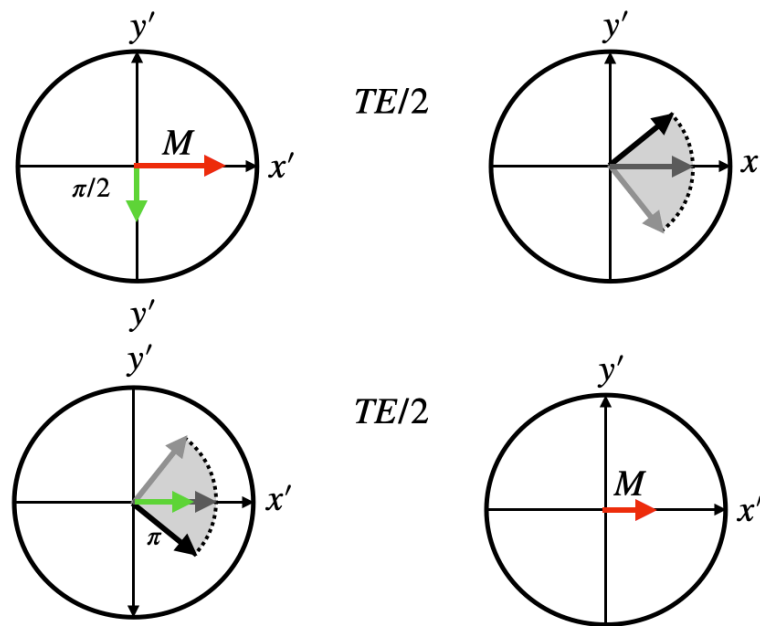


Figure 0.9 : Séquence de spin-écho. Temps d'écho TE. Le vecteur vert représente les impulsions RF et les vecteurs rouges, gris et noirs représentent la trajectoire de l'aimantation. On observe une décroissance de l'aimantation dans le plan liée au déphasage et à la relaxation T_2 .

bruit dont les sources peuvent être multiples. Dans l'ordre d'importance, on a le bruit thermique, bruit de la chaîne d'amplification, pollution électromagnétique... On définit la qualité d'une expérience par le rapport signal (S) divisé par le bruit (B). Afin d'améliorer ce rapport S/B , on répète N fois l'expérience et on les somme. Le signal étant proportionnel à N et le bruit qui est aléatoire, étant proportionnel à \sqrt{N} , le rapport S/B s'améliore par accumulation et on obtient :

$$S/B \propto \sqrt{N} \quad (\text{eq. 0.5})$$

On définit aussi le contraste (C) sur bruit (B) entre deux signaux (S_A) et (S_B) en divisant leur différence par le bruit :

$$C/B = \left| \frac{S_A - S_B}{B} \right| \quad (\text{eq. 0.6})$$

La « détectabilité » entre les signaux A et B sera d'autant meilleure que le rapport C/B sera élevé.

Imagerie

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique permettant de produire des images paramétriques de l'intérieur d'un organisme de façon non invasive. Cette méthode repose sur les principes de la RMN décrits plus haut avec l'introduction de gradients de champ magnétiques pulsés, (figure 0.11).

L'application de ces gradients le long de trois directions normales, induisent des fréquences de précessions et des déphasages légèrement différents en fonction de la position des spins dans l'échantillon. Il est ensuite possible de construire des images en 2D et 3D de la nature du tissu étudié et s'appuyant sur la transformée de Fourier multidimensionnelle. Cette technique est non invasive et n'irradie par l'organisme analysé.

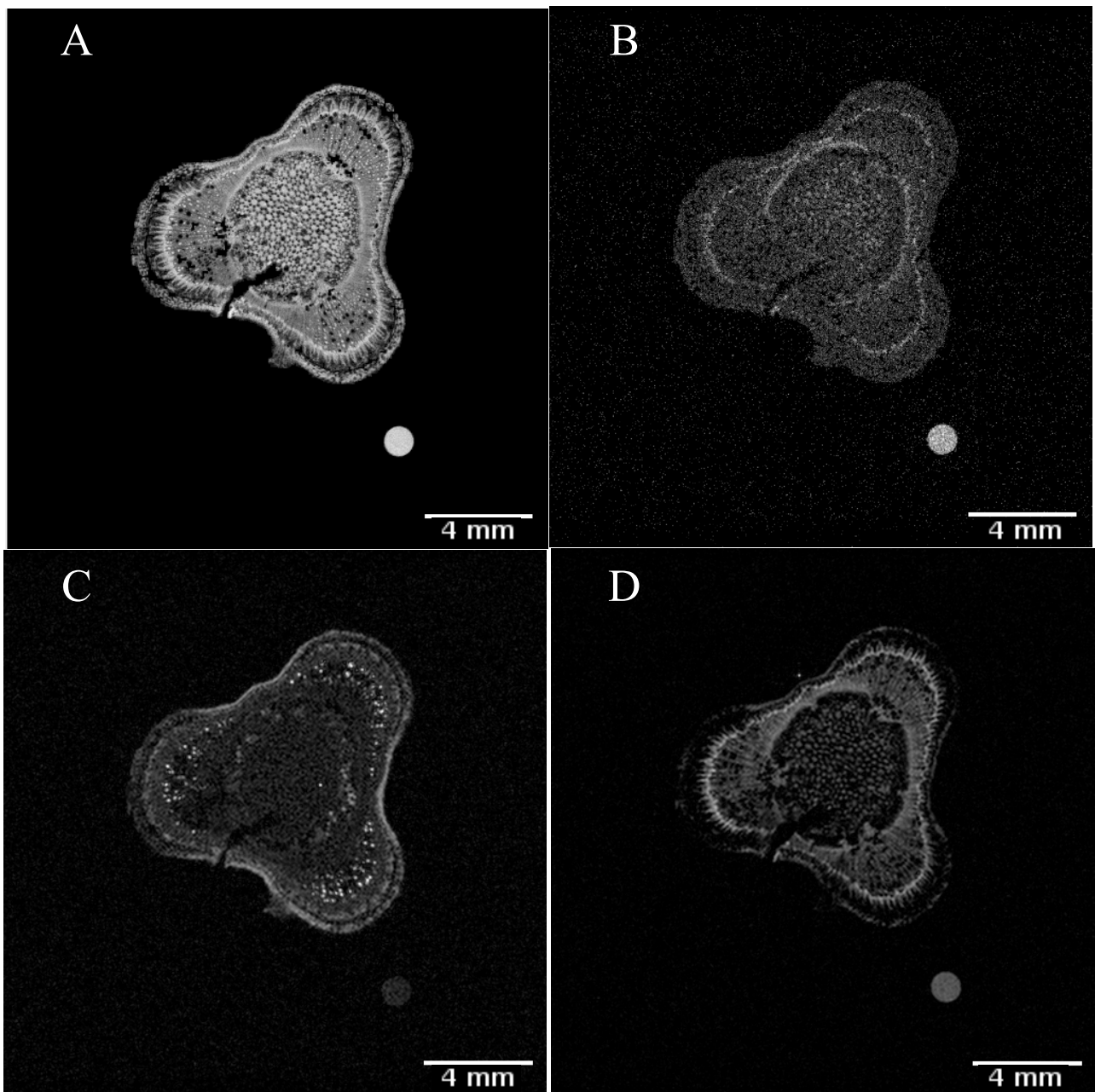


Figure 0.10 : Exemples de différents types de pondérations chez la tige tomate avec une référence eau. (A) Image pondérée densité protonique ($TR = 10000$ ms et $TE = 12$ ms). (B) Image pondérée T_2 ($TR = 10000$ ms et $TE = 96$ ms). (C) Image pondérée T_1 ($TR = 300$ ms et $TE = 12$ ms). (D) Image pondérée diffusion dans le plan ($TR = 3000$ ms et $TE = 40$ ms). Pour les trois cas : $FOV = 20\text{mm} \times 20$ mm et résolution = 256×256 . Selon le type de pondération, différents tissus sont mis en évidence.

La figure 0.12 présente le chronogramme de la séquence de spin écho utilisée dans ce travail. Le premier gradient, celui de sélection combiné à une impulsion radio-fréquence sélective, sert à déterminer l'épaisseur et la localisation de la coupe d'intérêt perpendiculairement à une direction choisie. Cette séquence est répétée avec une incrémentation du gradient de phase dans une direction normale à la précédente autant de fois que la résolution spatiale et le S/B souhaités le nécessitent. Enfin le gradient de lecture permet un encodage du signal dans la troisième direction celle de lecture afin de reconstruire une image par transformée de Fourier bi-dimensionnelle.

Au cours de ce travail de thèse les paramètres suivants ont été utilisés pour l'acquisition des images natives : une résolution en 256×256 voxels, un champ de vue de ($20\text{mm} \times 20\text{mm}$), une épaisseur de coupe de $0,5$ mm, un nombre de coupes de 4, 10 ou 20.

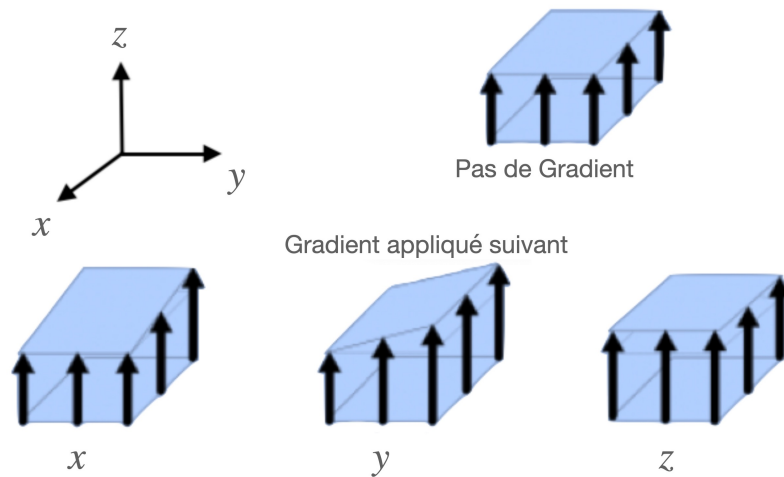


Figure 0.11 : Gradients de champ magnétique appliqués dans 3 directions x , y et z dans le repère du laboratoire. Les vecteurs représentent la direction et l'intensité des 3 gradients.

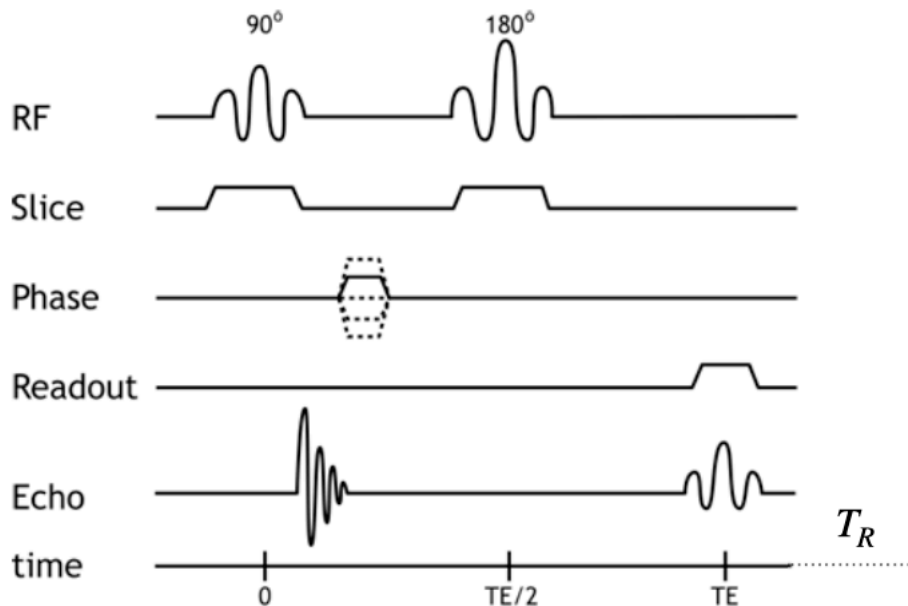


Figure 0.12 : Séquence d'imagerie en spin-écho avec gradients de champ magnétique pulsés.

L'IRM est principalement utilisée dans des études biomédicales et se popularise en biologie végétale car non destructive permettant de réaliser des études longitudinales, notamment pour comprendre le transport de la sève dans les plantes, de manière qualitative et quantitative.

Pondération de diffusion

Le gradient de diffusion peut être appliqué le long d'une direction arbitraire, entraînant une pondération de l'image grâce à un déphasage puis un rephasage de l'aimantation dépendant du mouvement des spins (diffusion et migration), dans la direction dans laquelle il a été appliqué. Ces gradients sont caractérisés par leur temps d'application (δ), par leur intensité (G) et par le temps séparant les deux gradients de diffusions (Δ), voir figure 0.13.

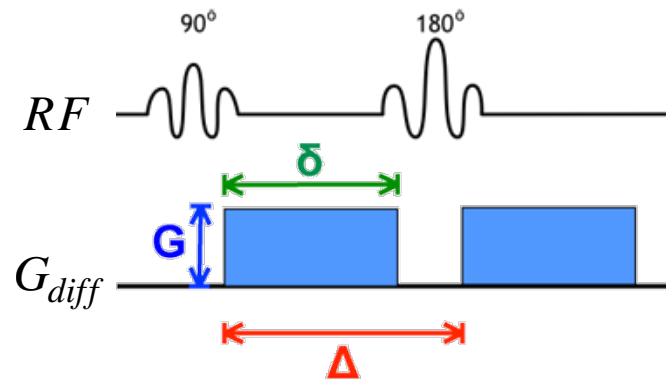


Figure 0.13 : Séquence en spin-écho avec des gradients de diffusion, représentés ici par des rectangles bleus ajustés selon la direction que l'on souhaite pour faire des mesures d'ADC. Ces gradients sont caractérisés par leur temps d'application (δ), par leur intensité (G) et par le temps séparant les deux gradients de diffusions (Δ).

Stejskal et Tanner (1965) ont défini :

$$BVALUE = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) \quad (\text{eq. 0.7})$$

avec γ le rapport gyromagnétique. Ce paramètre $BVALUE$ permet de décrire le phénomène de diffusion par la pondération du signal RMN de la façon suivante :

$$M = M_0 \exp(-BVALUE \cdot ADC) \quad (\text{eq. 0.8})$$

avec ADC le coefficient apparent de diffusion.

b. Etat de l'art de l'utilisation de l'IRM pour mesurer les flux dans les plantes

Ces 20 dernières années, plusieurs études se sont intéressées à des méthodes d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) classiquement utilisées dans des études biomédicales, comme un outil non destructif pour étudier le statut hydrique des plantes (Kockenberger, 2001 ; Van As, 2007 ; Borisjuk et al., 2012).

Pour quantifier de manière précise les flux xylémiens et phloémiens il faut déterminer à la fois la direction du flux et le profil de flux, à partir desquels la vitesse du flux (mm.s^{-1}), le flux ($\text{mm}^3.\text{s}^{-1}$) et la surface conductrice peuvent être déduites (Van As, 2007). L'étape cruciale réside dans la discrimination des molécules d'eau stationnaires subissant une diffusion Brownienne, du flux d'eau lié au transport xylémien ou phloémien. Cette discrimination est difficile pour les flux phloémiens car la quantité d'eau stationnaire est élevée, en plus d'avoir un faible flux. Les principaux verrous sont donc la résolution, qui doit être suffisamment élevée pour pouvoir distinguer les vaisseaux actifs, mais aussi le temps d'acquisition, qui doit être suffisamment court pour pouvoir étudier des réponses rapides des plantes à leur environnement.

Köckenberger et al. (1997) ont été les premiers à mesurer des flux xylémiens et phloémiens par IRM. Ils ont notamment pu mettre en évidence chez l'hypocotyle d'une pousse de ricin âgée de 6 jours, que l'eau qui circule des racines vers les cotylédons passe par le xylème, alors que l'eau se dirigeant des cotylédons vers les racines circule via le phloème. Ils proposent une méthode basée sur la mesure du déphasage du signal et mettent en évidence un amas de vaisseaux dans lesquels la sève circule, soit vers le haut de la plante, soit vers les racines et en faisant l'hypothèse que les flux xylémiens et phloémiens ont des directions opposées, ils en déduisent les sommes distinctes des

flux xylémiens et phloémiens, respectivement. Ainsi, ils mesurent dans le xylème un flux moyen de $38.0 \pm 3.6 \mu\text{l.h}^{-1}$ avec une vitesse moyenne de $0,47 \pm 0.3 \text{ mm.s}^{-1}$ et dans le phloème, un flux moyen de $16.6 \pm 2.4 \mu\text{l.h}^{-1}$ et une vitesse moyenne de $0,58 \pm 0.03 \text{ mm.s}^{-1}$. Cette méthode était considérée comme relativement longue avec un temps d'acquisition de 4h30 et des méthodes plus rapides ont été développées par la suite. Rokitta et al. (1999) ont mis au point une méthode à base d'écho de gradients sur un aimant horizontal de 7T réalisée en un temps très court (entre 4 et 7 minutes) permettant de mesurer des flux xylémiens et phloémiens chez des plants de ricin de 40 jours, placés horizontalement dans l'aimant. Cette méthode, certes très rapide, a une résolution spatiale faible comparée à la méthode présentée par Köckenberger et al. (1997) et ne donne pas d'informations sur la vitesse moyenne du flux par pixel. Elle ne permet donc pas de quantifier le flux.

Afin d'améliorer la résolution spatiale tout en réduisant le temps d'acquisition, Scheenen et al. (2000a) ont proposé une méthode de résonance magnétique nucléaire qui combine gradient de champ magnétique pulsé (PFG) avec de l'imagerie par turbo spin-echo (TSE). Par cette méthode (PFG-TSE), ils sont parvenus à mesurer les profils de flux sur chaque voxel d'une image, avec une résolution spatiale relativement élevée en gardant des temps de mesure compris entre 15 et 30 minutes. Ils ont notamment appliqué leur méthode sur tige de tomate. A 0,47 T en 17 minutes une image des zones où l'eau se déplace dans la tige, à une résolution de $117 \times 117 \times 3000 \mu\text{m}$ a pu être obtenue. Ils estiment également que la vitesse des flux xylémiens chez la tomate peut atteindre jusqu'à 3.1 mm.s^{-1} . Cette méthode a également été appliquée sur des segments de tige de Chrysanthème (Scheenen et al., 2000b), puis sur tige de maïs et sur des sections de pédicelle de tomate (Scheenen et al., 2001) et sur concombre, où ils ont pu imager des flux xylémiens avec des vitesses allant jusqu'à 8 mm.s^{-1} et des flux phloémiens (en terme de variations de flux, unité arbitraire) (Scheenen et al., 2002). Peuke et al. (2001) ont appliqué cette méthode sur le ricin de 40 jours dans un aimant de 7T et ont pu mettre en évidence des variations diurnes de la vitesse des flux xylémiens, avec une vitesse jusqu'à 1,6 fois plus élevée le jour que la nuit ($0.401 \pm 0.004 \text{ mm.s}^{-1}$ le jour contre $0.255 \pm 0.003 \text{ mm.s}^{-1}$). Ils n'ont en revanche pas mis en évidence de variations diurnes de la vitesse du phloème.

Ces méthodes souffrent d'une plus basse résolution spatiale (Figure 0.14) mais leur rapidité les rend très utiles pour étudier les réponses des plantes à des changements environnementaux tels que des variations de lumière, d'humidité du sol ou bien pour étudier leur réponse à un déficit hydrique.

Une optimisation de celles-ci proposée par Windt et al. (2006) a cependant permis de mesurer le transport phloémien et xylémien chez différentes espèces (Figure 0.15). Ils ont notamment étudié les variations diurnes des flux phloémiens et xylémiens dans la tige de tomate (stade végétatif toutes les fleurs et ramifications sont retirées pendant le développement de la plante) et ont montré que les flux xylémiens étaient plus importants le jour ($8.0 \pm 0.92 \text{ mm}^3.\text{s}^{-1}$ pour un rayonnement d'environ $200 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$) que la nuit ($2.26 \pm 0.52 \text{ mm}^3.\text{s}^{-1}$), dû à la fois à une réduction de la transpiration et à une réduction de 25% de la surface de conduction. Ces diminutions sont également expliquées par une diminution des diamètres des vaisseaux conducteurs. Dans cette étude il se sont également penchés sur la question du ratio entre flux phloémien et flux xylémien. Ce ratio est faible la nuit chez la tomate (0.04) alors que pour les autres espèces (ricin, tabac et peuplier) il est plutôt élevé (0.37, 2.55 et 0.19, respectivement) (Windt et al., 2006).

Dans leur étude sur les flux xylémiens chez le concombre (tige), Scheenen et al (2007) ont une résolution suffisante ($120 \times 120 \mu\text{m}$) pour distinguer individuellement des larges vaisseaux xylémiens.

Toutes ces études IRM sur plantes intactes se sont focalisées sur la tige principale des plantes. En effet, l'encombrement de l'aimant et des gradients est une contrainte importante pour le choix de la zone de la plante à imager. Il faut, de plus, développer des antennes qui n'endommagent pas la plante, adaptées à la taille de l'objet à imager. Windt et al. (2009) ont réussi à imager le pédoncule

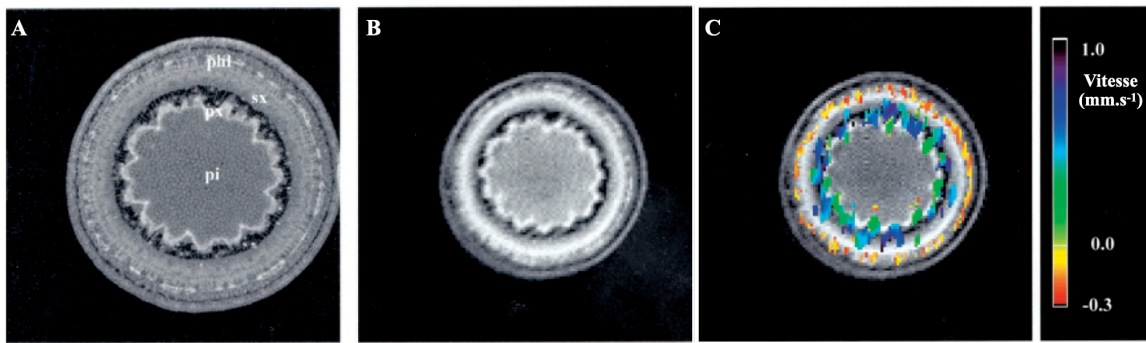


Figure 0.14 : Exemple d'acquisition pour l'étude de Peuke et al. (2001). Coupes transversales d'hypocotyle de ricin de 40 jours. (A) Image de spin écho par RMN ($TE = 15$ ms; $TR = 0,5$ s; épaisseur de coupe = $0,6$ mm; champ de vue = 8 mm x 8 mm; résolution $31 \mu\text{m} \times 31 \mu\text{m}$); (B) Image FLASH ($TE = 4,3$ ms; $TR = 11,5$ ms; épaisseur de coupe = 3 mm; champ de vue = 6 mm x 6 mm; résolution $47 \mu\text{m} \times 47 \mu\text{m}^2$); (C) Carte de la vitesse du flux (matrice = 128×128 avec un zéro-filling pour atteindre 128×128 ; épaisseur de coupe = 4 mm; champ de vue = 10 mm x 10 mm réduit à 6 mm x 6 mm; temps de mesure = 7 min; résolution $78 \mu\text{m} \times 313 \mu\text{m}^2$). Il y a une perte de résolution entre l'image A et les images B et C. Abréviations : phl, phloème; sx, xylème secondaire; px, xylème primaire; pi, moelle.

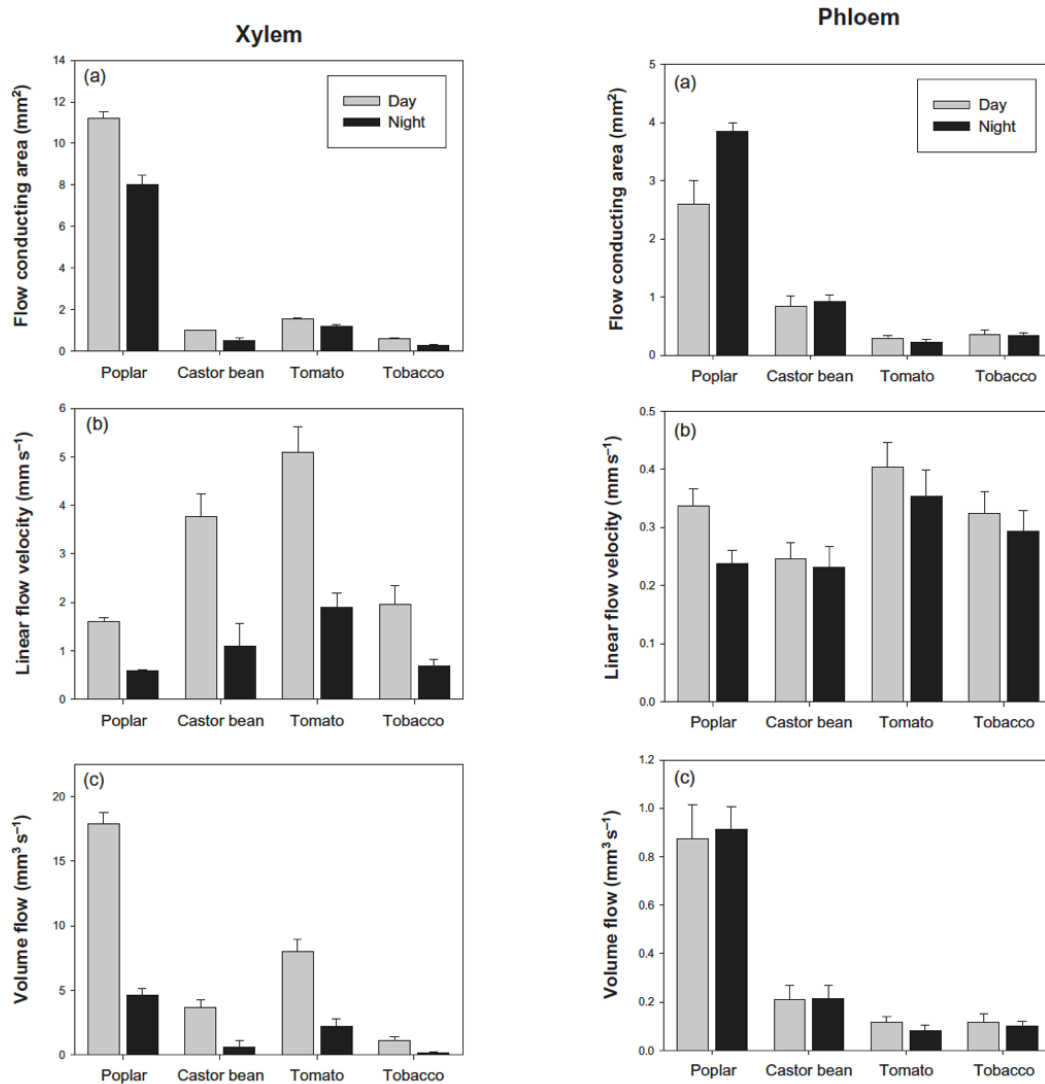


Figure 0.15 : Mesure par IRM de la surface conductrice totale (a), de la vitesse du flux (b) et du flux volumique (c) du xylème (côté gauche) et du phloème (côté droit) chez le peuplier, le ricin, la tomate et le tabac. Figure adaptée de Windt et al. (2006).

d'un bouquet de tomate, de manière non destructive et on mit en évidence des résultats contradictoires avec ce qui est connu chez la tomate, du moins à l'entrée du fruit (Figure 0.16). En effet, ils ont trouvé que l'eau rentre dans le bouquet majoritairement par le xylème et non par le phloème. Plus précisément, ils ont mis en évidence qu'en 8 semaines, la quantité d'eau entrée dans le bouquet était d'approximativement 660 mL, que 75% de ce flux total était entré par le xylème et que les 25% restants sont rentrés par un anneau de flux interne qui comprend un mélange de vaisseaux phloémiens et xylémiens.

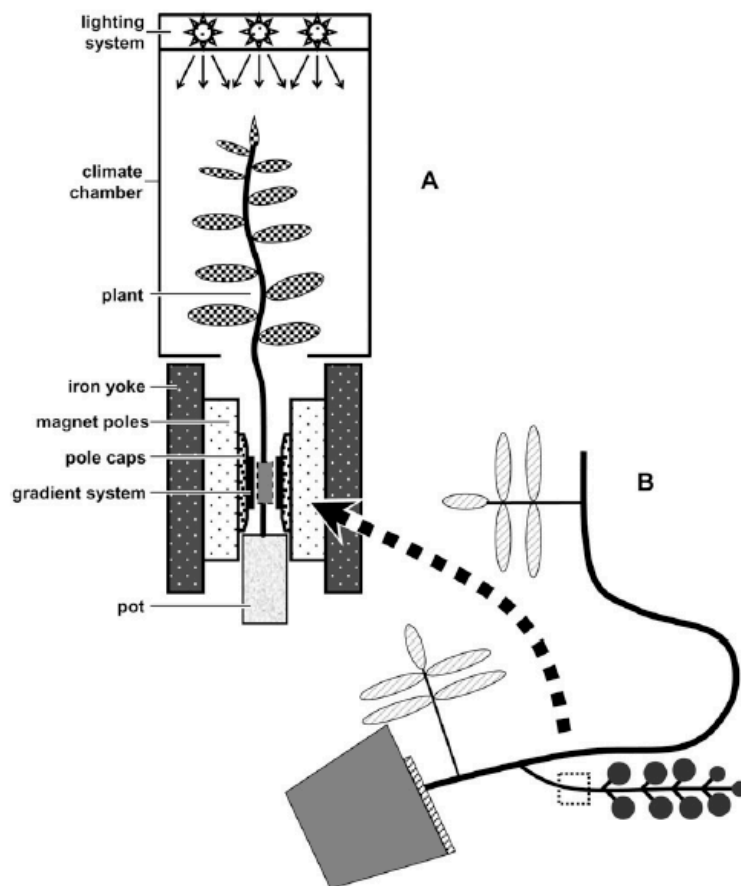


Figure 0.16 : Installation IRM et positionnement du plan de tomate et du bouquet au centre de l'aimant. (A) Schéma de l'installation classique d'une plante sans fruit dans l'IRM, pour faire une acquisition au niveau de la tige principale. (B) Vue de côté du plant de tomate portant le bouquet qui a été placé dans l'imageur. Le carré en pointillé indique la zone du pédoncule qui a été imagée. Figure provenant de Windt et al. (2009).

Plus récemment, Mullendore et al. (2010) ont quantifié la vitesse des flux phloémiens dans des tiges de courge (0.327 mm.s^{-1}) et de haricot (0.199 mm.s^{-1}) et Prusova (2016) a étudié la réponse de ces vitesses à la lumière chez la tomate. Dans sa thèse, Prusova (2016) a mis en évidence par IRM, à l'aide de la méthode PFG-TSE de Scheenen et al. (2000a), que le phloème exhibait un cycle diurne avec une vitesse maximale de $0.24 \pm 0.03 \text{ mm.s}^{-1}$ la journée et une vitesse minimale de $0.2 \pm 0.01 \text{ mm.s}^{-1}$ la nuit. Prusova montre également que la lumière a un effet sur le volume de sève transporté par le phloème mais pas sur la vitesse du transport. Une diminution de la quantité de lumière provoque donc une diminution des flux phloémiens liée au fait que moins de tubes criblés sont actifs alors que la vitesse reste constante.

Dans une étude récente sur la pomme de terre Aliche et al. (2020) ont mis en évidence à l'aide de l'IRM (méthode PFG-TSE) un rythme diurne des flux xylémiens avec une réduction des flux liées à la sensibilité à la déshydratation. Les valeurs de flux xylémiens mesurés la nuit ainsi que les valeurs maximales de flux étaient plus faibles chez les plantes stressées (flux inférieur à $0.5 \text{ mm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ la nuit avec un pic à $1 \text{ mm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ la journée pour les plantes stressées, comparé aux plantes témoins qui ont un flux qui ne descend pas en dessous de $0.5 \text{ mm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ la nuit et qui peut monter jusqu'à presque $2.5 \text{ mm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ la journée). Pour ce qui est des vaisseaux phloémiens, ils n'ont pas mis en évidence de variations diurnes. Le volume transporté par le phloème était jusqu'à 100 à 1000 fois plus faible que celui transporté par le xylème.

A l'échelle des fruits, Moriwaki et al. (2014) ont utilisé la micro-imagerie par résonance magnétique pour étudier la structure vasculaire des fruits et ont montré que le volume vasculaire changeait presque en proportion du volume du fruit. Des méthodes IRM peuvent également être utilisées pour étudier l'hétérogénéité des tissus des fruits tel que la pomme en termes de paramètres de relaxation, de microporosité apparente et de morphologie de cellules (Winisdorffer et al., 2015). Musse et al. (2021) ont montré que l'IRM pouvait être utilisé comme un outil pour phénotyper les fruits et mesurer des données physiologiques importantes incluant des informations sur la variabilité spatiale pendant le développement des fruits (pêche et pomme dans leur cas).

Au cours de ce travail de thèse, une nouvelle méthode d'IRM des flux basée sur l'entrée de coupe a été développée (Buy *et al.*, 2018 ; Simon et al. 2019a & 2019b). Elle s'appuie sur une pondération T_1 des images modifiée par l'entrée dans l'épaisseur de coupe de spins portant une aimantation non pondérée. Par soustraction d'images pondérée et non-pondérées les voxels transportant un flux sont directement identifiés, facilitant ainsi les analyses en région d'intérêt. Le chapitre I de ce manuscrit présente la méthode dans le cadre de ses applications aux végétaux, ainsi que les avantages et les limites de cette approche.

L'IRM est donc un outil en fort développement pour étudier des flux de sèves chez les plantes et a pour avantage d'être une méthode directe et non destructive dans les plantes.

4. QUESTIONS DE RECHERCHE

Ce travail de thèse est pluridisciplinaire, à l'interface entre un laboratoire d'écophysiologie végétale (UR PSH, INRAE Avignon) et un laboratoire de physique (Laboratoire Charles Coulomb, UM, CNRS) qui a pour objectifs : i) d'explorer et développer des techniques d'IRM pour mesurer les flux d'eau dans l'architecture de la plante de tomate, ii) de coupler l'IRM à des approches histologiques pour évaluer les liens structure-fonction des tissus conducteurs, iii) d'utiliser la modélisation comme outil d'intégration des connaissances acquises afin d'identifier des traits anatomiques et fonctionnels potentiellement impliqués dans la plasticité génétique et environnementale des déterminants des flux.

Pour répondre à ces objectifs, les questions scientifiques dans lequel ce travail de thèse s'inscrit et s'efforce de répondre sont :

- **La méthode « flip-flop » d'entrée de coupe permet-elle de quantifier des flux xylémiens et phloémiens dans l'architecture de la plante en croissance ?**
- **Quelle est la contribution aux variations de masse des fruits de la variabilité de surface des vaisseaux conducteurs liée au génotype et au déficit hydrique ?**

- **Comment et dans quelle gamme varient les flux xylémiens dans l'architecture de la plante ? Et quels sont les déterminants de ces variations ?**
- **Quel est l'impact du déficit hydrique sur les flux dans l'architecture de la plante ?**

De nombreux développements méthodologiques et numériques ont été réalisés au cours de la thèse afin d'évaluer et valider les différentes méthodes. C'est pourquoi un premier chapitre est consacré aux développements et sur les méthodes utilisées notamment pour répondre à la première question de recherche. Le second chapitre se concentre sur la variabilité de surface des vaisseaux conducteurs liée au génotype et au déficit hydrique et ce sera un chapitre rédigé sous forme d'article scientifique qui a été soumis au journal « Plant-Environment Interactions ». Le troisième chapitre aborde la question de la variation des flux xylémiens dans l'architecture de la plante et en réponse au déficit hydrique en combinant histologie et mesures IRM. Enfin, le quatrième et dernier chapitre traite également des flux xylémiens dans la plante, mais cette fois-ci en intégrant les résultats des chapitres précédents dans un modèle structure-fonction. Deux articles scientifiques ont été rédigés dans le cadre de conférences et sont présents en annexe de la thèse.

CHAPITRE I : MATÉRIEL ET DÉVELOPPEMENT MÉTHODOLOGIQUE

Afin de répondre aux questions de recherches énoncées plus haut, la démarche générale de ce travail de thèse a été de combiner plusieurs techniques expérimentales, que sont l'IRM, l'histologie et la modélisation, à différents niveaux dans l'architecture de la tomate : la tige principale, le pédoncule du bouquet et le pédicelle du fruit (Figures 0.2 et 1.1). Pour ce faire, un développement méthodologique conséquent a été réalisé et différents génotypes de tomate ont été étudiés.

1. MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal étudié au cours de ce travail de thèse est la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), une des cultures horticoles les plus importantes dans le monde mais aussi une plante modèle en génétique, physiologie et écophysiologie végétales. Les expérimentations ont principalement été réalisées sur le génotype West Virginia 106 (WVA106) qui est un génotype de type cerise (Figure 1.1).

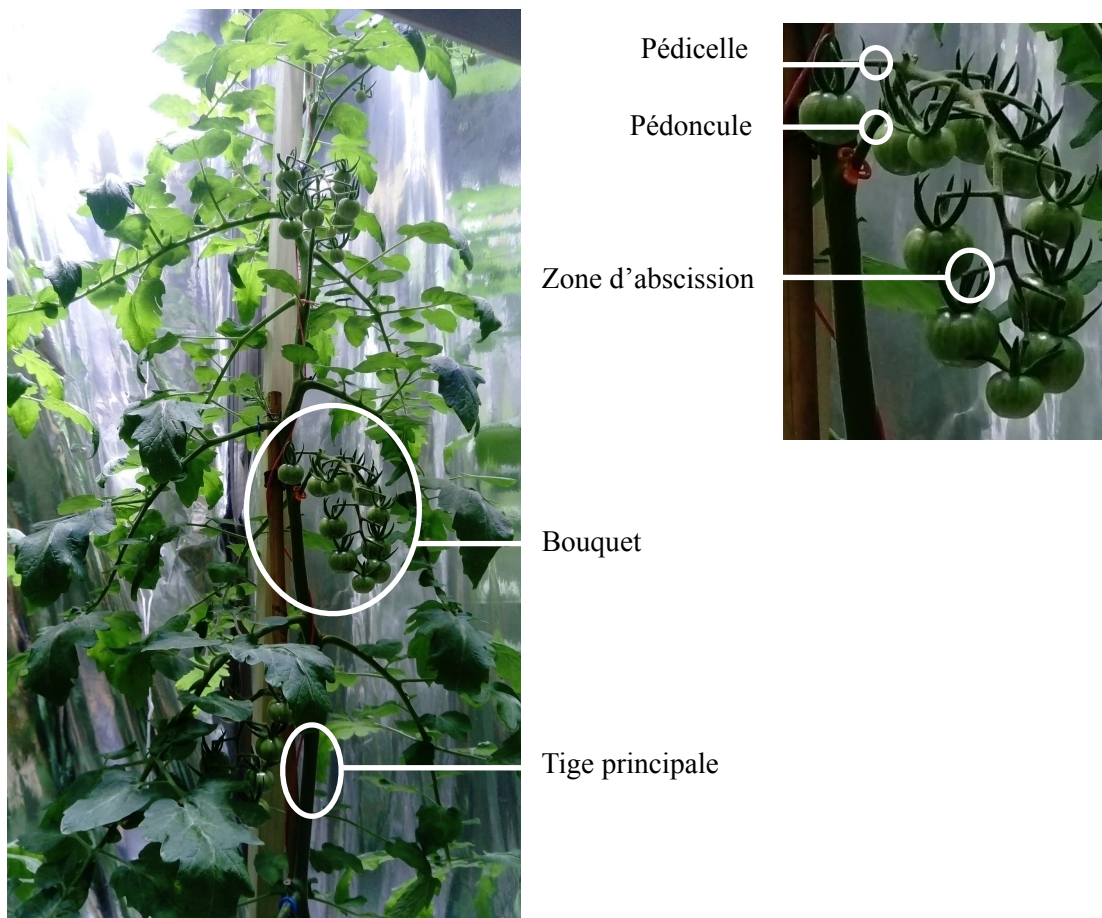


Figure 1.1 : Photo d'une plante de tomate du génotype WVA106 avec un zoom sur un bouquet afin d'identifier pédoncule, pédicelle et zone d'abscission.

Pour analyser la variabilité génétique des tissus conducteurs du pédicelle (chapitre II), nous avons travaillé avec dix autres génotypes contrastés. Ces génotypes sont les 8 génotypes parents de la population MAGIC TOM: Cervil, Criollo, Ferum, LA0147, LA1420, Levovil, PlovdivXXIVa (ici appelé Plovdiv), Stupicke Polni Rane (ici appelé Stupicke) (Pascual et al., 2015 ; Ripoll et al., 2016), ainsi que le sauvage du génotype Heinz et le mutant « Jointless » qui n'a pas de zone d'abscission (Mao et al., 2000) (Figure 1.2). Ces mutants « Jointless » sont classiquement utilisés dans l'industrie pour empêcher que les fruits ne tombent et faciliter la récolte.



Figure 1.2 : Photos des fruits des différents génotypes étudiés. Seul le chapitre 2 traite de la variabilité génétique. Dans le chapitre 3 et 4 nous travaillons uniquement sur le génotype WVA106. Les photos des fruits WVA106 et des mutant et sauvage du génotype Heinz (H. Jointless et H. WT resp.) ont été prises juste avant que le fruit ne devienne rouge (stade vert mature), la taille maximale du fruit était donc atteinte. Les fruit sont rangés du plus petit au plus gros fruit en terme de matière fraîche. Les matières fraîches moyennes varient de moins de 10g pour Cervil, WVA 106 et Criollo à plus de 100g pour Ferum, LA0147 et Levovil (cette classification sera reprise dans le chapitre II).

Les plantes ont été cultivées à l'INRAE d'Avignon, dans une serre chauffée (18 +/- 2 °C la nuit / 22 +/- 4 °C le jour) dans des pots de 5L remplis de terreau (Klasmann, Substrat SP 15%) et arrosées de manière automatique avec une solution nutritive commerciale diluée (0,3%) (Liquoplant Rose, Plantin, Courthézon, France) (Figure 1.3). La quantité d'eau apportée était calculée en fonction de la demande évaporative mesurée dans la serre : l'irrigation était déclenchée à partir d'un seuil d'évapotranspiration potentielle (ETP) variant entre 0.2 ETP et 0.8 ETP suivant le stade de développement. La durée d'irrigation augmentait également au cours du développement des plantes et en fonction de l'ETP journalière moyenne (minimum 4 irrigations par jour). Pour les expérimentations de déficit hydrique, la quantité d'eau était réduite de moitié (-50% ETP) mais les fréquences d'irrigation étaient similaires. Les tiges axillaires ont été éliminées dès leur apparition et les bouquets ont été pollinisés avec un vibreur trois fois par semaine. La charge en fruits était régulée par une taille des bouquets à 10 fruits par bouquet et la serre a été blanchie au printemps pour éviter un stress thermique.

Les plantes étaient ensuite transportées à Montpellier en moyenne 2 semaines avant les expérimentations IRM, où elles ont été stockées dans une petite serre (3 m x 1 m x 1,05 m) (Figure 1.3) afin de les pré-adapter aux conditions de luminosité de l'IRM. Les paramètres environnementaux étaient régulés par la climatisation du bâtiment et mesurés dans la serre par des stations météorologiques connectées (Netatmo). L'éclairage était assuré par un panneau de LED (Alpheus, Montgeron, France) fixé en haut de la serre et les murs de la serre étaient recouverts d'une paroi réfléchissante afin de maximiser le rayonnement dans le bas du couvert. Le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) au niveau de l'apex des plantes était environ égale à 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le panneau de LED était contrôlé par bluetooth et nous avons fixé un lever du soleil à 7h et un coucher du soleil à 19h.



Figure 1.3 : A gauche, plantes WVA106 dans la serre de l'INRAE d'Avignon. A droite, plantes WVA106 dans la serre de Montpellier avant les expérimentations IRM.

2. CONDITIONS DES MESURES IRM

Le scanner IRM dans lequel les expérimentations ont été réalisées est un équipement IRM horizontal Agilent (Magnex Scientific), doté d'un champ magnétique supraconducteur de 9,4T (Figure 1.4).

Afin de réaliser les acquisitions *in vivo* sur plante entière, la plante est placée en position horizontale (Figure 1.5). Elle doit également être glissée dans le tunnel de 10 cm de diamètre du champ magnétique supraconducteur. Le génotype WVA106 est particulièrement adapté à ces expérimentations car ses bouquets ne sont pas très volumineux permettant ainsi de travailler sur une plante intacte.

Afin de ne pas abimer les feuilles de la plante lors de son positionnement dans l'IRM, la plante est emballée délicatement dans du cellophane. Le cellophane est par la suite retiré afin de libérer les feuilles qui dépassent hors du champ magnétique permettant ainsi de positionner la batterie de LED. Deux panneaux de LED identiques à ceux utilisés dans la serre sont placés de chaque côté des feuilles dépassant de l'IRM. Ils délivrent chacun une intensité lumineuse d'environ $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (PAR). Le nombre et le rang des feuilles éclairées sont relevés pour chacune des expérimentations ainsi que la zone de mesure étudiée au niveau de la plante qui est positionnée au centre du champ magnétique.

L'antenne utilisée pour la plupart des expérimentations IRM à l'échelle de la tige principale est une antenne « clipsable » de type selle de cheval (Mispelter et al., 2015) de 14 mm de diamètre (Figure 1.6). Le design de l'antenne a été adapté à la mesure sur les plantes de tomates afin de limiter au maximum les sources de stress. Afin d'atteindre le centre du champ magnétique de l'IRM, la longueur du corps de la sonde est de 73 cm permettant ainsi d'amener la partie active de l'antenne



Tunnel de 10 cm de diamètre dans lequel la plante est glissée

Figure 1.4 : Configuration expérimentale de l'aimant supraconducteur horizontal 9,4T du scanner IRM Agilent utilisé dans ce travail de thèse.

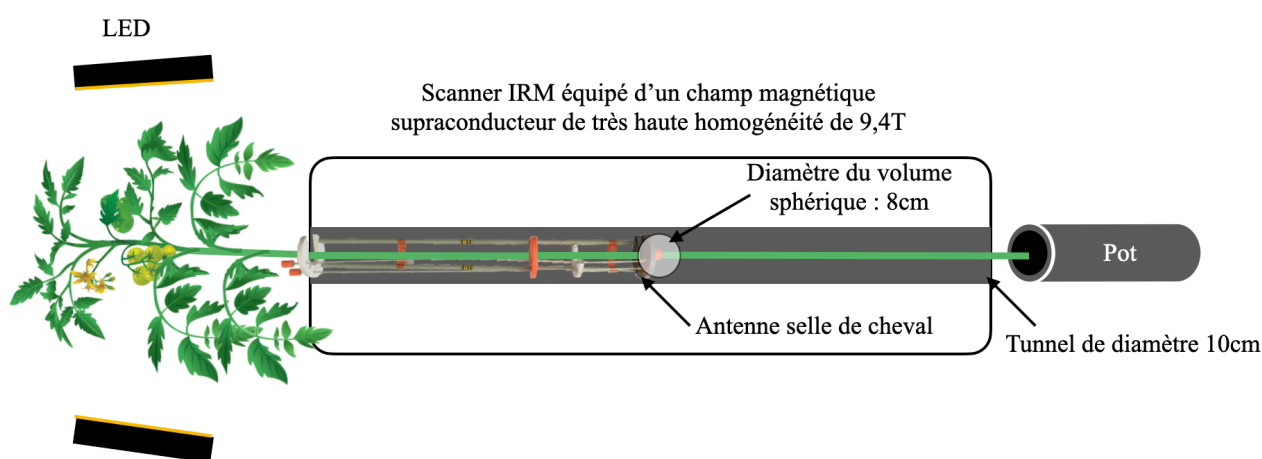


Figure 1.5 : Représentation schématique d'une plante de tomate placée dans le scanner IRM horizontal. En fonction de la zone de la tige principale où l'acquisition sera faite, le nombre de feuilles sortant de l'IRM peut varier et le pot peut également rentrer dans le tunnel lorsque l'acquisition est faite en bas de la tige. Les feuilles qui dépassent de l'IRM sont illuminées à un rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) de $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le volume sphérique représente le centre de l'aimant, où le champ est suffisamment homogène.

ainsi que la zone d'intérêt à imager au centre du volume sphérique de l'aimant et des gradients de champs pulsés. Le circuit d'accord de la sonde (*tuning* et *matching*) ajustable par des baguettes à l'arrière du champ magnétique permettent un réglage fin des deux condensateurs variables. Il existe également deux autres antennes de ce type, de 16 mm et 20 mm, utiles dans les cas où nous travaillons sur des tiges plus larges.

Les conditions environnementales sont contrôlées dans la cage de Faraday où l'IRM se situe. La température moyenne est de 21°C et l'humidité relative moyenne de l'air est d'environ 50%.

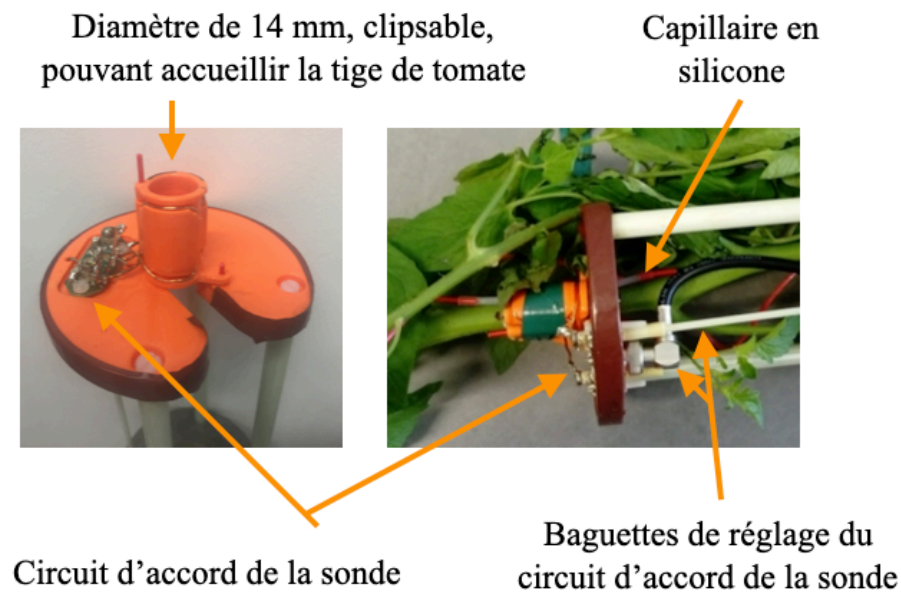


Figure 1.6 : A gauche, antenne « clipsable » de type selle de cheval de 14 mm de diamètre. A droite, la même antenne installée autour de la tige principale d'une tomate WVA106. Le capillaire en silicone qui dépasse de l'antenne est rempli d'eau du robinet et sert de référence lors des acquisitions IRM.

3. CONTROLE DE L'ACTIVITE DE LA PLANTE PENDANT LA MESURE IRM

Il est nécessaire d'évaluer notre méthode de mesure IRM d'un point de vue écophysiological et pour cela, vérifier que la plante reste active dans les conditions de l'IRM (Figure 1.5). Comme seule une partie des feuilles est illuminée à une intensité de $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nous avons réalisé en serre des mesures d'activité photosynthétique des feuilles à différents niveaux dans l'architecture de la tomate, en réponse à différentes intensités lumineuses. Ces mesures ont été faites dans des conditions témoin et de déficit hydrique. Dans un second temps, nous avons recréé au laboratoire les conditions de l'IRM (plante en position horizontale, la majorité des feuilles à l'ombre et emballées) pour estimer si la plante est toujours active, en terme d'activité photosynthétique et de transpiration des feuilles mais aussi en terme de croissance des fruits.

a. Photosynthèse et transpiration des feuilles en fonction de leur rang le long de la tige

Des mesures de photosynthèse, de transpiration et de conductance stomatique des feuilles ont été réalisées à l'aide du système portable LI-6400XT (LI-COR) équipé d'une chambre rectangulaire de dimensions $2 \times 3 \text{ cm}$ (Figure 1.7) suivant le protocole de Sharkey (2019). Les mesures ont été réalisées sur la foliole terminale des feuilles de tomate du génotype WVA106, cette foliole étant représentative de l'ensemble de la feuille (Koch et al., 2018).

Pour une mesure simple, la température de la feuille est fixée à 25°C et le CO_2 de référence à 400 ppm. L'intensité lumineuse est fixée à la valeur souhaitée. Après avoir calibré le flux dans la chambre, la mesure d'échanges gazeux peut être réalisée. Afin d'avoir une valeur moyenne représentative, 6 acquisitions sont réalisées à 10 secondes d'intervalles (répétitions techniques).

Pour réaliser les courbes de réponse à la lumière, après avoir réalisé une mesure simple, une séquence d'intensités lumineuses croissantes ou décroissantes est appliquée.



Figure 1.7 : Système portable LI-6400XT positionné sur la foliole terminale d'une feuille de tomate en serre à Avignon.

Courbes de réponse à la lumière en conditions de serre

Des courbes de réponse à la lumière ont été réalisées en serre à Avignon. La première session de mesure a été réalisée en janvier 2019 entre 10h30 et 16h sur des plantes témoins (Figure 1.8). Il s'agissait de comparer la réponse des feuilles à la quantité de lumière en fonction de leur rang sur la tige. Les mesures ont été réalisées sur une plante de 47 feuilles et 12 bouquets visibles. Pour le bas de la plante, les mesures ont été réalisées sur la feuille numéro 8, en partant du bas de la tige. Pour le milieu, les mesures ont été réalisées sur la feuille 23, entre le bouquet 4 et le 5 (bouquets en croissance) et pour le haut, elles ont été réalisées sur la feuille 41, située juste avant le bouquet 10. Les 3 feuilles avaient atteint leur surface finale. Au vue du faible nombre de répétitions (6 répétitions techniques par points mais une seule répétitions biologique), nous ne pouvons pas faire de statistiques. Un modèle hyperbolique (Givnish, 1988) a été ajusté aux données de photosynthèse:

$$P_N = \frac{\alpha \times I \times P_{Nmax}}{\alpha \times I + P_{Nmax}} - R_D \quad (\text{eq. 1.1})$$

avec P_N le taux net de photosynthèse ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), α l'efficacité quantique de la photosynthèse, P_{Nmax} le taux maximal de photosynthèse ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), R_D le taux de respiration nocturne ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et I le PAR ($\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Le modèle a donc été ajusté individuellement pour le bas de la plante, pour le milieu et pour le haut (Figure 1.8) et les paramètres d'ajustement ont été reportés dans le tableau 1.1. Entre les trois rangs, l'efficacité (α) est quasi identique, en revanche les taux de photosynthèse maximale sont très différents, avec le taux le plus faible pour le bas de la plante et le taux le plus élevé en haut de la plante. Le rang foliaire a donc un effet sur la photosynthèse maximale mais pas sur son efficacité quantique. Pour la transpiration et la conductance stomatique, la diminution observée pour des faibles PAR est difficile à expliquer. A partir de $200 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ il y a un effet rang de la feuille assez net, avec de plus fortes valeurs de transpiration et de conductance stomatique en haut de la plante et une augmentation de la transpiration avec le PAR.

La seconde session de mesure a été réalisée en serre en juillet 2020 entre 10h et 14h30 sur des plantes ayant subi un déficit hydrique (-50% ETP) et sur des plantes témoins (Figure 1.9). Il s'agissait de comparer la réponse des feuilles à la quantité de lumière en fonction du rang et en fonction du traitement hydrique. Pour les plantes témoins, les mesures ont été réalisées sur 2 plantes, de 28 feuilles et 6 bouquets chacune. Pour les plantes ayant subi un déficit hydrique (WD),

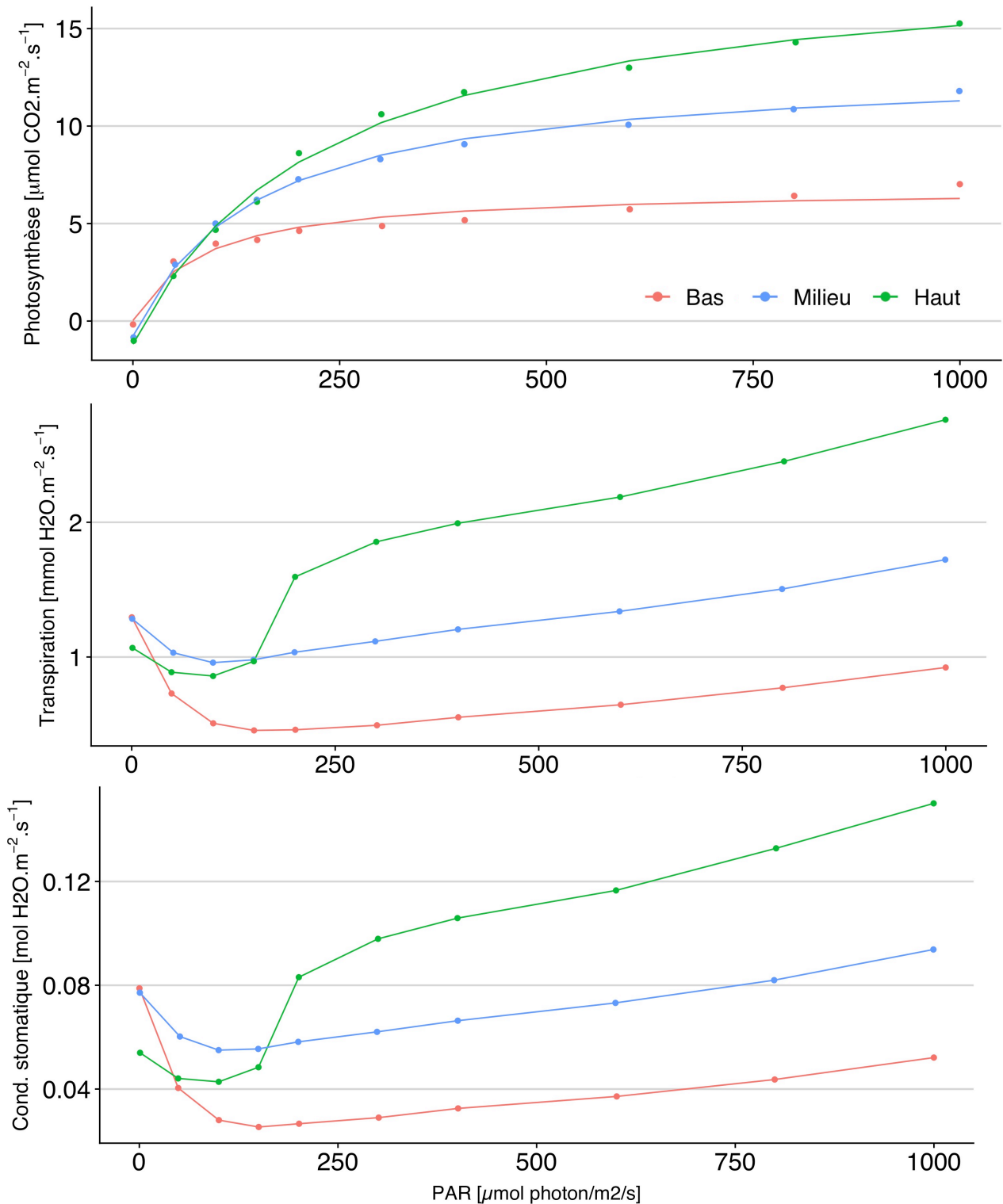


Figure 1.8 : Courbes de réponses de la photosynthèse ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), de la transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et de la conductance stomatique ($\text{mol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à la lumière, en fonction du rang foliaire. Les points indiquent les mesures réalisées sur une plante de 47 feuilles et 12 bouquets visibles. Un modèle de type hyperbolique a été ajusté aux données de photosynthèse rang par rang (lignes). Bas (rouge) : feuille 8. Milieu (bleu) : feuille 23, entre le bouquet 4 et le bouquet 5. Haut (vert) : feuille 41, juste avant le bouquet 10. Les mesures ont été réalisées en serre à Avignon en janvier 2019, sur le génotype WVA106.

les mesures ont été réalisées sur 2 plantes, de 24 feuilles et 5 bouquets chacune. Les plantes témoins et stressées avaient le même âge. Afin de comparer l'effet du rang foliaire, deux niveaux ont été comparés : le bas (feuille 8) et le haut de la plante (feuille 18). De la même manière que pour la

| | Position et/ou traitement | α | P_{Nmax} | R_D |
|------------|---------------------------|----------|------------|-------|
| Figure 1.8 | Bas de la plante | 0,082 | 6,81 | 0 |
| | Milieu de la plante | 0,094 | 13,87 | 0,79 |
| | Haut de la plante | 0,087 | 20,16 | 1,20 |
| Figure 1.9 | Bas plantes témoins | 0,094 | 14,60 | 1,64 |
| | Haut plantes témoins | 0,115 | 34,97 | 3,49 |
| | Bas plantes WD | 0,064 | 21,69 | 1,39 |
| | Haut plantes WD | 0,124 | 20,31 | 3,02 |

Tableau 1.1 : Paramètres d'ajustement du modèle hyperbolique (équation 1.1) aux données de la figure 1.8 et 1.9 avec α l'efficacité quantique de la photosynthèse, P_{Nmax} le taux maximal de photosynthèse ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et R_D le taux de respiration nocturne ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). WD : déficit hydrique.

figure 1.8, modèles de type hyperbolique a été ajusté aux données, en considérant quatre cas différents : mesures en bas des plantes témoins, mesures en haut des plantes témoins, mesures en bas des plantes WD et en haut des plantes WD et les paramètres d'ajustement ont été reporté dans le tableau 1.1. Comparé aux mesures réalisées en janvier, la photosynthèse maximale est plus élevée, en particulier pour le haut de la plante. Sur cette série de mesures, l'efficacité semble légèrement plus élevée en haut de la plante qu'en bas de la plante. Dans le cas du déficit hydrique, la différence d'efficacité entre le bas et le haut de la plante est encore plus fort, en revanche, le taux maximal de photosynthèse se semble pas différer en fonction du rang de la feuille. Le déficit hydrique semble avoir un effet négatif sur l'efficacité photosynthétique mais seulement en bas de la plante. Comme observé en janvier, chez le témoin la transpiration et la conductance stomatique sont plus faibles en bas de la plante qu'en haut et les niveaux de transpiration et de conductance stomatique du bas de la plante sont similaires aux niveaux observés chez les plantes WD, aussi bien en haut qu'en bas de la plante. Le rang ne semble donc pas avoir d'effet sur la transpiration et sur la conductance stomatique des plantes WD. Contrairement aux mesures de janvier 2019, le PAR ne semble pas avoir d'effet sur la transpiration et sur la conductance stomatique, aussi bien chez les plantes témoins que WD.

Reproduction des conditions IRM pour la plante

Dans l'IRM, la plante est à l'horizontale et il n'est possible d'éclairer que les feuilles qui dépassent de l'aimant. Les feuilles qui sont dans l'aimant sont emballées dans du cellophane pour pouvoir les rentrer dans le trou de 10 cm de diamètre sans les casser. Ces conditions ont été reproduites à Montpellier dans une salle dans le noir. Les mêmes LED ont été utilisées pour éclairer le haut de la plante et le bas de la tige a été enroulé dans de l'aluminium pour reproduire la contrainte mécanique et l'ombrage de l'aimant dans le cas où on image le bas de la tige (Figure 1.10). Les mesures ont été réalisées sur une plante de 298 cm de hauteur, 44 feuilles et 11 bouquets, poussée en conditions d'irrigation non limitante.

Avant de faire les mesures, l'environnement lumineux de la plante a été caractérisé. Le PAR oscille entre 160 et 200 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ lorsqu'on est au niveau de la plante et bien en face des panneaux. Lorsqu'on se rapproche des panneaux, à environ 1 m, on mesure 300 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A 20 cm des panneaux, l'intensité lumineuse monte jusqu'à presque 600 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Trois niveaux de PAR ont donc été sélectionnés : 100, 180 et 260 $\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figure 1.11). L'effet rang a été testé par une

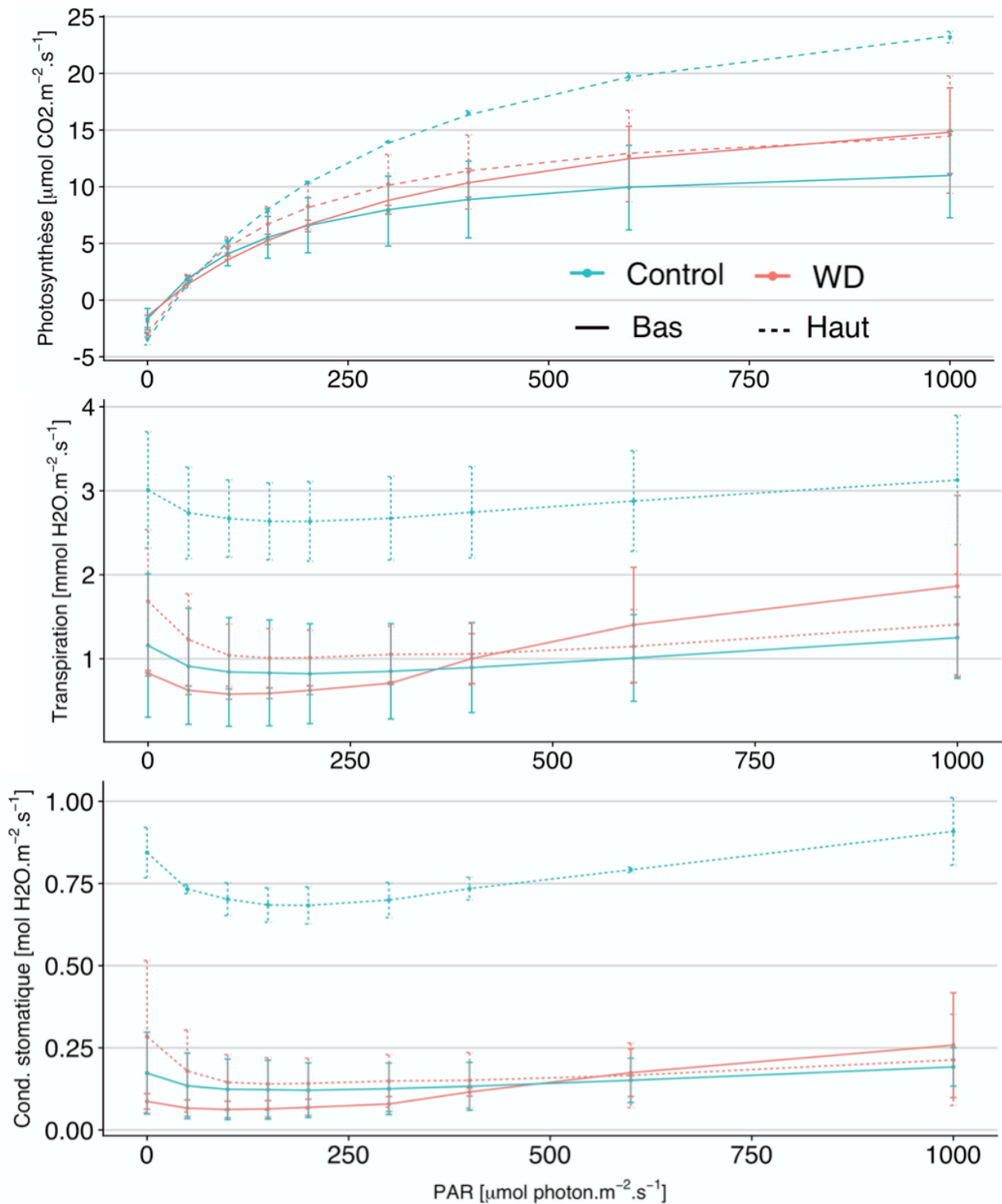


Figure 1.9 : Courbes de réponses de la photosynthèse ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), de la transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et de la conductance stomatique ($\text{mol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à la lumière, en fonction du rang foliaire et du traitement. Pour les plantes témoins (« Control », en bleu), les mesures ont été réalisées sur 2 plantes, de 28 feuilles et 6 bouquets chacune. Pour les plantes ayant subi un déficit hydrique (WD pour « water deficit », en rouge), les mesures ont été réalisées sur 2 plantes, de 24 feuilles et 5 bouquets chacune. Les plantes témoins et stressées ont le même âge. Un modèle de type hyperbolique a été ajusté aux données de photosynthèse rang par rang (lignes). Haut (trait pointillé) : feuille 18. Bas (trait plein) : feuille 8. Les mesures ont été réalisées en serre à Avignon en juillet 2020, sur le génotype WVA106. Les écarts-types représentent les variations entre les répétitions biologiques.

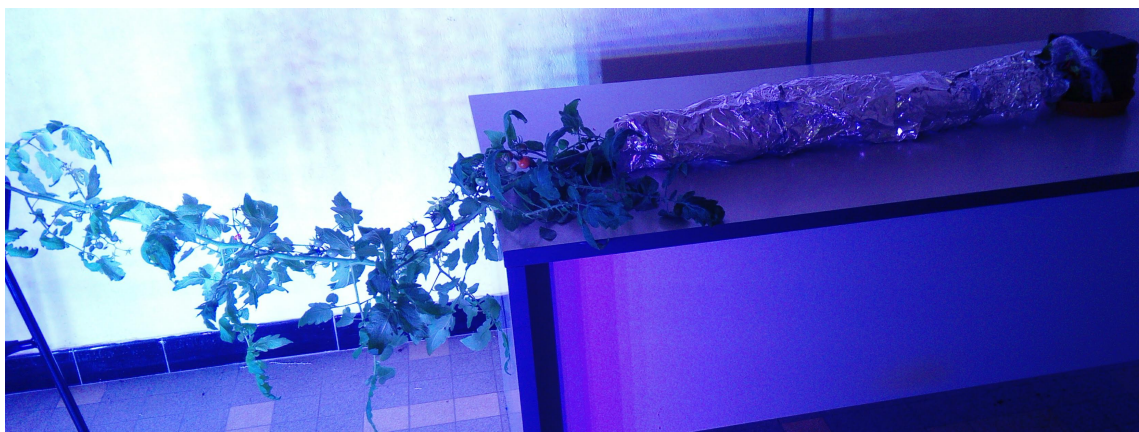


Figure 1.10 : Reproduction des conditions IRM. Plante WVA106 (298 cm de hauteur, 44 feuilles et 11 bouquets) allongée avec les feuilles du bas emballées dans de l'aluminium pour recréer la contrainte mécanique de l'espace disponible dans l'IRM ainsi que l'ombrage.

analyse de la variance à ces trois niveaux de PAR, on observe des différences significatives (p -value $< 2e-16$) de photosynthèse, de transpiration et de conductance stomatique en fonction du rang de la feuille, avec globalement des valeurs plus élevées en haut de la plante, mais une forte variabilité inter-rangs. Les valeurs de photosynthèse, de transpiration et de conductances stomatiques sont globalement plus faibles dans les conditions de l'IRM qu'en serre pour un même niveau de rayonnement.

Une autre session de mesure a été réalisée en serre à Avignon, en juillet 2020. Le but de cette expérimentation était d'imposer le rayonnement que les plantes perçoivent dans l'IRM ($200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) sur des plantes témoins et des plantes ayant subi un déficit hydrique et d'analyser l'activité photosynthétique et la transpiration associées (Figure 1.12). Pour les plantes témoins, les mesures ont été réalisées sur 3 plantes, de 28 feuilles et 6 bouquets chacune. Pour les plantes ayant subi un déficit hydrique, les mesures ont été réalisées sur 3 plantes, de 24 feuilles et 5 bouquets chacune. Pour les deux traitements, l'activité photosynthétique est significativement différente entre les rang (ANOVA, p value = 0.001 pour les plantes témoins et p -value = 0.035 pour les plantes WD), avec une augmentation de la photosynthèse en allant vers le haut de la plante, comme observé figure 1.11. Les valeurs de photosynthèse des plantes témoins et WD semblent se superposer, ce qui veut dire que pour un PAR de $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ l'effet du déficit hydrique mis en évidence figure 1.9 n'est pas observé. Pour les deux traitements la transpiration est significativement différente en fonction du rang (p -value = 0.0418 pour les plantes témoins et p -value = 0.0212 pour les plantes WD), avec des transpirations plus élevées en haut de la plante. La conductance stomatique est significativement différente en fonction du rang pour le traitement WD uniquement (p -value = 0.0099), avec une conductance qui augmente vers le haut de la plante. Globalement la transpiration et la conductance stomatique semblent légèrement plus élevées chez les plantes témoins mais la forte variabilité inter-plantes ne nous permet pas de l'affirmer.

Conclusion

Ces caractérisations écophysiologicals ont mis en évidence un effet rang à la fois sur la photosynthèse, la transpiration des feuilles et la conductance stomatique. Les feuilles les plus jeunes en haut de la tige ont une activité photosynthétique, une transpiration et une conductance stomatique plus élevées que les feuilles du bas, plus âgées. Dans le cas où des feuilles dépassent à la fois en haut et en bas de l'IRM, il vaut donc mieux privilégier un éclairage des feuilles du haut.

En serre, le traitement WD semble réduire la photosynthèse, la transpiration et la conductance stomatique en accord avec la littérature (Tardieu et al., 2006).

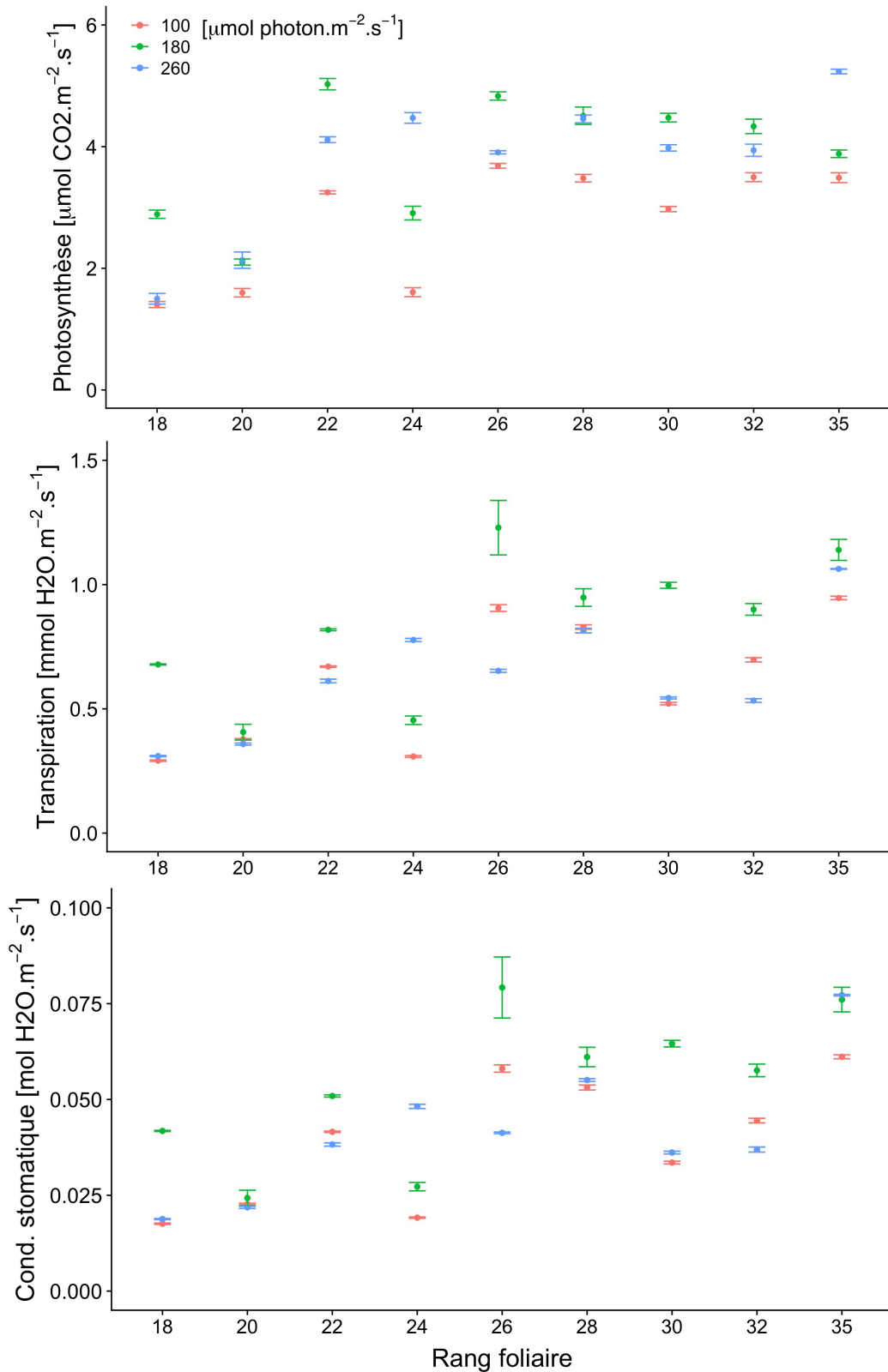


Figure 1.11 : Reproduction des conditions IRM. Activité photosynthétique ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et conductance stomatique ($\text{mol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en fonction du rang foliaire et de la quantité de lumière. Les mesures ont été réalisées sur les feuilles qui dépassent de l'aluminium, représentant les feuilles qui sont éclairées lorsque l'acquisition IRM est réalisée en bas de la tige principale. La quantité de lumière est égale à $100 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (rouge), à $180 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (vert) et à $260 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (bleu). Les mesures ont été réalisées sur une plante WVA106 de 298 cm de hauteur, 44 feuilles et 11 bouquets. Les écart-types correspondent aux répétitions techniques (6 par points).

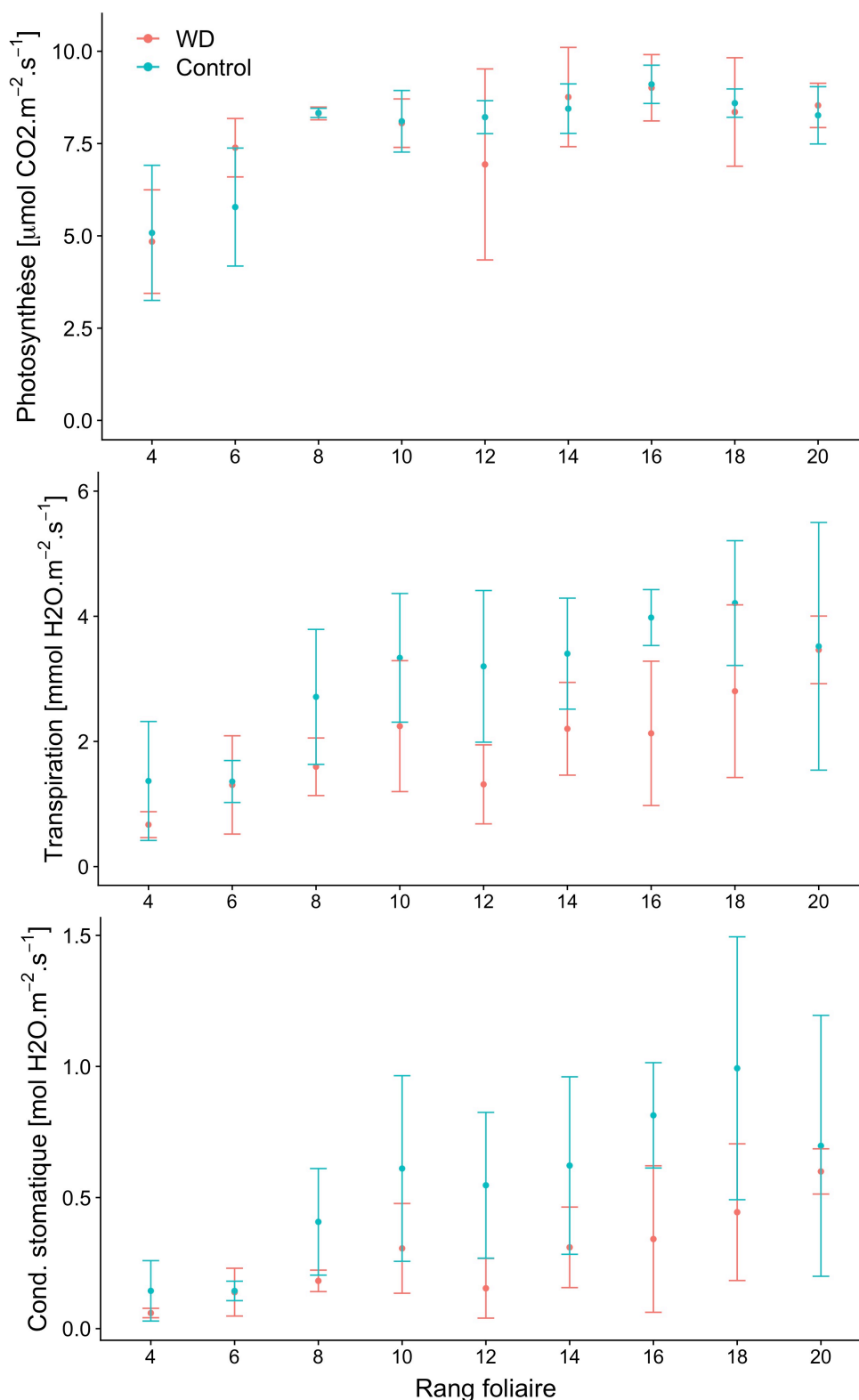


Figure 1.12 : Activité photosynthétique ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et conductance stomatique ($\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) pour un rayonnement de $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, représentant le rayonnement que les plantes perçoivent dans l'IRM. Pour les plantes témoins (« Control », en bleu), les mesures ont été réalisées sur 3 plantes, de 28 feuilles et 6 bouquets chacune. Pour les plantes ayant subi un déficit hydrique (WD pour « water deficit », en rouge), les mesures ont été réalisées sur 3 plantes WVA106, de 24 feuilles et 5 bouquets chacune. Ces mesures ont été réalisées en serre en juillet 2020. Les écarts-types représentent les variations entre les répétitions biologiques.

Comparé aux mesures en serre sous un rayonnement similaire (Figure 1.12), la photosynthèse est légèrement plus faible dans les conditions de l'IRM (Figure 1.11) : pour un PAR de 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ la photosynthèse varie entre 5 et 10 $\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ en serre contre 1 à 5 $\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dans les conditions de l'IRM. La transpiration est également plus faible dans les conditions IRM : entre 0,5 et 1,5 $\text{mmol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ selon le rang foliaire contre 1 à 4 $\text{mmol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ selon le rang foliaire en serre. La transpiration foliaire est donc de 2 à 4 fois inférieure dans les conditions de l'IRM. De même pour la conductance stomatique : elle est comprise entre 0,02 et 0,09 $\text{mol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ selon le rang foliaire contre 0 à 1,5 $\text{mol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ selon le rang foliaire en serre.

Nous en concluons que pendant les mesures IRM, malgré une position inhabituelle et relativement stressante, il subsiste une activité photosynthétique, un faible flux transpiratoire et une faible conductance stomatique. Les valeurs basses sont dues à la fois à la faible intensité lumineuse et à la position horizontale.

b. Croissance des fruits

Des mesures de croissance des fruits ont été réalisées en serre à Avignon et dans une salle à Montpellier où, de la même façon que pour les mesures de photosynthèse, toutes les conditions de l'IRM ont été reproduites afin de voir si les fruits grossissent dans ces conditions. Afin d'estimer le gain de matière fraîche des fruits de manière non destructive, nous avons mesuré la croissance en diamètre des fruits à l'aide d'un pied à coulisse, tous les jours pendant une semaine. Nous avons ensuite utilisé des données plus anciennes de diamètre de fruit et de matière fraîche sur WVA106 pour établir une relation entre ces deux variables. Ainsi nous avons pu estimer le gain de matière fraîche des fruits à partir de la mesure de diamètre. En serre, nous avons observé un gain moyen de 1,33 g en 7 jours, ce qui correspond à un gain de 0,19 g par jour. Dans les conditions de l'IRM, nous avons observé un gain de 0,39 g en 7 jours ce qui correspond à un gain de 0,06 g par jour, soit 3 fois inférieur à celui observé en serre. Les fruits grandissent donc dans les conditions de l'IRM, mais beaucoup moins vite qu'en serre.

4. IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE

a. Développement méthodologique IRM pour la mesure de la surface active et de la vitesse de flux du transport de sève dans la plante entière

Afin de mesurer finement les flux de sève *in vivo* au sein de plante de tomate, une méthode originale IRM basée sur des pondérations T_1 d'entrée et de sortie de coupes a été développée au cours ce travail de thèse (Buy et al., 2018 ; Simon et al., 2019a & 2019b). Cette méthode appelée « flip-flop » (FF) est complémentaire des travaux déjà décrits dans la littérature (Peuke et al., 2001; Windt et al., 2006; Scheenen et al., 2007) et elle permet de mesurer avec une bonne précision à la fois la surface des vaisseaux actifs c'est à dire les vaisseaux montrant effectivement un flux ainsi que la vitesse de ce flux de sève.

Considérations géométriques

Dans ce paragraphe, les différents aspects géométriques et concepts nécessaires à la description des phénomènes physiques mis en jeu sont donnés. La figure 1.13 est une représentation schématique longitudinale d'un vaisseau de rayon R transportant un flux laminaire de bas en haut à une vitesse maximale V . La figure 1.13 et l'équation 1.2 décrivent la distribution des vitesses :

$$\mathcal{V}(r) = V(1 - r^2/R^2) \quad (\text{eq. 1.2})$$

à une distance r par rapport au centre du vaisseau, $r \in [0, R]$. La vitesse maximale ($\mathcal{V}(0) = V$) est observée au centre du vaisseau. On obtient la vitesse moyenne du flux en intégrant :

$$\bar{V} = \frac{2}{R^2} \int_0^R \mathcal{V}(r) r dr = \frac{2}{R^2} \int_0^R V(1 - r^2/R^2) r dr = \frac{V}{2} \quad (\text{eq. 1.3})$$

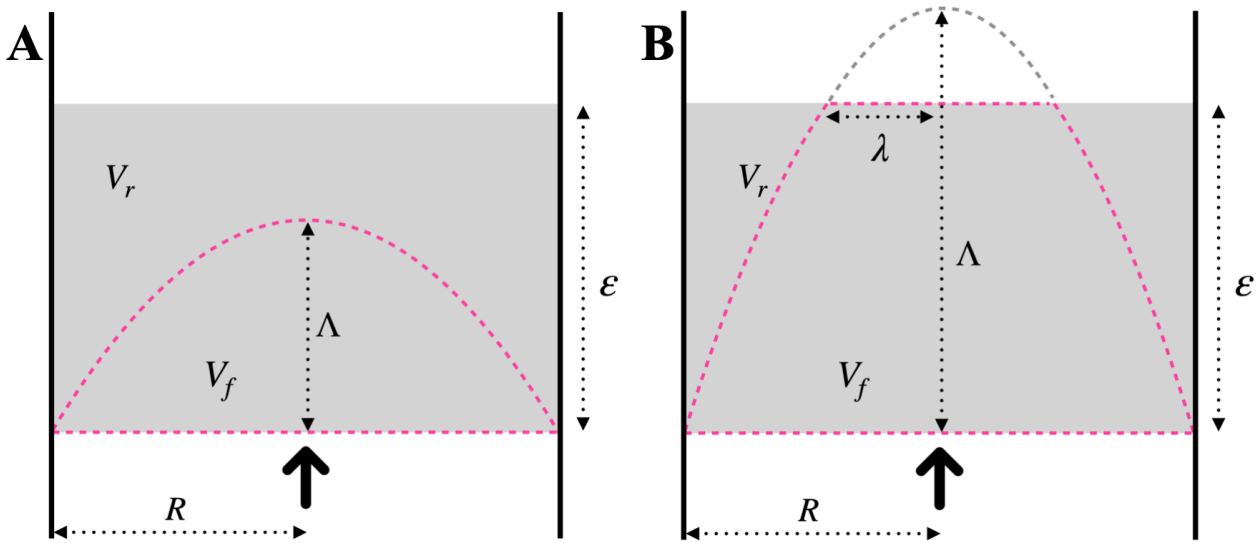


Figure 1.13 : Représentation schématique longitudinale d'un vaisseau de rayon R transportant un flux laminaire de bas en haut à une vitesse maximale V . Le volume « frais » V_f entrant dans la coupe d'épaisseur ε est un parabololoïde de hauteur Λ délimité par les pointillés roses. Les pointillés gris représentent le volume qui s'est échappé de la coupe. (A) Dans le cas d'un transport modéré où $\Lambda < \varepsilon$. (B) Dans le cas d'un transport élevé, où $\Lambda > \varepsilon$.

Lors de nos expérimentations IRM, la région d'intérêt (grisée) peut être sélectionnée et observée à différents instants. C'est une coupe fine d'épaisseur ε et d'un volume total $V_t = V_f + V_r = \pi R^2 \varepsilon$.

Lors d'un **transport modéré**, lorsque la zone sous la coupe d'intérêt pénètre sur une distance maximum Λ avec $\Lambda < \varepsilon$, (voir figure 1.13 A); le volume « frais » V_f^m entrant dans la coupe correspond à un parabololoïde de hauteur Λ . Il est donné par :

$$V_f^m(\Lambda) = \frac{\pi}{2} R^2 \Lambda \quad (\text{eq. 1.4})$$

Lorsque le **transport est élevé**, c'est à dire quand $\Lambda > \varepsilon$ (voir Figure 1.13 B), une partie du volume entrant traverse la coupe d'épaisseur ε et s'échappe par le haut. Le volume « frais » mesuré dans la zone d'intérêt V_f^e en résultant est dans ce cas un paraboloïde tronqué :

$$V_f^e(\Lambda) = \frac{\pi}{2}R^2\Lambda - \frac{\pi}{2}\lambda^2(\Lambda - \varepsilon) \quad (\text{eq. 1.5})$$

avec :

$$\lambda = R\sqrt{1 - \varepsilon/\Lambda} \quad (\text{eq. 1.6})$$

ce qui donne après simplification :

$$V_f^e(\Lambda) = \frac{\pi}{2}R^2(2\varepsilon - \frac{\varepsilon^2}{\Lambda}) \quad (\text{eq. 1.7})$$

On peut à présent brancher les deux fonctions V_f^m (équation 1.4) et V_f^e (équation 1.7) au point $\Lambda = \varepsilon$, et donner le volume entrant dans la coupe en fonction de Λ , comme présenté sur la figure 1.14 :

$$V_f(\Lambda) = \mathcal{H}(\varepsilon - \Lambda)V_f^m(\Lambda) + \mathcal{H}(\Lambda - \varepsilon)V_f^e(\Lambda) \quad (\text{eq. 1.8})$$

avec $\mathcal{H}(t)$ la fonction de Heaviside (si $t > 0$ alors $\mathcal{H}(t) = 1$, si $t < 0$ alors $\mathcal{H}(t) = 0$).

En substituant par les équations 1.4 et 1.7, on obtient :

$$V_f(\Lambda) = \frac{\pi}{2}R^2[\mathcal{H}(\varepsilon - \Lambda)\Lambda + \mathcal{H}(\Lambda - \varepsilon)(2\varepsilon - \frac{\varepsilon^2}{\Lambda})] \quad (\text{eq. 1.9})$$

Ce résultat sera appliqué dans la section suivante pour déterminer la modification des pondérations du signal RMN par un flux entrant dans la coupe.

Applications au calcul de flux par IRM

La figure 1.13 présente une coupe d'intérêt grisée dans laquelle un flux laminaire pénètre du haut vers le bas pendant le temps de répétition de la séquence d'impulsion IRM : T_R . La distance maximale parcourue par le flux entrant est alors donnée par :

$$\Lambda = VT_R = 2\bar{V}T_R \quad (\text{eq. 1.10})$$

L'expérience IRM que nous décrivons consiste à réaliser deux images ; la première (S_1) montrant un volume entrant (V_f) avec une aimantation à l'équilibre thermodynamique (M_0) et un volume restant (V_r) montrant un signal pondéré T_1 ; la deuxième image montrant un signal pondéré T_1 (S_2) occupant l'ensemble du volume ($V_t = V_f + V_r$). Le post-traitement consiste à faire la différence entre ces deux images ($\Delta S = S_1 - S_2$) afin d'obtenir une image paramétrique qui ne contient que le signal associé au flux entrant. En effet, on peut écrire :

$$S_1 = V_fM_0 + V_rM_0(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}}) \quad (\text{eq. 1.11})$$

et

$$S_2 = V_tM_0(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}}) = V_fM_0(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}}) + V_rM_0(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}}) \quad (\text{eq. 1.12})$$

ce qui donne après simplification :

$$\Delta S = S_1 - S_2 = V_fM_0e^{-\frac{T_R}{T_1}} \quad (\text{eq. 1.13})$$

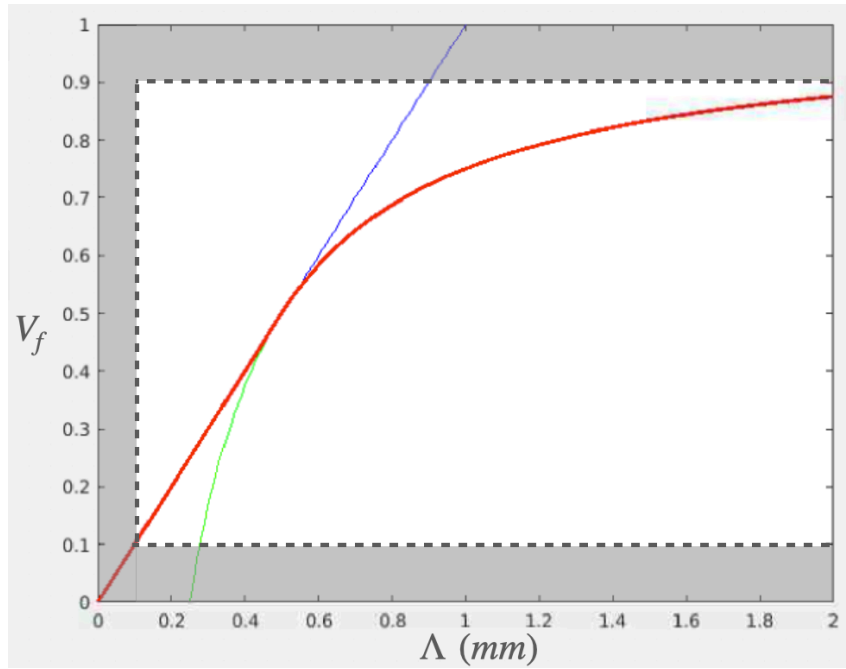


Figure 1.14 : La courbe rouge représente le volume frais V_f en fonction de Λ . Le cas représenté ici est pour une épaisseur de coupe ε égale à 0,5 mm et $\frac{\pi}{2}R^2 = 1$. Les courbes bleue et verte sont pour les volumes V_f^m et V_f^e , respectivement. La zone grise délimite l'intervalle de confiance (10%) qui permet de juger si l'entrée de coupe est suffisante devant le volume total V_t .

La figure 1.15 schématise l'expérience qui est réalisée. Deux blocs de 4 coupes jointives sont enregistrées, l'un dans le même sens que le flux et l'autre dans le sens opposé avec un temps de répétition T_R non distribué, en s'assurant que la quatrième coupe est commune. Dans le cas S_1 , les spins compris dans le volume frais (V_f : région en pointillés roses) n'ont pas reçu d'impulsion et leur aimantation est donc égale à M_0 . Les spins du volume restant ont eux reçu une impulsion RF, leur aimantation est donc pondérée T_1 . Dans le cas S_2 , tout le volume de la coupe ($V_t = V_f + V_r$: région grisée) reçoit une impulsion RF.

Ainsi en rapprochant les équations 1.9, 1.10 et 1.13 nous obtenons un modèle qui permet d'ajuster les points expérimentaux mesurés à différents T_R et ainsi de déterminer sur une image paramétrique (ΔS) la surface active et la vitesse de transport des flux :

$$\Delta S(V, T_R) = \frac{\pi}{2} R^2 [\mathcal{H}(\varepsilon - VT_R)VT_R + \mathcal{H}(VT_R - \varepsilon)(2\varepsilon - \frac{\varepsilon^2}{VT_R})] M_0 e^{-\frac{T_R}{T_1}} \quad (\text{eq. 1.14})$$

La Figure 1.16 présente le résultat obtenu classiquement lors de nos expérimentations.

L'ensemble du traitement numérique (transformée de Fourier, filtrage, recalage, ajustement des points expérimentaux...) est réalisé sur des images natives au format standard DICOM et sous un environnement Matlab.

Après soustraction des deux images, un seuil a été défini sur l'image paramétrique ΔS au delà duquel, le flux est significatif. Le signal est par la suite moyenné sur la surface « active » obtenue.

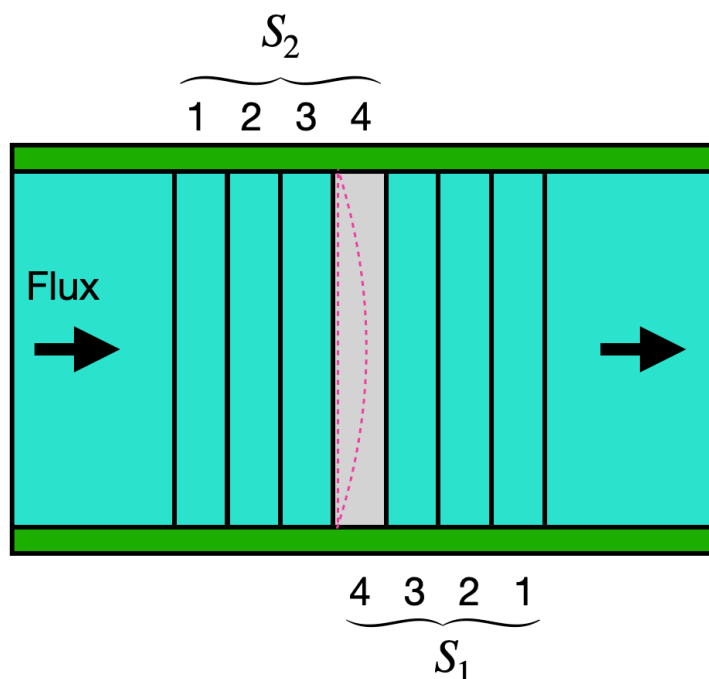


Figure 1.15 : Flux laminaire allant de gauche à droite. Les deux blocs de coupes jointives S_1 et S_2 sont représentés, avec S_2 dans le même sens que le flux et S_1 dans le sens opposé et ayant la coupe n°4 commune. Dans le cas S_1 , les spins compris dans le volume frais (V_f : région en pointillés roses) n'ont pas reçu d'impulsion et leur aimantation est donc égale à M_0 . Les spins du volume restant ont eux reçu une impulsion RF, leur aimantation est donc pondérée T_1 . Dans le cas S_2 tout le volume de la coupe ($V_t = V_f + V_r$: région grisée) reçoit une impulsion RF.

Pour l'ajustement des données de flux, une distribution des temps de relaxation T_1 est au préalable déterminée sur cette même zone à partir des données expérimentales sur la série d'images S_2 en fonction du temps de répétition T_R . Les résultats ainsi obtenus sont la surface active et la vitesse moyenne de flux qui permettent de calculer le flux moyen.

Cette approche permet d'observer une gamme de vitesses qui dépend du temps de relaxation T_1 du fluide qui est en mouvement. Par exemple, pour des temps de relaxation $T_1 \approx 1s$, déterminant la gamme des T_R à utiliser (typiquement de $\frac{1}{10}T_R$ à $3T_R$), sur une épaisseur de coupe de $0.5mm$, des effets d'entrée de coupe pourront être observés dès 10 % de cette épaisseur (voir Figure 1.14) soit $50\mu m$. Ceci correspond à des estimations raisonnables de vitesses basses de l'ordre de $0.05mm s^{-1}$. Pour les vitesses hautes, on s'attend à observer des effets jusqu'à des distances parcourues équivalentes à 3 ou 4 fois l'épaisseur de coupe, ce qui correspond donc à $2mm \cdot s^{-1}$.

b. Mesure de flux par IRM de contraste de phase

Description du principe dans le cas d'une seule vitesse

La mesure de flux par IRM peut aussi être réalisée en s'intéressant à la modification de la phase du signal au cours de l'application des gradients de phase. Bryant et al. (1984) ont montré qu'une séquence de spin écho avec l'ajout de deux gradients symétriques permet de suivre la vitesse du flux le long de la direction d'application du gradient (voir figure 0.12). Si on suppose que la vitesse est

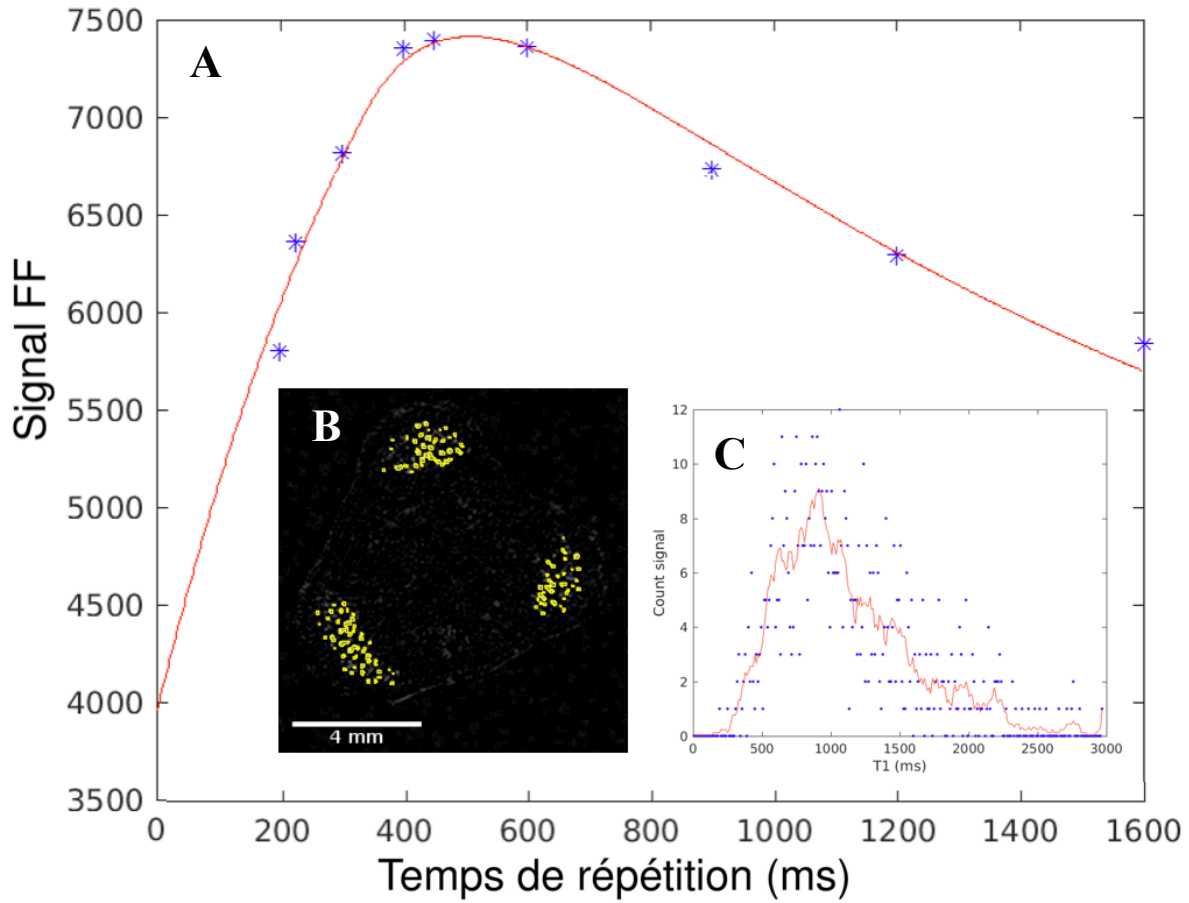


Figure 1.16 : (A) Données expérimentales (étoiles bleues) du signal FF en fonction du temps de répétition T_R en ms. L'ajustement des points expérimentaux par $\Delta S(V, T_R)$ donné par l'équation 1.14 est représenté en rouge, qui permet de mesurer la vitesse du flux et donc un flux en multipliant cette vitesse par la surface active. Ces données expérimentales sont issues de l'image paramétrique ΔS représentée en (B) (acquisition réalisée en bas de la tige principale d'une tomate WVA106, C-2-B0 dans le chapitre III). Les surfaces actives sont délimitées en jaune. Le meilleur ajustement a été obtenu avec une surface active de $1,12 \text{ m}^2$, une vitesse moyenne $\bar{V} = 0,739 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ et une la distribution T_1 correspondant à la surface active (C).

constante, le changement de position du spin va introduire un changement de phase entre les deux impulsions de gradient. Cette modification de la phase est proportionnelle aux positions s_1 et s_2 du spin le long de son parcours. Le long de la direction d'application du gradient nous avons donc les phases :

$$\phi_{1,2} = \gamma G \delta s_{1,2} \quad (\text{eq. 1.15})$$

avec γ le rapport gyromagnétique, G l'intensité du gradient et δ la durée des impulsions. Comme la distance parcourue $s_2 - s_1 = \Delta v$, avec Δ le délai entre les deux impulsions de gradients et v la vitesse du spin, la modification de phase peut s'écrire :

$$\phi = \phi_2 - \phi_1 = \gamma G \delta \Delta v \quad (\text{eq. 1.16})$$

La figure 1.17 décrit le phénomène observé lors du déphasage par une vitesse positive ou négative. On notera cependant la limitation de repliement de la phase qui impose une limite haute de vitesse mesurable V_{mes} avec la condition $|\phi| < \pi$:

$$V_{mes} = \frac{\pi}{\gamma G \delta \Delta} \quad (\text{eq. 1.17})$$

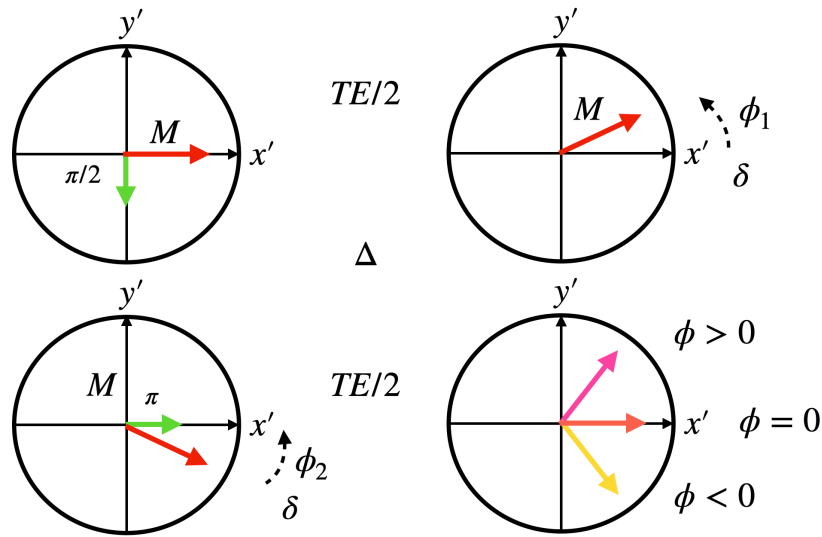


Figure 1.17 : Dans le référentiel tournant (x', y') , représentation schématique de l'aimantation lors d'une IRM pondérée diffusion en présence d'un flux constant. ϕ est la phase résultante après deux impulsions de gradients, qui est sensible à la direction et à la vitesse. Le vecteur vert représente les impulsions RF et les vecteurs rouges, roses et jaunes représentent la trajectoire de l'aimantation.

Modification de la phase dans le cas d'un flux laminaire

Dans le cas d'un flux laminaire, la phase est distribuée en suivant le profil des vitesses $\mathcal{V}(r)$ avec $r \in [0, R]$. On a donc :

$$\phi(r) = \phi_2(r) - \phi_1(r) = \gamma G \delta \Delta \mathcal{V}(r) \quad (\text{eq. 1.18})$$

qui montre donc un déphasage maximum (ϕ_M) au centre du flux laminaire à $r=0$:

$$\phi_M = \gamma G \delta \Delta V \quad (\text{eq. 1.19})$$

La figure 1.18 schématise la situation dans le cas d'un flux avec une vitesse positive. La moyenne de la phase mesurée au niveau de l'ensemble du flux peut donc être obtenue comme suit :

$$\bar{\phi} = \frac{2}{R^2} \int_0^R \phi(r) r dr = \frac{2}{R^2} \int_0^R \gamma G \delta \Delta V (1 - r^2/R^2) r dr = \gamma G \delta \Delta \frac{V}{2} = \gamma G \delta \Delta \bar{V} = \frac{\phi_M}{2} \quad (\text{eq 1.20})$$

Nous montrons ainsi, qu'une mesure de la phase moyenne $\bar{\phi}$ permet donc de déterminer une vitesse moyenne \bar{V} du flux (voir figure 1.18). On notera cependant la limitation de repliement de la phase qui impose une limite de vitesse mesurable V_{mes} avec la condition $|\bar{\phi}| < \pi/2$:

$$V_{mes} = \frac{\pi}{2\gamma G \delta \Delta} \quad (\text{eq. 1.21})$$

Sur la base de cet effet, les images de phase de nos expérimentations ont été traitées dans les zones actives (présentant un flux) déterminées par la méthode d'entrée de coupe (FF) présentée au paragraphe précédent.

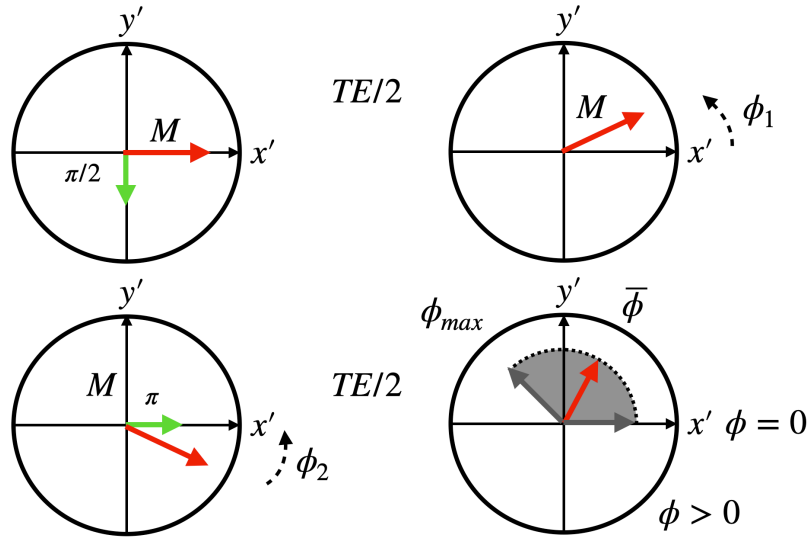


Figure 1.18 : Trajectoire de l'aimantation dans le cas d'un flux positif.

Modification de la magnitude du signal RMN dans le cas d'un flux laminaire

Dans le cas d'un flux laminaire, on s'attend à une modification par le transport des molécules, du signal mesuré au niveau du voxel ou de la région d'intérêt. En plus du mouvement Brownien décrit dans l'introduction, on s'attend à une chute du signal lié au déphasage introduit par la distribution de vitesse $\mathcal{V}(r)$. Comme le montre la figure 1.19 qui représente la distribution de l'aimantation dans une région d'intérêt en présence d'un flux laminaire, l'aimantation M peut s'écrire :

$$M = \Phi M_0 \exp(-B \text{VALUE ADC}) \quad (\text{eq. 1.20})$$

avec :

$$\Phi = \sqrt{\Phi_x^2 + \Phi_y^2} \quad (\text{eq. 1.21})$$

$$\Phi_x = \frac{2}{R^2} \int_0^R \cos(\phi(r)) r dr = \frac{2}{R^2} \int_0^R \cos[\gamma G \delta \Delta V (1 - r^2/R^2)] r dr = \frac{\sin(2\bar{\phi})}{2\bar{\phi}} \quad (\text{eq. 1.22})$$

$$\Phi_y = \frac{2}{R^2} \int_0^R \sin(\phi(r)) r dr = \frac{2}{R^2} \int_0^R \sin[\gamma G \delta \Delta V (1 - r^2/R^2)] r dr = \frac{1 - \cos(2\bar{\phi})}{2\bar{\phi}} \quad (\text{eq. 1.23})$$

Ce qui donne :

$$\Phi = \frac{\sqrt{2(1 - \cos(2\bar{\phi}))}}{2\bar{\phi}} = \left| \frac{\sin(\bar{\phi})}{\bar{\phi}} \right| = \left| \frac{\sin(\gamma G \delta \Delta \bar{V})}{\gamma G \delta \Delta \bar{V}} \right| \quad (\text{eq. 1.24})$$

Cette dernière équation donne une relation entre la perte de signal RMN (Φ) avec et sans gradient et la moyenne de la phase ($\bar{\phi}$). Cette relation est représentée sur la figure 1.20. L'équation 1.24, permet de déterminer la la vitesse moyenne du flux (\bar{V}). C'est sur la base de cette relation que nous avons traité les images paramétriques de magnitude dans les zones actives déterminées par la méthode d'entrée de coupes.

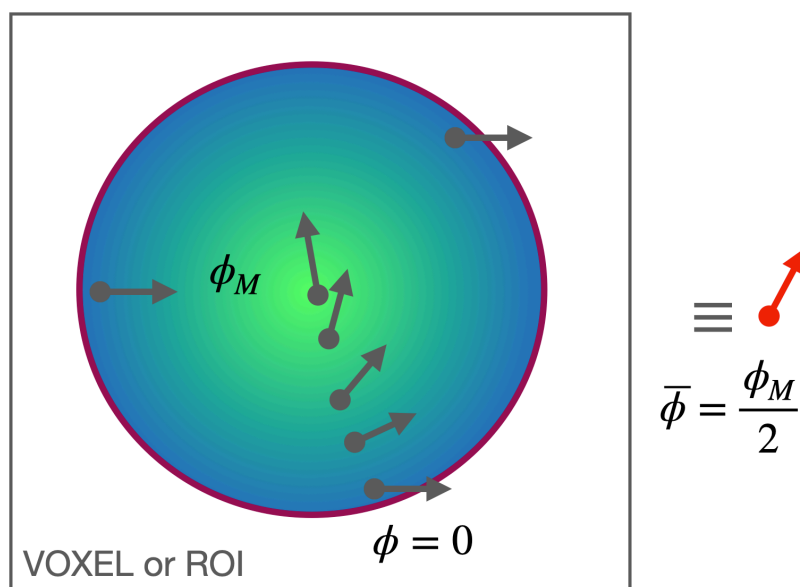


Figure 1.19 : Vue schématique de la distribution de l'aimantation dans une région d'intérêt en présence d'un flux laminaire pendant une expérience IRM pondérée diffusion. La phase moyenne ($\bar{\phi}$) et le module (la longueur du vecteur rouge) peuvent être calculés en utilisant la distribution de vitesse. ϕ_M représente le déphasage maximal.

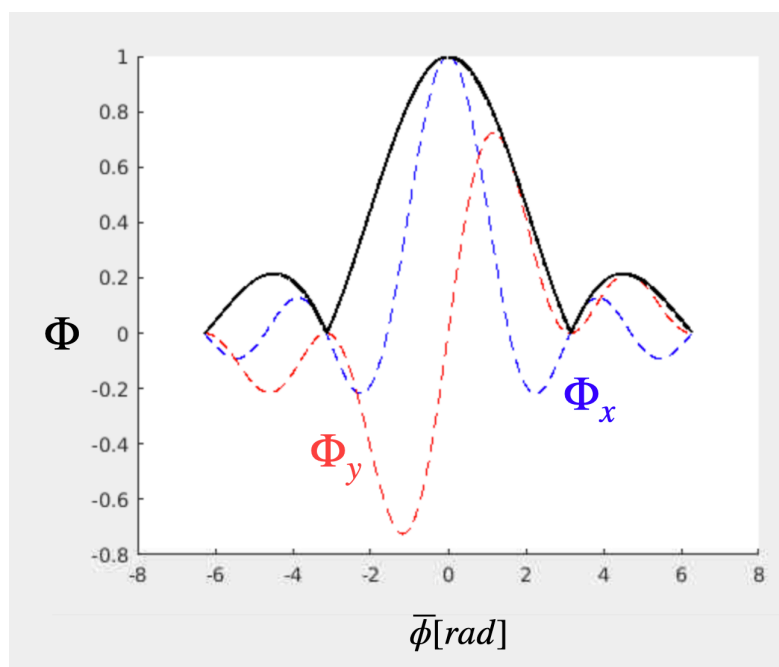


Figure 1.20 : Facteur Φ permettant de relier la chute du signal RMN à la vitesse moyenne \bar{V}

c. Mise en oeuvre des différentes méthodes de flux sur « fantômes »

Afin de valider les différentes méthodes de mesure de flux de sève développées et mises en oeuvre au cours de cette thèse, des expérimentations ont été réalisées sur des « fantômes » assurant la circulation de l'eau à des échelles et des vitesses proches de celles observées dans les plantes. L'objectif est de recouper par plusieurs techniques qui ne reposent pas sur le même phénomène physique les valeurs de vitesses et les surfaces actives trouvées.

Pour ce faire, nous nous sommes équipés d'une puce micro-fluidique développée spécialement au laboratoire pour nos expérimentations IRM. Le design choisi pour la puce comporte 2 allers-retours de section rectangulaire ($140\mu m \times 70\mu m$) connectés à un contrôleur et un débitmètre capable de réguler des débits de l'ordre de la dizaine de μL par minute. Ce montage expérimental a été couplé à une balance de précision afin de réaliser une contre-mesure par le poids de l'eau qui s'est écoulée tout au long des mesures du protocole IRM. La puce micro-fluidique a été insérée avec trois tubes de référence dans une bobine en forme de selle de cheval (14mm) dédiée aux travaux tomate plante entière, comme présenté sur les photos de la figure 1.21. Le protocole expérimental a consisté à mesurer par IRM plusieurs séries d'expériences d'entrée de coupe (FF) avec un temps de répétition T_R variable de $200ms$ à $1600ms$, ainsi que des séquences en spin écho avec gradient pulsé, en présence de 4 vitesses d'écoulement permettant de simuler les flux de sève.

La Figure 1.22 permet de visualiser la stabilité de l'écoulement au cours du temps de 0 à 25000s au cours des 4 expériences réalisées à 4 pressions différentes imposées par le contrôleur micro-fluidique. La pente permet de mesurer le débit pour chacune des 4 expériences et de remonter à la vitesse moyenne du flux connaissant la section des micro-canaux, soit $9,8 \cdot 10^{-3} mm^2$ (Figure 1.22).

Le tableau 1.2 présente pour les 4 débits massiques une gamme de vitesses comprises entre $0,1$ à $1 mm s^{-1}$. Les résultats des estimations de vitesse par IRM d'entrée de coupe et IRM de diffusion ont été réalisés sur les canaux C1 à C4 comme indiqués sur la Figure 1.23.

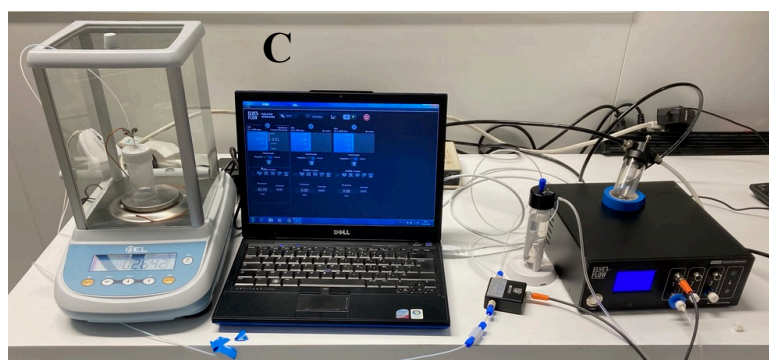
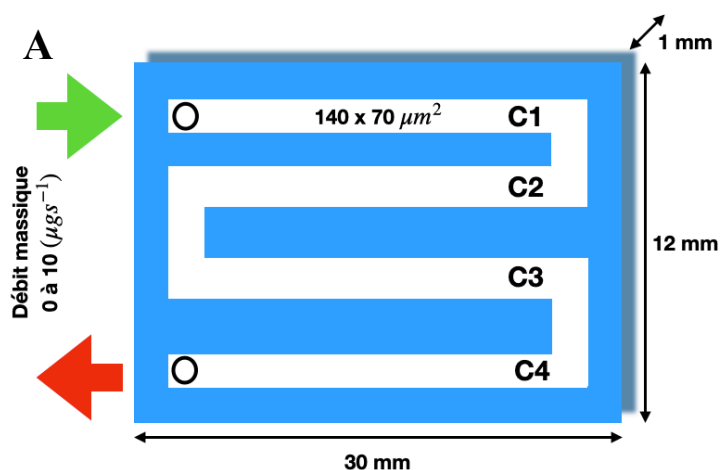


Figure 1.21 : (A) Représentation schématique de la puce de micro-fluidique utilisée pour valider les méthodes IRM. (B) Installation de la puce de micro-fluidique dans l'antenne selle de cheval de 14 mm de diamètre dédiée aux études sur la tige de tomate. (C) Photo de l'installation avec la balance de précision à gauche et le contrôleur de micro-fluidique à droite.

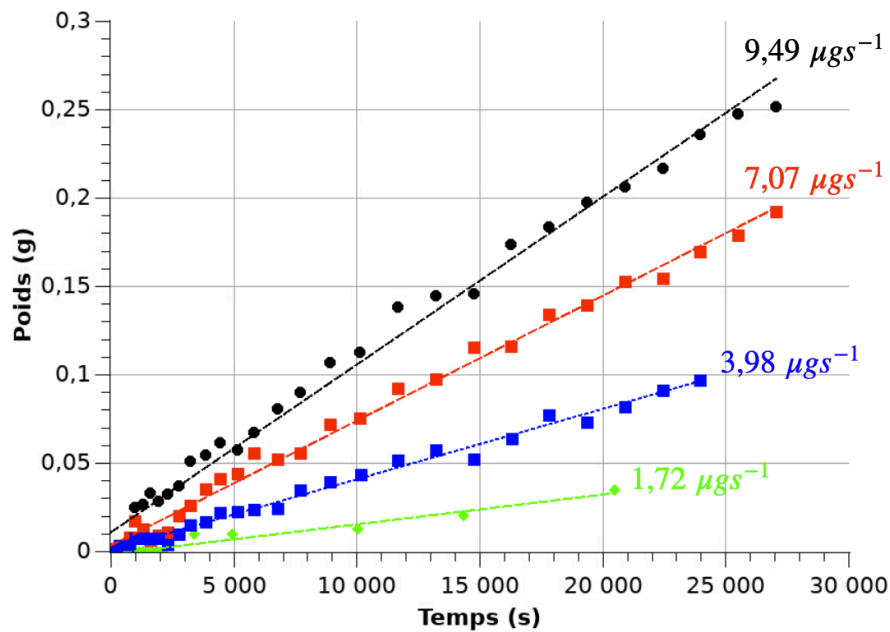


Figure 1.22 : Poids mesuré sur la micro-balance en fonction du temps en secondes. Détermination des vitesses de flux à partir des poids mesurés sur la balance. 4 expérimentations différentes avec 4 vitesses différentes

| Exp. | Pression Contrôleur (mBar) | Débit Massique (μgs^{-1}) | Vitesse à la balance (mm s^{-1}) | Vitesse IRM entrée de coupe 12 (mm s^{-1}) | Vitesse IRM entrée de coupe 21 (mm s^{-1}) | Module de la Vitesse IRM de phase (mm s^{-1}) | Vitesse IRM Magnitude (mm s^{-1}) |
|------|----------------------------|--|---|---|---|--|--|
| A | 40 | 9,49 | 0,97 | 1,04 | -1,00 | 1,08 | X |
| B | 30 | 7,07 | 0,72 | 0,78 | -0,72 | 0,83 | 0,71 |
| C | 20 | 3,98 | 0,41 | 0,44 | -0,28 | 0,36 | 0,28 |
| D | 10 | 1,72 | 0,18 | 0,16 | -0,21 | 0,06 | 0,11 |

Tableau 1.2 : Récapitulatif des débits massiques (μgs^{-1}), des vitesses mesurées à la balance (mm s^{-1}) et des vitesses mesurées par IRM (mm s^{-1}) selon la pression imposée par le contrôleur.

La figure 1.23 A présente une coupe axiale de la puce micro-fluidique à comparer avec l'image (C) d'une section de tige principale. On distingue les 4 canaux de taille similaire aux vaisseaux xylémiens ainsi que les 3 tubes de références. La Figure 1.23 B est une image paramétrique correspondant à la différence $\Delta S = S1 - S2$ entre les 2 images natives acquises à $T_R = 800\text{ms}$. Comme attendu, les 3 tubes de référence ainsi que 2 des 4 canaux (C2 et C4) transportant le flux ne sont plus visibles. Les 2 canaux visibles (C1 et C3 sur la Figure 1.23 B) contiennent l'information d'entrée de coupe qui est traitée comme explicité dans la section 4.a. La Figure 1.24 représente les points expérimentaux à différents T_R et l'ajustement permet d'estimer la vitesse moyenne \bar{V} du flux dans les canaux. Le traitement est reproduit dans le cas de la puce avec $\Delta S = S_2 - S_1$ afin de mesurer la vitesse sur les 2 autres canaux transportant le même flux. Les résultats sont résumés dans le tableau 1.2.

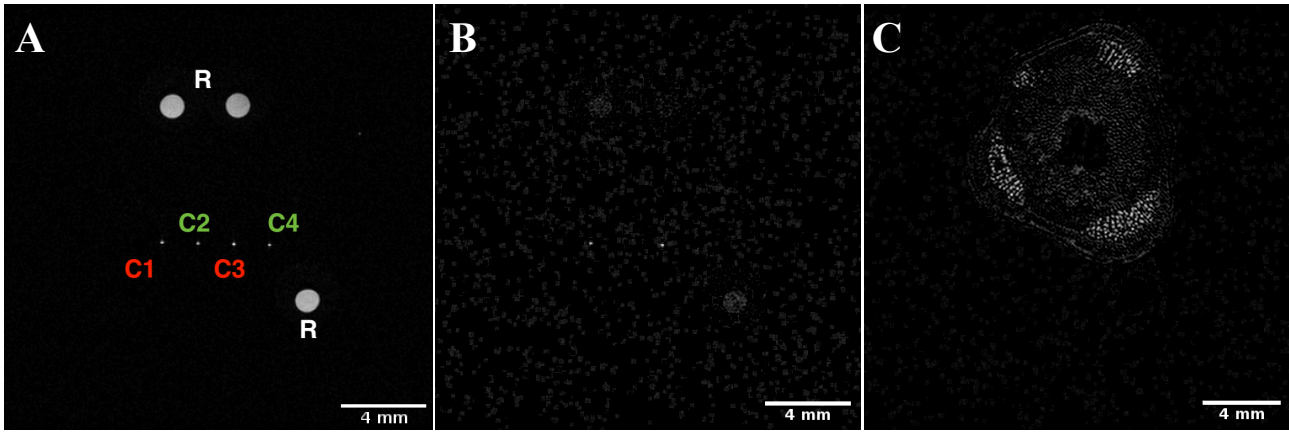


Figure 1.23 : (A) Image pondérée T1 des 4 capillaires (C1, C2, C3 et C4) avec les trois tubes d'eau de référence. (B) Image après soustraction FF des images natives acquises à $T_R = 800$ ms : les deux capillaires qui conduisent dans le sens dans lequel on regarde s'allument (C1 et C3). Lorsque la soustraction est faite dans l'autre sens, ce sont les deux autres capillaires qui conduisent (C2 et C4). (C) Image d'une section de tige principale de tomate à T_R 1600 ms pour comparer la taille des capillaires à celles des vaisseaux qui ressortent en hyper-signal.

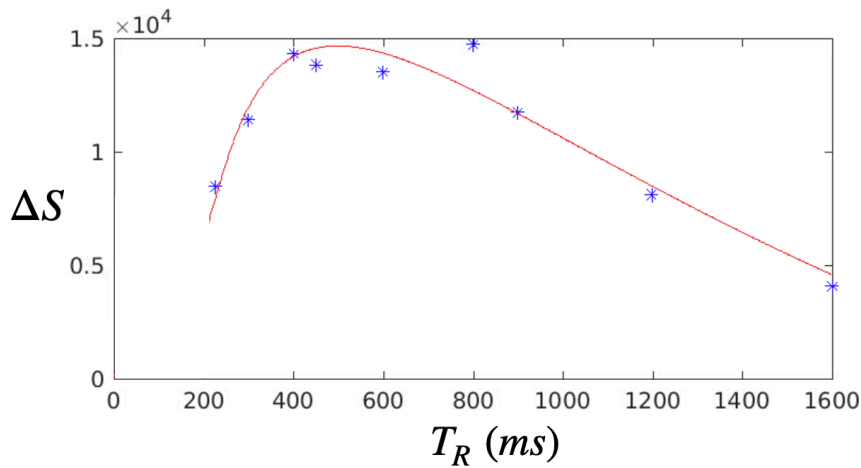


Figure 1.24 : Expérience A en IRM entrée de coupe, les points expérimentaux ΔS en fonction du temps de répétition T_R et l'ajustement afin de déterminer la surface active des canaux C1 et C3 et la vitesse moyenne du flux \bar{V} . Le meilleur ajustement est obtenu pour $T_1 = 1500$ ms, une surface active de $0,18 \text{ mm}^2$ correspondant à 2 canaux et une vitesse moyenne $\bar{V} = 1,04 \text{ mm s}^{-1}$.

Afin de réaliser une contre-mesure, l'IRM de contraste de phase a été mise en oeuvre. Le principe est décrit dans le paragraphe b. et les résultats sont résumés pour chacun des canaux dans le tableau 1.3. Les conditions expérimentales suivantes ont été utilisées pour déterminer la vitesse moyenne :

$$\bar{V} = \frac{\bar{\phi}}{\gamma G \delta \Delta \bar{V}} \quad (\text{eq. 1.25})$$

avec $\delta = 5 \text{ ms}$, $\Delta = 25 \text{ ms}$, $\gamma = 2,67 \cdot 10^4 \text{ rad s}^{-1} \text{ G}^{-1}$ et $G = 0,76 \text{ G cm}^{-1}$. Un très bon accord a été obtenu entre chacune des mesures par la modification de la phase du signal RMN en comparaison de la vitesse obtenue par le débit massique. Enfin, la modification de la magnitude du signal par un flux laminaire a été étudiée en s'appuyant sur l'analyse présentée dans la dernière partie sur paragraphe b. L'expérience A avec la vitesse la plus élevée n'a pu être exploitée à cause du faible signal sur bruit.

| Exp. | Pression Contrôleur (mBar) | Débit Massique ($\mu g s^{-1}$) | Vitesse à la balance ($mm s^{-1}$) | Vitesse C1 IRM phase ($mm s^{-1}$) | Vitesse C2 IRM phase ($mm s^{-1}$) | Vitesse C3 IRM phase ($mm s^{-1}$) | Vitesse C4 IRM phase ($mm s^{-1}$) | \bar{v} Vitesse Moyenne ($mm s^{-1}$) |
|------|----------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| A | 40 | 9,49 | 0,97 | 1,06 | -1,08 | 1,09 | -1,08 | 1,08 |
| B | 30 | 7,07 | 0,72 | 0,86 | -0,81 | 0,84 | -0,81 | 0,83 |
| C | 20 | 3,98 | 0,41 | 0,41 | -0,36 | 0,35 | -0,32 | 0,36 |
| D | 10 | 1,72 | 0,18 | 0,07 | -0,08 | 0,06 | -0,03 | 0,06 |

Tableau 1.3 : Contre-mesure de la vitesse par contraste de phase dans les quatre canaux C1, C2, C3 et C4.

Nous pouvons conclure, sur la base de cette série d'expériences de micro-fluidique proches des conditions expérimentales observées dans les végétaux, que les différentes approches IRM mises en oeuvre dans ce travail de thèse, permettent d'estimer de manière fiables et cohérentes les vitesses, les directions et les surfaces actives. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1.2 et présentés dans la figure 1.25.

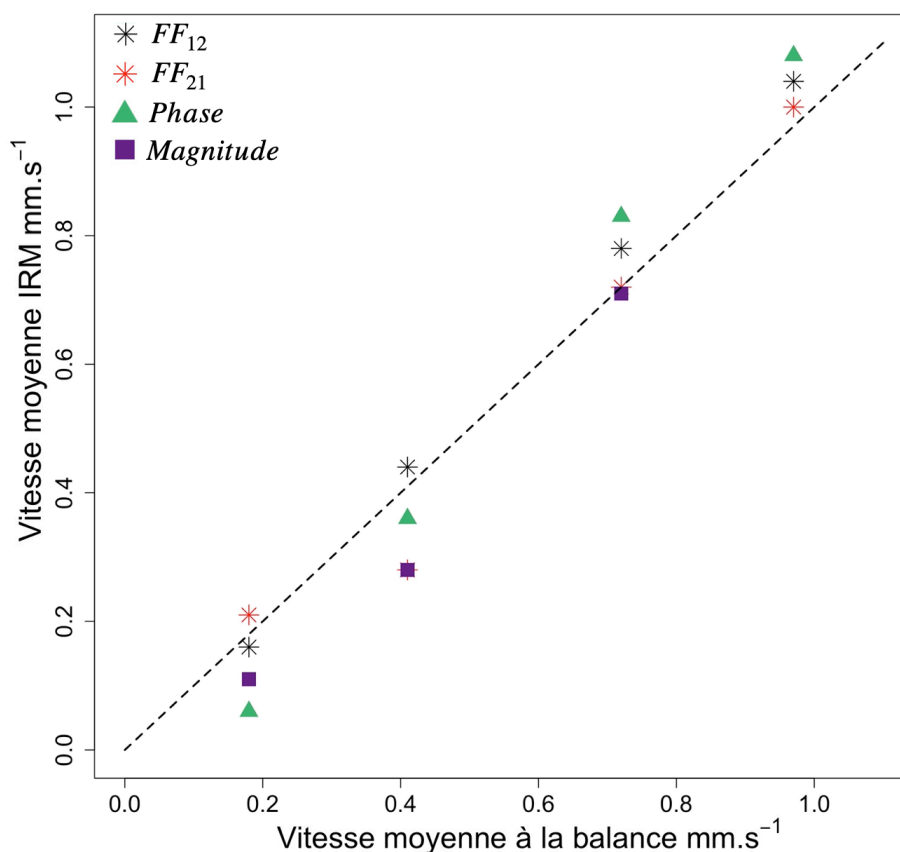


Figure 1.25 : Vitesse du flux d'eau dans les canaux de la puce micro-fluidique estimée par la méthode flip-flop (FF_{12} et FF_{21} en $mm.s^{-1}$) et par la modification de la phase (PHASE) en fonction de la vitesse estimée par la balance ($mm.s^{-1}$). La bissectrice est représentée en pointillée. Les couleurs et formes des points représentent les différentes manières d'estimer la vitesse : étoiles noires pour les mesures d'entrées de coupes (FF) dans le sens 12, étoiles rouges pour les mesures d'entrées de coupes (FF) dans le sens 21, triangles verts pour les mesures par contraste de phase et carrés violets pour les mesures de la magnitude.

d. Mesures à l'échelle du pédicelle

Dans l'optique de mesurer le flux à l'entrée des fruits ou à l'entrée du bouquet (pédoncule), une antenne « pédicelle » de type *Helmholtz* a été créée (Figure 1.26). En effet, un des objectifs initiaux de mon étude était de parvenir à mesurer les flux xylémiens et phloémiens à l'entrée des fruits (avant et après la zone d'abscission) et du bouquet, notamment pour reproduire les travaux de Windt et al. (2009).

Deux exemples d'acquisitions que nous avons réalisées, une au niveau du pédicelle et l'autre au niveau du pédoncule sont présentés figure 1.27. On atteint ici la limite de la résolution spatiale de la technique IRM et la petite taille du pédicelle et du pédoncule ne nous ont pas permis de distinguer correctement les tissus. Une instrumentation dédiée pourra être développée dans le futur afin d'augmenter le rapport signal sur bruit et accéder ainsi à des données physiologiques au niveaux de ces tissus.



Figure 1.26 : (A) Antenne pédicelle de type Helmholtz conçue pour faire des acquisitions à l'échelle du pédicelle de tomate ou à l'entrée du bouquet. (B) Installation d'un pédicelle de tomate WVA106 dans l'antenne pédicelle.

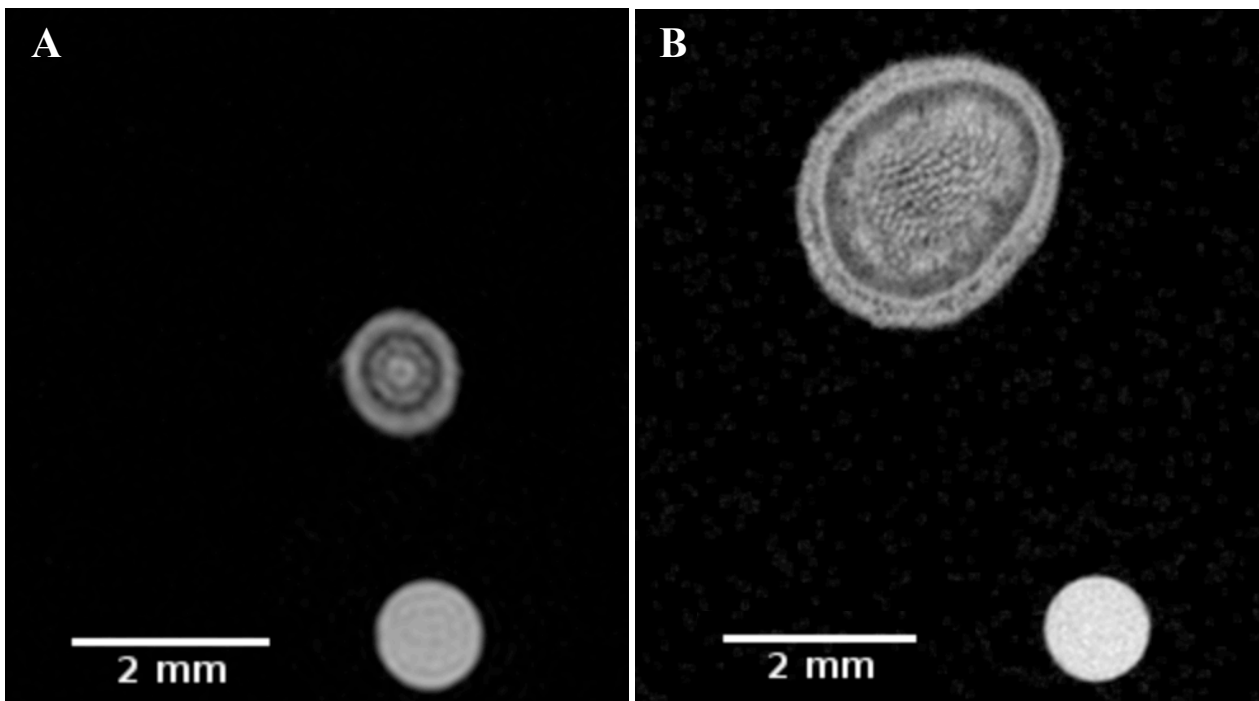


Figure 1.27 : Images pondérées densité protonique ($TR = 10000$ ms et $TE = 12$ ms) réalisées avec l'antenne pédicelle. Résolution : 1024×1024 . (A) Pédicelle de tomate WVA106 (haut) et tube de référence eau (bas). (B) Pédoncule de tomate WVA106 et tube de référence eau.

e. Les différents types d'expérimentations IRM réalisées au cours de la thèse

De nombreuses expérimentations IRM ont été réalisées au cours de la thèse. Ces expérimentations ont été réalisées à différents niveaux de la tige principale mais aussi à l'entrée du bouquet et des fruits. Dans ce manuscrit, nous nous sommes concentrés sur les résultats d'expérimentations réalisées sur les flux xylémiens (surface active, vitesse et flux) à l'échelle de la tige principale. Dans une future étude, un travail complémentaire d'acquisition et d'analyse spécifique aux flux phloémiens pourra être réalisé sur la base de nos avancées méthodologiques. Il en va de même pour les organes et tissus comme le pédicelle et le pédoncule, lorsque le développement d'une instrumentation spécifique sera optimisée.

Le protocole expérimental développé a consisté en une combinaison de mesures d'entrées de coupe (FF), puis de pondération de diffusion et enfin des mesures à T_R long (10 000 ms) pour obtenir des images pondérées densité protonique et T_2 . En fonction des expérimentations, ce protocole pouvait être répété de nombreuses fois au même niveau de la tige principale, pour étudier les variations de vitesse au cours du temps, ou bien une seule fois, mais à différents niveaux de la tige. Afin d'obtenir des vitesses à partir des mesures d'entrée de coupes, le protocole mis en place a une durée de 3 à 4h selon le nombre de T_R étudiés, suivi par le protocole de pondération de diffusion (1h à 3h selon le nombre de pondérations) et ponctuellement des mesures de temps de relaxation T_2 ont été réalisées. Ce protocole nous a permis d'étudier finement les activités des plantes le jour.

Les travaux de ce manuscrit se concentrent sur des expérimentations IRM avec des pondérations d'entrée de coupe et de diffusion d'une durée de 4h, répétées sur une même plante, à trois niveaux différents de la tige principale. De cette manière nous avons pu étudier l'effet du déficit hydrique par exemple, en réalisant des premières acquisitions sur plantes témoins puis sur plantes stressées le jour suivant.

5. HISTOLOGIE

Afin d'étudier et caractériser les surfaces des tissus vasculaires, un « pipeline d'analyses » a été développé, combinant coupes histologiques, coloration et analyse d'image. Dans le chapitre II, cette méthode a été utilisée pour étudier l'effet d'un déficit hydrique sur la surface des vaisseaux conducteurs à l'échelle du pédicelle, du pédoncule et de la tige principale et pour étudier la variabilité génétique des propriétés anatomiques du pédicelle, en lien avec la masse et la composition des fruits. Dans le chapitre III, cette méthode a été utilisée sur les zones de tige principale où une acquisition IRM venait d'être réalisée.

Après chaque expérimentation IRM, la zone imagée a été récoltée puis fixée pour pouvoir appliquer la méthode histologique et identifier précisément les tissus que l'on voit à l'IRM.

Cette étude a été réalisée sur la plateforme PHIV du CIRAD. La méthode est également décrite dans le matériel et méthode du Chapitre II. Une fois les échantillons récoltés ils sont fixés dans une solution composée de 9 volumes d'éthanol absolu et d'1 volume d'acide acétique pour conserver la structure des tissus (Sharma, 1956). Pour les échantillons de pédicelles ou pédoncules, ils sont ensuite inclus dans un gel d'agarose à 5% (Ref. LE-8200-B Sigma) avant d'être coupés transversalement au vibratome (Microm HM 650 V). Les échantillons de tige principale sont assez gros pour être directement coupés au vibratome sans inclusion dans l'agarose. Les coupes transversales ont une épaisseur qui varie entre 60 et 100 μm en fonction de l'échantillon. Les coupes ont ensuite été traitées avec une solution de javel diluée (10 à 13% de chlore) pour vider le contenu des cellules et augmenter le contraste entre les tissus, puis elles ont été colorées dans une solution de FASGA diluée à 1/7 (Tolivia and Tolivia, 1987) pendant 12h avant d'être rincées dans une solution de glycérol à 50%. La solution mère de FASGA est composée de 2mL de solution de

Safranine à 1%, de 14mL de Bleu Alcian à 0,5 %, d'1 mL d'acide acétique, de 30mL de glycerine et de 19,5 ml d'eau distillée. Le but de cette coloration est de mettre en évidence les zones cellulósiques et les zones lignifiées. Cette coloration n'est pas spécifique de la lignine ou de la cellulose, elle est basée sur la compétition entre les deux colorants (la Safranine et le Bleu Alcian). Les tissus colorés en rose/rouge ont des parois lignifiées et les tissus colorés en bleu ont des parois cellulósiques (Figure 0.2 de l'introduction). Les coupes sont ensuite montées sur des lames de microscopie, protégées par des lamelles. Les lames sont converties en données numériques après avoir été scannées au nanozoomer (NanoZoomer Digital Pathology System, Hamamatsu, Japan). Un plugin (PHIV_Tomate_toolset) a été développé sous Fiji (Schindelin et al., 2012) pour calculer le nombre et la surface des vaisseaux xylémiens et phloémiens. Les coupes sont divisées en cinq zones anatomiques correspondant (depuis l'extérieur vers l'intérieur de la coupe) au : cortex, phloème externe, xylème secondaire, phloème interne et moelle (voir Figure 0.2). Les masques des tissus sont obtenus de manière semi-automatique avec le plugin puis sont corrigés manuellement si besoin avant de calculer la surface des tissus.

CHAPITRE II : VARIABILITY OF STRUCTURAL TRAITS OF VASCULAR TISSUES IN TOMATO : MODELING AND HISTOLOGICAL INVESTIGATIONS

Jeanne Simon^{1,2}, Maïda Cardoso³, Béatrice Brunel¹, Eric Alibert², Christelle Baptiste⁴, Marc Lartaud⁴, Jean-Luc Verdeil⁴, Gilles Vercambre¹, Christophe Goze-Bac², Nadia Bertin¹

¹INRAE UR1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles - Site Agroparc - 84914, Avignon, France; ²Université Montpellier-CNRS, Laboratoire Charles Coulomb UMR 5221, F-34095, Montpellier, France; ³Université Montpellier, BNIF Imaging facility, F-34095, Montpellier, France; ⁴UMR AGAP, CIRAD, Montpellier, France

Under revision in « Plant-Environment Interactions ».

Le chapitre II est rédigé sous forme d'article qui est actuellement en révision dans le journal Plant-Environment Interactions. Ce chapitre fait référence aux méthodes histologiques présentées dans le chapitre précédent et au modèle Fruit Virtuel (Fishman and Génard, 1998 ; Liu et al., 2007) présenté dans l'introduction. L'objectif du travail était d'évaluer l'implication de la variabilité génétique et environnementale des surfaces de tissus conducteurs dans les variations de masse fraîche du fruit.

1. INTRODUCTION

Water and nutrient fluxes from source organs (leaves, roots) to sink organs (fruit, root tip, apex...) determine the growth and quality of fleshy fruits, such as tomato. Resources are transported through the xylem vessels and through the phloem sieve elements, which drive respectively, the transport of water and minerals from roots to leaves and fruits, and the translocation of sugar and amino acids from leaves to sink organs (Ho, 1996). Vascular tissues also transport molecules implicated in the signalization on long distances, which play an important role in response to stress (Lough and Lucas 2006 ; Spiegelman et al., 2015).

Many studies based on destructive or indirect methods such as isotopic labeling, balance method, heat girdling, have shown that the phloem tissues transport 80 to 90% of water imported by tomato fruit, while the remaining 10 to 20% is transported by the xylem (Ho et al., 1987; Van Bel, 1990; Guichard et al., 2005). However, contrasting results were observed by Magnetic Resonance Imaging (MRI) (Windt et al., 2009). Regarding photoassimilates, tomato fruit trusses are mostly supplied by the leaves below the truss through the internal phloem and to a lesser extent by leaves above the truss, through the external phloem, suggesting upward and downward movement in the respective tissues (Bonnemain, 1968; André et al., 1999). MRI measurements (Windt et al., 2009) also advocated the low contribution of the external phloem to fruit water supply. However, long distance transport of assimilates between remote sources and sinks has been demonstrated by truss pruning experiments (Slack and Calvert 1977; Heuvelink, 1995), thus suggesting that both internal and external phloem strands are functional for resource allocation to fruits.

The vascular system intensively develops during the early phase of flower bud and fruit development on both sides of the abscission zone (AZ) and the hydraulic conductance increases in the peduncle and pedicel parts during fruit development, due to secondary growth and formation of new vessels as reflected by the increase in pedicel and peduncle diameters (André et al., 1999; van Ieperen et al., 2003; Rancic et al., 2010). At the level of the AZ of the pedicel, the differentiation is delayed as well as the xylem lignification, and the higher hydraulic resistance is attributed to the lower number of differentiated vessels with reduced cross-sectional area, relatively to the rest of the pedicel (Lee, 1989; André et al. 1999; van Ieperen et al., 2003).

The role of the AZ resistance in preventing xylem backflow in period of water deficit (WD) has been widely discussed (Lee, 1989; Guichard et al., 2001; Malone and Andrews, 2001). Indeed, the hydraulic resistance of the pedicel AZ increases in plants grown under WD on the contrary to the resistance on both sides of the AZ, in which new secondary vessels are formed (van Ieperen et al. 2003). In agreement, WD reduces the pedicel xylem area, but increases the proportion of conducting vessels before and after the AZ (Rancic et al., 2008). Malone and Andrews (2001) confirmed the high hydraulic resistance between stem and fruit, but showed that xylem is functional and continuous throughout the tomato pedicel and estimated that more than 90% of the hydraulic resistance would occur within the fruit pericarp.

On their whole, these studies point out the need for an improved characterization of the structural and functional properties of vascular tissues and their variabilities, in order to understand and predict water fluxes between stem and fruit. In this perspective, process-based models could help integrating knowledge to analyze the effects of environmental and genetic factors on fruit growth. A modeling approach of water flow through the pedicel and within the fruit suggested that water importation in the young growing tomato could be limited mainly by the pedicel resistance and the phloem conductivity, linked to sap viscosity (Bussi eres 2002 ; Bussi eres et al., 2011). In agreement, a study on the design of tomato fruit ideotypes adapted to WD based on the Virtual Fruit model (Fishman and G enard, 1998 ; Liu et al., 2007) led to the hypothesis that the conductance of the

vascular tissues in the pedicel could be an interesting adaptation trait (Constantinescu et al., 2016). The Virtual Fruit model is a biophysical model of fruit expansion, which has been further extended to describe the longitudinal water fluxes in the pedicel and both longitudinal and radial water fluxes in the fruit (Hall et al., 2013). Using this model, Constantinescu et al. (2020) suggested that phloem-to-xylem bi-directional exchanges of water may regulate the daily influx of sugar to the fruit and buffer the variations of sugars in the pedicel, while xylem-to-apoplast recirculation of water through the fruit phloem may reduce xylem backflow at midday. Yet in the Virtual Fruit model, the xylem and phloem conductances are parameterized in a rather empirical way, assuming proportionality between fruit surface and xylem and phloem conductances, and constant xylem and phloem conductivities in the pedicel. Experimental data is missing to evaluate and validate such hypotheses. More generally, vascular tissue area, conductivity and viscosity interact, but none of these variables are easily measured, and they are usually predicted empirically in growth models, while they become overriding to simulated fluxes in stress conditions.

In the present study, we combined histological observations and process-based modeling in order to assess variations in the structural properties of vascular tissues in tomato plant during the reproductive period. An image analysis pipeline was developed to measure xylem and phloem cross-sectional areas of the vascular tissues in the pedicel of contrasting genotypes and assess the effect of WD. Then, this variability was implemented in the Virtual Fruit model, in order to evaluate its contribution to variations in fruit fresh and dry masses.

2. MATERIAL AND METHODS

a. Plant material and growth conditions

The study investigated 11 contrasting genotypes of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): West Virginia 106 (WVA106) a cherry tomato cultivar, the 8 parent genotypes of the MAGIC TOM population (Cervil, Criollo, Ferum, LA0147, LA1420, Levovil, PlovdivXXIVa (here called Plovdiv), Stupicke Polni Rane (here called Stupicke)) (Pascual et al., 2015 ; Ripoll et al., 2016), the wild-type of the Heinz genotype and the « Jointless » mutant of Heinz with no abscission zone (Mao et al., 2000). All plants were grown in a heated glasshouse (18 ± 2 °C night / 22 ± 4 °C day) in Avignon, in 5 L pots filled with humus (Klasmann, Substrat SP 15%) and automatically watered with a commercial nutrient solution (Liquoplant Rose, Plantin, Courthézon, France) in order to match the evaporative demand (control condition).

For the WD experiment, WVA106 plants were grown under three scenarios of irrigation: control, -50% of control (light WD) and -65% of control (severe WD). In case of severe WD, the reduction was applied either 15 days before the truss anthesis (early severe WD) or 4 days after the truss anthesis (late severe WD). In case of light WD, the reduction was applied 15 days before truss anthesis (early light WD). Treatments were applied on rows of 12 plants surrounded by border plants and each treatment was applied on two different rows (24 plants in total for each treatment). WD intensity was monitored according to previous experiments performed under the same glasshouse and genotype (Koch et al., 2018). Soil humidity (measured on soil aliquots) was kept constant until plant harvest at about 1.6 (control), 1.0 (light WD) and 0.6 (severe WD) gH₂O g⁻¹ of dried soil as described in Koch et al. (2018). The amount and frequency of irrigation increased as plants developed and varied daily depending on potential evapotranspiration (at least four daily irrigations). Side-shoots were removed and trusses were pollinated with a vibrator three times a week. Fruit trusses were pruned to 10 set-fruits per truss so that fruit load was comparable in control and WD. The glasshouse was whitened to avoid thermal stress. The average relative air humidity ranged from 40-50% at the beginning of the experiment to about 70%.

b. Pedicel and fruit growth

The pedicel and the fruit diameters of the second proximal (close to the stem) fruits of trusses that developed concomitantly on all genotypes were measured with a caliper (Digimatic AOS 500-161-30) throughout development (from fruit set to maturity). The pedicel diameter was measured at three positions: at the abscission zone (AZ) level, 5 to 10 mm before AZ on the stem side (AZs), and 5 to 10 mm after AZ on the fruit side (AZf) (Figure 2.1A). At the red ripe stage of the fruit, pedicels were sampled and immediately fixed and processed as described below for histological analysis. The fruits were weighted and dried in a ventilated oven to determine their dry mass and water content.

c. Histological pipeline to quantify the vascular tissue areas

A histological pipeline was developed to characterize the vascular elements in truss peduncle, fruit pedicel and main stem (Figure 2.1). First, fresh samples were fixed in Clarke's fixative solution (9 volumes of absolute ethanol in 1 volume of acetic acid) to keep the tissue structure (Sharma, 1956). Then, samples were embedded in a 5% agarose gel (Ref. LE-8200-B Sigma) and transversally cut using a vibratome (Microm HM 650 V). Slices were treated with a bleach solution (10 to 13% available chlorine) to remove the cell content and increase the contrast among tissues. Histological sections were stained overnight with a FASGA solution diluted at 1/7 (Tolivia and Tolivia, 1987), then rinsed in a 50% glycerol solution. FASGA mother solution was composed of 2 mL of Safranin solution at 1%, 14 mL of a Alcian Blue solution at 0.5%, 1 mL of acetic acid, 30 mL of glycerin and 19.5 mL of distilled water.

Glass slides were converted into high-resolution digital data with a Nanozoomer RS slide scanner (NanoZoomer Digital Pathology System, Hamamatsu, Japan). A plugin (PHIV_Tomate_toolset) was developed under Fiji (Schindelin et al., 2012) to calculate the number and the area of xylem and phloem vessels. Pedicel, truss peduncle and main stem transversal sections were divided in five anatomical zones corresponding to (from the outer surface to the center): cortex, external phloem, secondary xylem, internal phloem and pith (Figure 2.1C, D, E). The masks of the tissues were achieved semi-automatically with the plugin and then corrected manually (if necessary) before calculating the areas of each tissue.

d. Virtual Fruit model

The Virtual Fruit was used to assess the potential impact of vascular tissues on fruit growth. This process-based model simulates the water and dry matter accumulation during fruit growth, considering the fruit as one big cell connected to the stem by the pedicel vascular tissues (Fishman and Génard, 1998 ; Liu et al., 2007 ; Hall et al., 2013). Water and sucrose move from the stem to the fruit through the pedicel vasculature, and then within the fruit through composite membranes. Changes in fruit water content over time are calculated as the sum of xylem and phloem net influx (including possible xylem backflow), minus the water outflow due to fruit transpiration.

In the pedicel, the phloem flow depends on the pedicel phloem conductance (L_{p1}) and the stem-to-fruit gradients of turgor pressure and osmotic potential (Hall et al., 2013). The xylem flow is driven by the hydrostatic pressure difference between the stem xylem and the fruit xylem and depends on the pedicel xylem conductance (L_{x1}). In previous studies, L_{p1} and L_{x1} were assumed to remain constant during pedicel and fruit growth. In the present study, they were re-estimated based on the measured phloem and xylem areas.

In the fruit, the xylem and phloem fluxes are calculated from non-equilibrium thermodynamic equations involving the surface of exchange, which is assumed to be proportional to the fruit surface area. It also involves hydraulic conductivity, solute reflection coefficients of the membrane separating the fruit from the vascular tissues of the pedicel and hydrostatic and osmotic pressures,

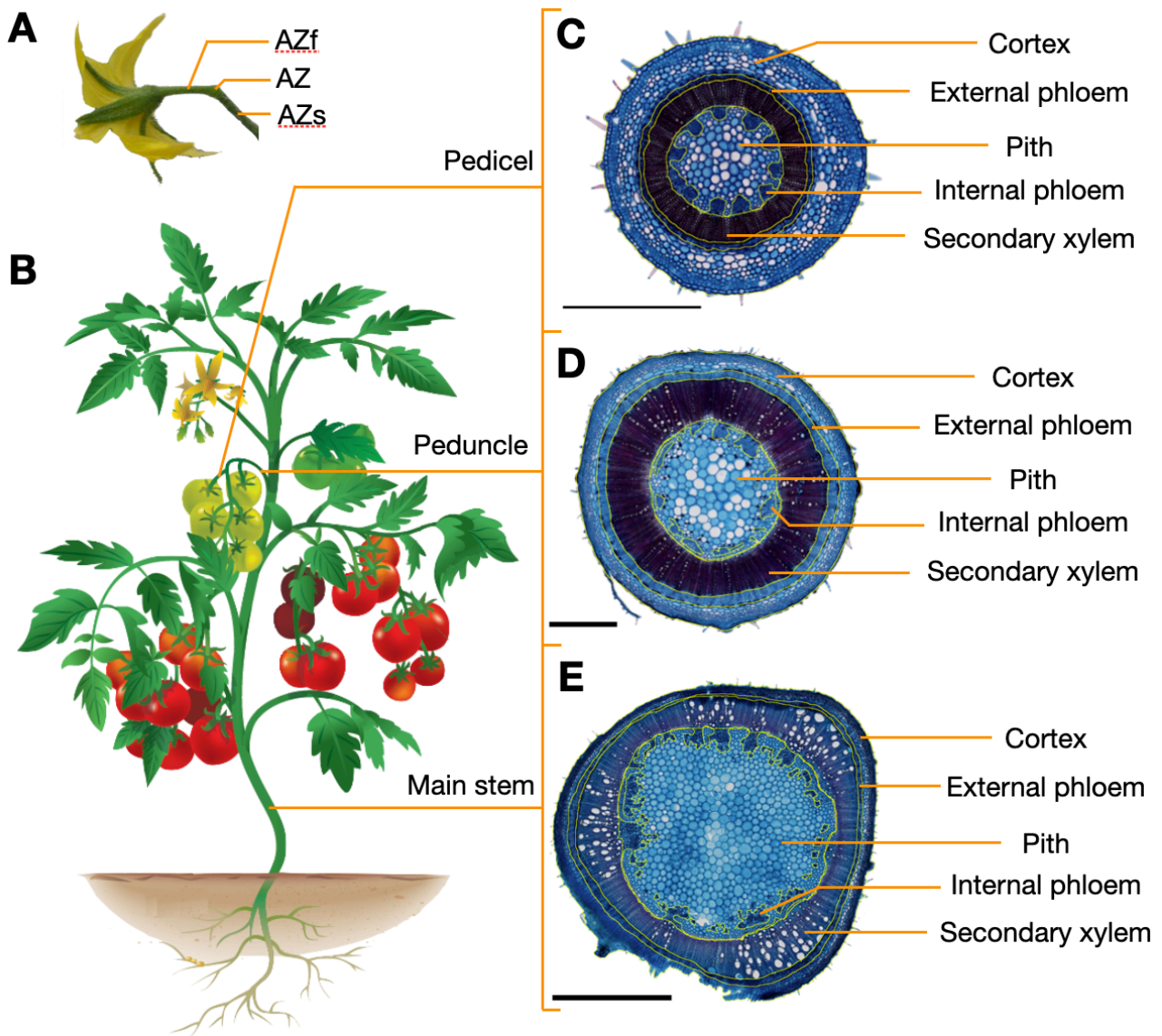


Figure 2.1 : (A) Flower and pedicel of a WVA106 tomato plant. (B) Schematic representation of a tomato plant with red ripe and growing fruits on several trusses along the stem. Transversal histological sections of a WVA106 tomato (C) fruit pedicel (fruit side or AZf), (D) truss peduncle and (E) main stem. FASGA stained : the red/pink zones indicate the cells with lignified walls (secondary xylem and support fibers) and the blue zones indicate the cells with non lignified cellulosic walls (phloem and parenchyma). The yellow lines correspond to the segmentation of the different tissue types. Segmentation was done using a plugin (PHIV_Tomate_toolset) developed on Fiji allowing to measure the area of each segmented histological zone. For (C) and (E), section thickness: 60 μm . For (D), section thickness: 80 μm . For (C) and (D), scale bars: 1 mm. For (E), scale bar: 2 mm. In this chapter, a focus was done on the fruit pedicel (C).

calculated from the molar concentrations of osmotically active compounds (soluble sugars, organic acids, potassium ...) (Liu et al., 2007).

The model inputs are two measured climatic variables: air temperature and humidity; and two plant variables: stem water potential and phloem sap concentration in sugars, of which values were taken from Constantinescu et al. (2016).

The Virtual Fruit model was calibrated for the genotype WVA106 based on independent data of fruit dry and fresh weights collected on control plants grown in a glasshouse. The nine estimated parameters are involved (1) in the sugars active uptake (nuM , the maximal uptake and tstar , τ_a giving the pattern of the sugar decrease during fruit growth), (2) in the fruit plasticity (Φ_{max} , the maximal plasticity and k , giving the plasticity decrease with fruit age) and (3) the xylem and

phloem conductance both in the pedicel and in the fruit. The genetic algorithm NSGA-II (Deb et al., 2002) was used to find the combination of parameters, which best predicts the experimental dry and fresh weights. The outputs of this algorithm depend on the random initial values chosen, so the optimization process was repeated 10 times.

e. Statistical analysis

Kinetic and histological data were analyzed with the R software (R Core Team, 2017). Kruskal-Wallis tests were used to compare the relative areas of vascular tissues, the pedicel diameter, the fruit fresh mass and dry matter content, between control and the different WD treatments. Tukey's range tests were used to compare the relative area of the vascular tissues between different plant organs.

3. RESULTS

a. Histological quantification of vascular tissues along tomato pedicel

The histological pipeline described above was first applied on pedicels of two genotypes, Heinz wild-type and Heinz Jointless, that differed by the presence (wild-type) or absence (Jointless) of an abscission zone (AZ). The increase in pedicel diameter over fruit development was not significantly different between AZf and AZs (data not shown). Similarly, the final fruit diameter, pedicel diameter and dry matter content (DMC) did not differ significantly between the mutant and the wild-type.

The histological properties along the pedicel (Figure 2.1A) were measured at fruit maturity for the 2 genotypes (Figure 2.2). At the AZ level, the xylem tissues were clearly non-lignified in the wild-type and the area of each tissue could not be quantified (Figure 2.2A). On the contrary in the mutant, a continuous lignification of the secondary xylem was observed at the level of the theoretical AZ (defined by the pedicel curvature) (Figure 2B). Comparing AZf and AZs, the proportion of secondary xylem to the pedicel section was lower on the fruit side than on the stem side whereas the proportion of cortex was higher. This was observed both in the wild type (Figure 2.2C) and the mutant (Figure 2.2D), but differences were significant for the wild type only ($P=0.013$). In the mutant, the proportions of tissues in the theoretical AZ and in the AZs were very similar.

In the following, the genotypic variability and environmental impact on tissue proportions were measured on the AZf only for the sake of simplicity.

b. Assessment of the genotypic variability of pedicel diameter and vascular tissue areas

The pedicel growth was investigated in relation to fruit expansion on the two Heinz genotypes and on the eight MAGIC TOM parents. Whatever the genotype, the increase in pedicel diameter followed similar trajectories and stopped growing as the fruit was still rapidly expanding (Figure 2.3). These observations suggest that the vascular tissue area was set before the occurrence of the maximum fruit growth rate.

A histological analysis of the pedicel was performed on 11 genotypes (the previous 10 genotypes, adding WVA106) at fruit maturity (red ripe stage). Genotypes were grouped in three classes of fresh mass (FM) (Figure 2.4A): small fruit ($FM < 15g$), large fruits ($FM > 100g$), and medium fruits in between. The comparison of the three classes outlined significant differences in FM ($P < 0.01$). The DMC (Figure 2.4B) and pedicel diameter (Figure 2.4C) were significantly different in the small fruit class only ($P < 0.01$), with a higher DMC and a lower pedicel diameter.

When expressed in relative proportions of the pedicel section, the cortex was always the most important tissue (more than 30% of the total area for all genotypes) followed by the secondary

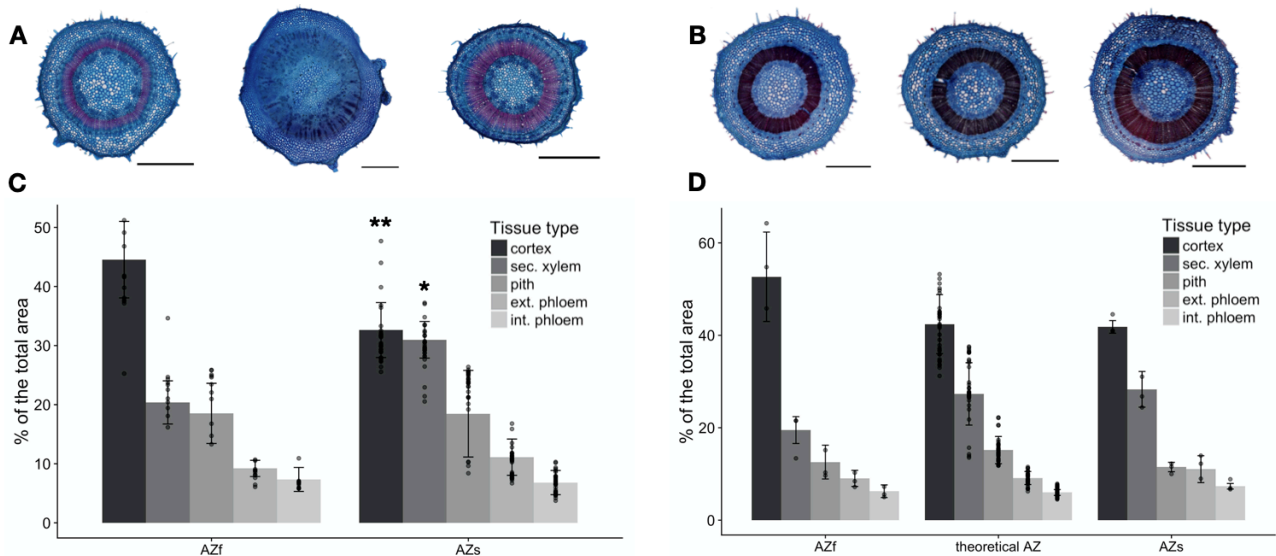


Figure 2.2 : Transversal histological sections (A and B) and relative proportions of tissues (C and D) along the tomato pedicel of Heinz wild-type (A and C) and Heinz Jointless (B and D) genotype. (A, B) Left: fruit side of the pedicel (AZf); middle: actual (wild type) or theoretical (jointless: at the level of the pedicel curvature) abscission zone (AZ); right: stem side of the pedicel (AZs). (C, D) The different shades represent the different tissue types (see label box). Each point (in transparency) is an experimental measurement. Error bars represent the standard deviation among fruits. Stars indicate significance differences between the proportions of tissue in the AZs and the AZf: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Transverse sections (thickness: 60 μm) were stained by FASGA. Scale bars: 1 mm.

xylem or by pith depending on genotype, whereas the external and internal phloem proportions were the smallest (Figure 2.4D). Focusing on vascular tissues, the proportion of secondary xylem varied from 15% (Cervil) to 31% (Heinz Jointless), the proportion of external phloem varied from 6% (Cervil) to 11% (Stupicke) and the proportion of internal phloem varied from 2% (Cervil) to 7% (LA0147). In absolute area, the secondary xylem was always the largest and the internal phloem was the smallest (Figure 2.4E). The mean absolute area of secondary xylem varied by a factor of 4.3 between WVA106 (lowest value) and Heinz Jointless (highest value), the mean area of external phloem varied by a factor of 4.8 between LA1420 and Heinz wild-type and the area of internal phloem varied by a factor of 6.2 between Criollo and Heinz wild-type. To better explore the links among variables, a principal component analysis (PCA) was performed on the proportions of tissues, the pedicel diameter, the fruit FM and DMC (Figure 2.5). The first axis (43% explained variance) separates individuals with high fruit FM, high pith and internal phloem proportions and high pedicel diameter ($\text{PCA1} > 0$), from individuals with high proportions of cortex and high DMC ($\text{PCA1} < 0$). The second axis (23% explained variance) mostly represents individuals with high proportions of secondary xylem and external phloem ($\text{PCA2} < 0$). The projection of the 11 genotypes on the first plane evidenced a first group located at the top right corner and composed of two large fruit genotypes (Levovil and LA0147) and one medium fruit genotype (Heinz wild-type) with relatively low DMC ($< 7\%$). This group was associated with a low cortex proportion, high pedicel diameter and high pith and internal phloem proportions. On the opposite at the top left corner, Cervil the genotype with the smallest FM and highest DMC was associated with a small pedicel diameter, a high cortex proportion, and low proportions of pith, secondary xylem and internal and external phloems. Two other atypical genotypes were discriminated on the second axis. Ferum, a genotype of the large fruits group with a relatively high DMC was associated with a low proportion of external phloem and secondary xylem, in contrast with LA1420, a genotype with a relatively low DMC compared to its small size (FM $< 25\text{g}$). The other small fruit genotypes were poorly represented on this PCA.

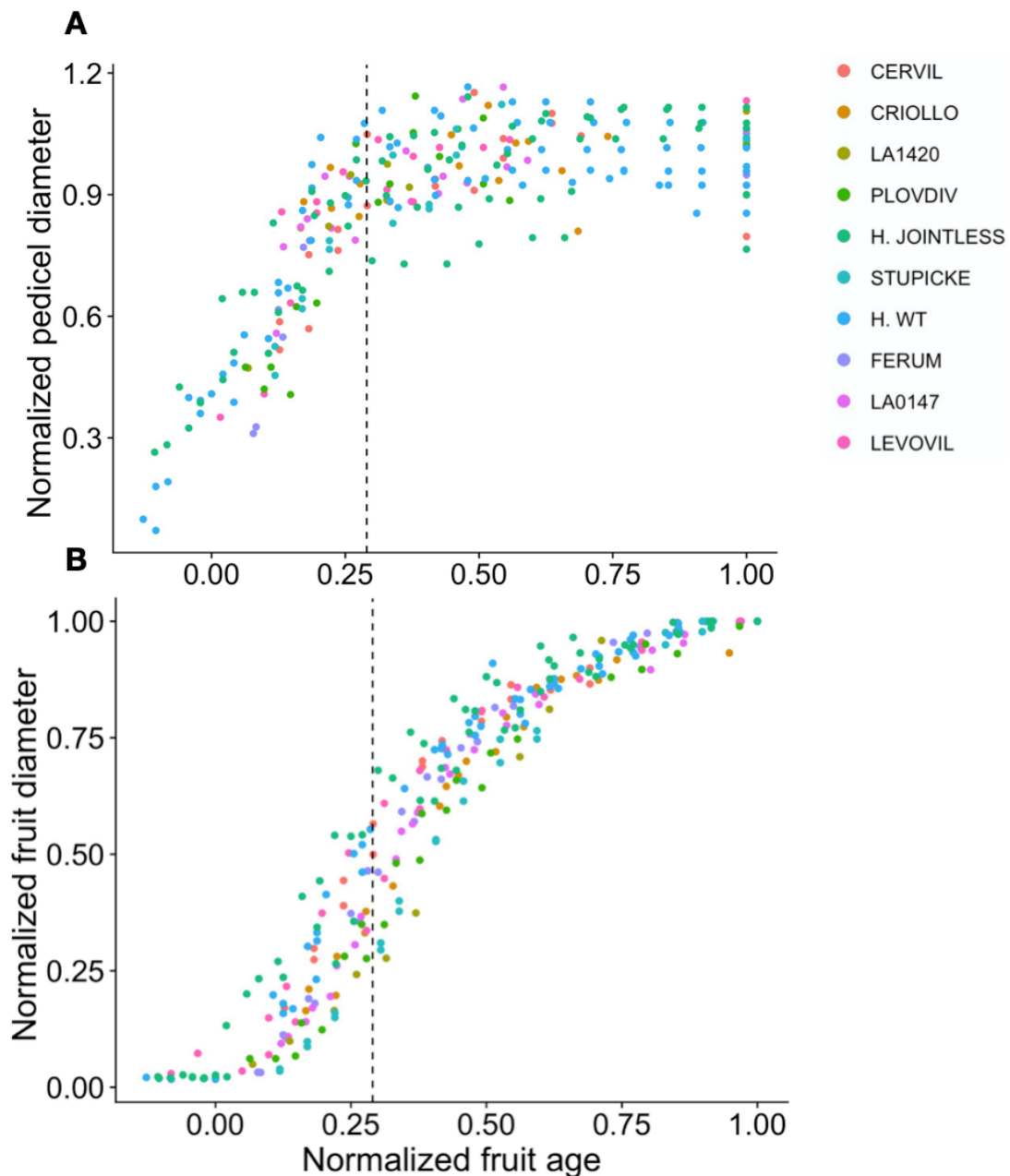


Figure 2.3 : Pedicel and fruit growth kinetics. (A) Pedicel diameter normalized plant by plant by the mean value of diameter at the plateau as a function of the fruit age normalized by the age at maturity. (B) Fruit diameter normalized plant by plant by the final diameter as a function of the normalized fruit age. For (A) and (B) each point represents one plant at a given time, the different colors represent the different genotypes and the black dashed line indicates the time when pedicels growth reached a plateau. Measurements were carried out on reproductive plants bearing 7 to 10 fruiting trusses.

c. Water deficit impact on the pedicel diameter and vascular tissues of the tomato pedicel in relation to fruit growth

Three scenarios of WD were applied on genotype WVA106. All of them significantly reduced the fruit FM (-12.9%, -22.6% and -26.9%, for the early light, early severe and late severe WD, respectively) and significantly increased the DMC (+24.3%, +24.3% and +16.5%, for the early light, early severe and late severe WD, respectively) (Figure 6A, B). The pedicel diameter was

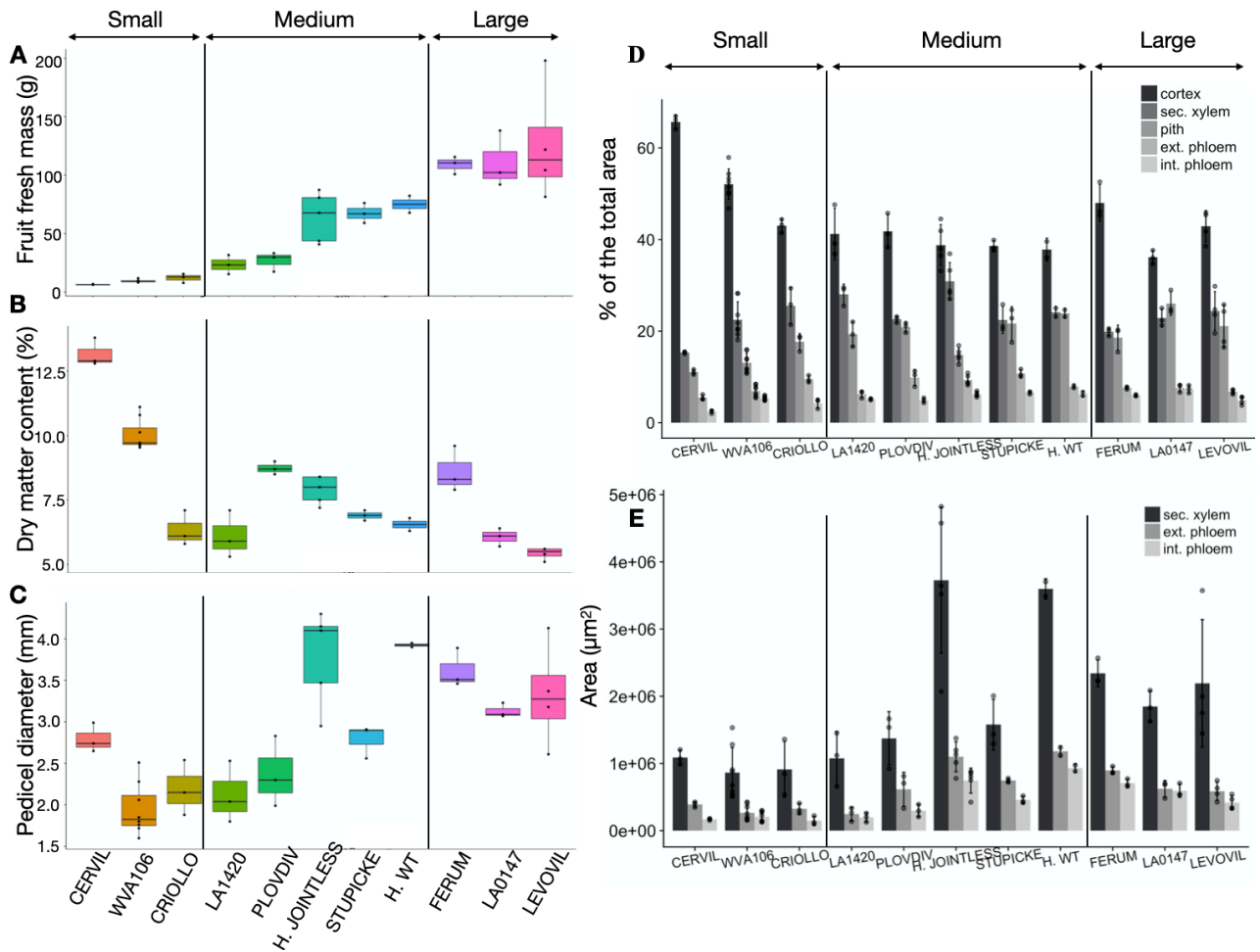


Figure 2.4 : Fruit and pedicel traits depending on genotypes: (A) Final fruit fresh mass in g. (B) Final fruit dry matter content in g 100 g⁻¹. (C) Final pedicel diameter in mm. (D) Mean area proportion of the tissues in the pedicel section. (E) Area of the vascular tissues in the pedicel section in µm². The different shades represent the different tissues (see label box). For (A), (B), (C), (D) and (E), genotypes are ranked from the smaller to the larger genotype in terms of fresh mass, from left to right. Three categories of fruit size are indicated: small fruits (FM<15g), large fruits (FM>100g) and medium fruits between. Each point (in transparency) represents a fruit. Measurements were carried out on reproductive plants bearing 7 to 10 fruiting trusses.

significantly lower in the early severe WD than in the control treatment (-21.1%) and was not significantly affected in the two other scenarios (Figure 2.6C).

The early severe WD provoked a significant reduction of the absolute areas of secondary xylem (-54%), pith (-63%), external phloem (-55%) and internal phloem (-51%). This led to a significant decrease in the proportions of secondary xylem (-18.6%) and pith (-33.3%), and a significant increase in cortex proportion (+21.3%), whereas the phloem tissues were not affected. In this treatment, the strong reduction of the pedicel diameter could explain the significant effect on the absolute areas (Figure 6C). The early light WD provoked a significant reduction of the absolute areas of pith compared to the control (-53%). In proportions of the pedicel section, the early light WD significantly increased the proportion of cortex (+12.8%) and decreased the proportions of pith (-39.4%) and internal phloem (-16.6%). The late WD did not significantly affect the areas of tissues.

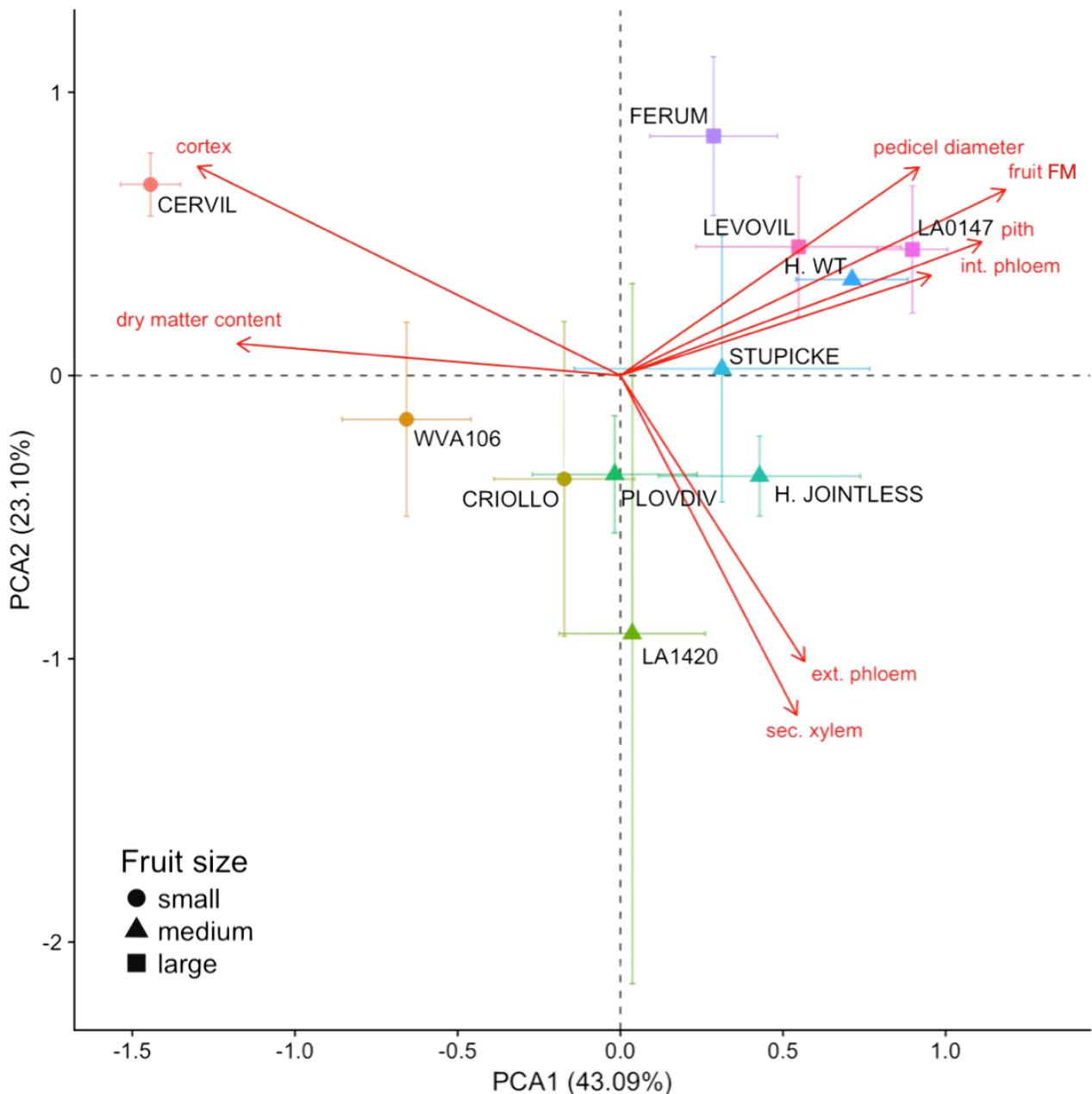


Figure 2.5 : Principal Component Analysis (PCA) of the genetic variations in fruit and pedicel traits. Each point represents the barycenter of the genotype, with error bar representing the standard deviation, and each color represents a genotype. Variables are scaled to unit variance and highly correlated variables have been removed (>0.85). Small fruit: $FM < 15g$, large fruits $FM > 100g$ and medium fruits in between. The third axes and the fourth explained 10% of the variance each, but did not discriminate well the genotypes.

d. Model-based analysis of the contribution of vascular tissues to water deficit impact and to genotypic variability on tomato fruit mass

The Virtual fruit model, calibrated for WVA106 in well-watered conditions (see material and methods) was run for a 28-days period of rapid fruit expansion (starting at 10 days after anthesis, i.e. after the cell division period). The final fruit FM and DMC simulated for WVA106 under control conditions were 9.86g and 8.3%, respectively, which fits well with the experimental data (Figure 2.7). In order to evaluate the contribution of the WD-induced and genotypic variations of xylem and phloem areas on fruit growth, the pedicel conductance were modified in the model according to experimental measurements, all other parameters being unchanged. For that, the

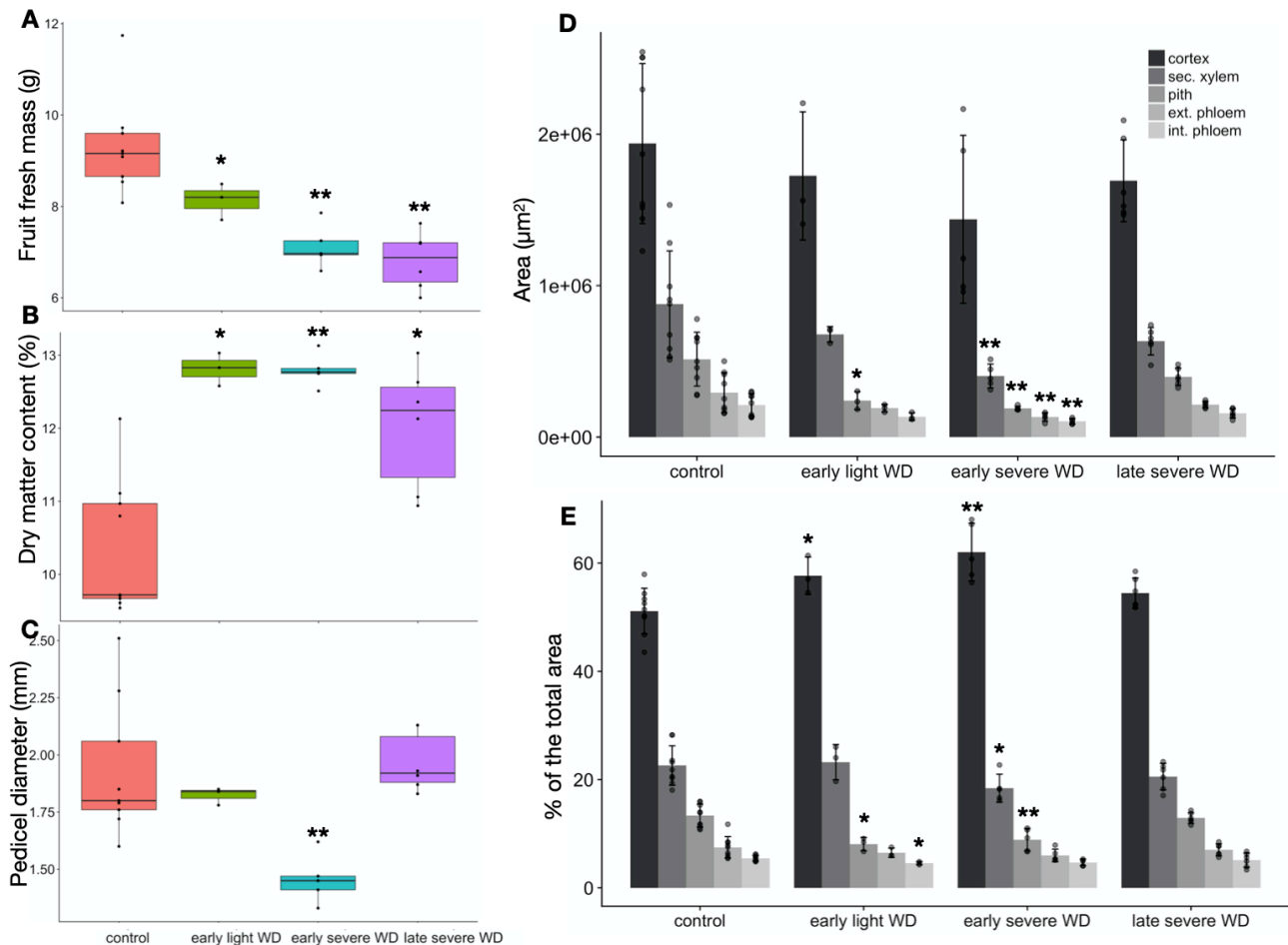


Figure 2.6 : Influence of water deficit (WD) treatments on fruit and pedicel traits: (A) Final fruit fresh mass in g. (B) Final dry matter content in the fruit in g 100 g⁻¹. (C) Final pedicel diameter in mm. (D) Area of tissues in the pedicel section in µm². (E) Mean area proportions of tissues in the pedicel section. The different shades represent the different tissues (see legend). Early WD occurred 15 days before truss anthesis, and late WD occurred 4 days after the truss anthesis. Light WD means a reduction of 50% of the well-watered control and severe WD means a reduction of 65% of the control. Each point (in transparency) represents a fruit. Stars indicate significance differences between the proportion of the tissue in the corresponding treatment and the control treatment: **p*<0.05, ***p*<0.01. Measurements were carried out on reproductive plants bearing 7 to 10 fruiting trusses.

phloem and xylem conductances in the pedicel (Lp1 and Lx1) were assumed to be proportional to the xylem and phloem areas measured in this study (Figure 2.4D and 2.6D). Since the model does not distinguish the internal and external phloem, the two measured areas were added.

Therefore, for the early light WD, Lx1 and Lp1 were reduced by 23% and 36%, respectively according to the reduction of xylem and phloem areas (Figure 6D). For the early severe WD, both Lx1 and Lp1 were decreased by 54%. For the late severe WD, Lx1 and Lp1 were respectively decreased by 28% and 27%. The simulated FM at maturity was 8.8g in the early light WD scenario (experimental data: 8.1 +/- 0.4g), 7.7 g in the early severe WD scenario (experimental data: 7.2 +/- 0.5g) and 8.9g in the late severe WD scenario (experimental data: 6.8 +/- 0.6g). Thus, in the early light and early severe WD, changes in Lx1 and Lp1 led to a 10% and 23% reduction of the simulated fruit FM, respectively, which was similar to the observed reduction (-13% and -23% respectively). On the opposite, under late severe WD, the reduction of the simulated FM (-9.6%) was about three times lower than that measured (-26.8%). The simulated final DMC was 8.3% in the control, 8.4% in the early light WD scenario, 8.9% in the early severe WD scenario and 8.6% in the late severe WD scenario. According to the Virtual Fruit model, the reduction of the xylem and

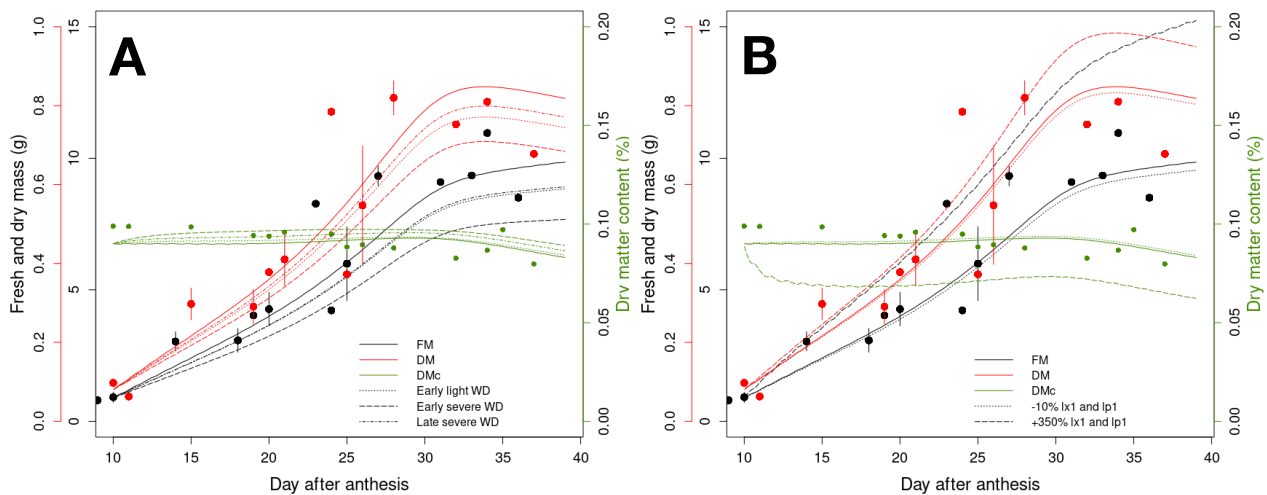


Figure 2.7: Measured and simulated evolution of fruit dry mass (red), fresh mass (black) and dry matter content (green) of WVA106. Points are experimental measurements and solid lines represent the simulations under control condition. (B) Simulation of three water deficit scenarios with the Virtual fruit model. The dotted lines represent the simulations for the early light WD, with a 23% decrease of Lx1 and a 36 % decrease of Lp1. The dashed lines represent the simulations for the early severe WD, with a 54% decrease of Lx1 and Lp1. The dashed and dotted lines represent the simulations for the late severe WD, with a 28% decrease of Lx1 and a 27 % decrease of Lp1. (A) Simulation of the genotypic variability. The dotted lines represent the simulations with a 10% reduction of Lx1 and Lp1, two model parameters that represent respectively the xylem and phloem conductance in the pedicel. The dashed lines represent the simulations with a 350% increase of Lx1 and Lp1. For (A) and (B), all the other parameters remain unchanged. The pedicel boundary conditions in the model, i.e. the stem water potential and the sugar concentration in the phloem, varied respectively, from -2 bar at night to -4.6 bar at midday and 0.5 moles of sugar dm^{-3} sap.

phloem conductance at the pedicel level hardly impacted the simulated DMC for the three scenarios whereas an increase of 24% (early light WD), 23% (early severe WD) and 16% (late severe WD) was experimentally measured.

To account for the genotypic variability, we reported on Lx1 and Lp1 the maximum variations of xylem and phloem areas observed between WVA106 and each of the 11 genotypes (Figure 2.4D): variations in xylem and phloem areas ranged from 0 to +332% and from -6% to +347 %, respectively. Therefore, a 10% decrease and a 350% increase of Lx1 and Lp1 were applied in the model. The 10% reduction did not strongly affect the FM and DMC at maturity (9.54 g and 8.4%, respectively). On the contrary, the 350% increase of Lx1 and Lp1 increased the simulated FM by 54% (15.24g compared to 9.86g) and decreased the DMC by 25% (6.2% compared to 8.3%). Thus, according to the Virtual Fruit model, the genotypic variability in Lx1 and Lp1 deduced from the observed variability in vascular tissue areas, contributed very modestly to the actual genotypic variations in fruit FM and DM (Figure 2.4D).

4. DISCUSSION

Xylem and phloem flows are regulated by pressure gradients in the whole plant system and depend on the anatomical and hydraulic properties of the conducts (Johnson et al., 1992). Although the vasculature area is not considered as the driver of sink growth, it has been shown to have both deterministic and plastic properties and it could be a primary driving force for plant diversification and adaptation to particular growth conditions (Lucas et al., 2013). The genetic and environmental variabilities in vasculature have been rarely described in tomato and more generally in herbaceous plants. In the present study, the objective was to focus on the genetic and WD-induced variability of

fruit pedicel anatomy and assess its contribution to fruit mass variability by coupling histological and modeling approaches.

a. The decrease in vascular tissue areas along the pedicel is independent of the presence of an abscission zone

Many studies focused on the hydraulic resistance of the tomato pedicel and its impact on the supply of water and minerals, calcium in particular, to the fruit (Belda and Ho, 1993; Malone and Andrews, 2001; van Ieperen et al., 2003; Rancic et al., 2010). In the present study, a clear discontinuity of the xylem lignification was observed at the abscission point, in agreement with a previous study on this genotype (Szymkowiak and Irish, 1999), together with a decrease of the xylem proportion along the pedicel which was independent of the presence or absence of AZ. Despite the absence of AZ, the Jointless mutant had smaller fruit FM and a higher DMC, which is counter-intuitive since the hydraulic resistance along the pedicel should be lower for the mutant than for the wild-type (van Ieperen et al., 2003). However, the mutant had a smaller pedicel diameter compared to the wild-type with similar proportion of tissues. So the lower areas of xylem and phloem tissues may contribute to the lower fruit FM of the mutant, although other factors may be involved as well. Altogether, these results support the hypothesis that the non-lignification of tissues in the AZ does not necessarily reduce the hydraulic conductivity and that only the mechanical components of the xylem (fibres and xylem parenchyma) may be interrupted (Malone and Andrews, 2001). They also suggest that the increasing hydraulic resistance along the pedicel mainly results from the decreasing area of conductive tissues in agreement with previous studies (Lee, 1989; André et al., 1999; Rancic et al., 2010).

b. Pedicel anatomical traits are worth being phenotyped for screening genetic resources

Constantinescu et al. (2016) suggested that pedicel conductivity and active sugar uptake could be interesting traits to maintain FM of large-fruit genotypes under WD and increase their DMC under well-irrigated conditions. In the present study, a large genetic variability in the absolute surface of xylem and phloem was observed, which has been rarely reported before. Apart from Heinz genotypes, the larger the pedicel diameter and tissue areas, the larger the fruit mass. According to the Virtual Fruit Model, the variations in xylem and phloem areas alone could not account for the 100-fold difference in FM between cherry tomatoes and large fruits, but it could partly contribute. In proportion, the relative areas of tissues varied by a factor 2 to 3 among genotypes, the internal phloem being the most variable tissue. In tomato, fruit trusses are mainly supplied by the two leaves below the truss through upward movement of assimilates in the internal phloem (Bonnemain, 1968), which is in line with the positive correlation observed between internal phloem proportion and FM (Figure 2.5). They are also consistent with the assumption that most water enters the fruit through the phloem tissues (Ho et al., 1987; Guichard et al., 2005). On the contrary no clear relation was observed between the proportion of secondary xylem and the fruit FM or DMC. This seems to be in contradiction with the reduction of xylem production and lignification reported in the AZs of pedicels from mature cherry like tomatoes compared to large-fruit cultivars (André et al., 1999).

c. The effect of water deficit on the pedicel anatomy and areas of vascular tissues partially explains its effects on fruit mass and dry matter content

Although many factors, such as stem water potential, sap sugar concentration and viscosity, osmoticum accumulation, etc., are involved in fruit water balance under WD (Ho et al., 1987; Bussi eres, 2002 ; Ripoll et al., 2014; 2016), the present study was designed to assess the contribution of the pedicel anatomy. The early WD treatments affected the whole period of fruit development including cell division, while the late WD treatment impacted mostly the cell

expansion period. Indeed in WVA106, cell division ends about 10 daa, which corresponds to the first third of the development period (Renaudin et al., 2017). Assuming that the increase in pedicel diameter reflects the production of new vessels during secondary growth (van Ieperen et al., 2003), then according to Figure 3, the number of vessels was fixed before fruit cell division ceased, and much before the maximum fruit growth rate. This is confirmed by the reduction of both pedicel diameter and vascular tissues areas under the early severe WD, but not under the late severe WD. So under early severe WD, the reduction in xylem and phloem areas would have contribute significantly to the decrease in fruit FM, which was related to the intensity of stress rather than to the period of application. The model-based analysis confirmed that the observed reduction in xylem and phloem areas alone could account for most of the reduction of fruit FM observed under early WD. On the contrary, the increase in DMC was more sensitive to the period of WD and could result from changes in tissue proportions rather than in absolute areas. Indeed in case of early WD the proportions of tissues were affected at both intensities with more cortex and less pith, but also less internal phloem and secondary xylem for the light and severe water deficits, respectively. So the model should also take into account the effect of WD on the proportions of xylem and phloem. In agreement, Hanssens et al. (2015) showed that the relative xylem contribution to tomato fruit growth is strongly affected by environmental conditions. Moreover the xylem conductance depends on the diameter of individual vessels rather than on the whole surface of xylem tissue as assumed in the modeling approach. Several studies showed that WD decreased the diameter of xylem vessels, in tomato pedicel (Rancic et al., 2008), in grape (Lovisolo and Schubert, 1998) and in maize (Abdel-Rahim et al., 1998; Liu et al., 2019) or in poplar tree (Arend and Fromm, 2007). In tomato plants grown under WD, the conductance decreases in the pedicel AZ, but is increased on both sides due to new vessel formation (van Ieperen et al., 2003). Such variations may greatly affect the tissue conductance, and outlined the need to investigate and model the number of conducting elements and their diameter distribution, rather than the total conductive area.

d. Concluding remarks and perspectives

The present study highlights a high genotypic and water deficit induced variability of the areas of conductive tissues partially explaining the fruit mass variability. It appears necessary to better understand the functional part of these tissues such as the proportion of active vessels to improve the predictive capacity of plant models.

CHAPITRE III : CARACTÉRISATION PAR IRM DES FLUX XYLÉMIENS DANS L'ARCHITECTURE DE LA PLANTE ET MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA RÉPONSE AU DÉFICIT HYDRIQUE

1. INTRODUCTION

Au niveau de la tige principale, le xylème fournit un support mécanique à la plante et transporte la sève brute des racines vers les organes aériens. Le flux d'eau de long de l'axe vertical est déterminé par la conductance hydraulique dans les tissus conducteurs et par la chute de potentiel hydrique le long de l'axe (Fiscus, 1975). Les propriétés anatomiques et hydrauliques sont généralement considérées comme homogènes dans l'architecture de la plante ou sont modélisées de manière empirique dans les modèles qui prédisent les flux d'eau à travers le continuum sol-plante-atmosphère. Par exemple, il est supposé que la conductance hydraulique varie en fonction du diamètre de la tige (Tyree, 1988 ; Baldazzi et al., 2013). Cependant, le nombre et la taille des vaisseaux du xylème varient en fonction de la hauteur et de la position dans la plante et ces variations impliquent des modifications de la résistance spécifique des segments dans l'architecture des arbres (Soriano et al., 2020). Sur des jeunes tomates âgées de 6 semaines, Qi et al. (2020) ont observé une décroissance de la proportion de xylème du bas vers le haut de la plante, qui pourrait également impacter les flux xylémiens. A notre connaissance, les variations de surface de conductance et des propriétés anatomiques des tissus conducteurs n'ont pas été caractérisées chez la tomate en phase reproductive.

La relation utilisée pour calculer la conductivité hydraulique à partir du diamètre de l'axe dans le modèle présenté par Baldazzi et al. (2013) est celle issue de Vercambre et al. (2002), établie sur le pêcher à partir de mesures obtenues par la méthode de tension induite sur des segments de racines et de tige de 20 à 30 cm de long (Huang et Nobel 1994). Il n'existe pour le moment aucune donnée pour valider cette relation chez la tomate. La relation entre conductivité hydraulique et diamètre de tige sera plus amplement explorée dans le chapitre IV, mais cela illustre le besoin de quantifier la conductivité théorique à différents niveaux dans la tige de la tomate en phase reproductive. L'objectif de ce chapitre est d'explorer et de développer les techniques IRM pour mesurer les flux d'eau dans l'architecture de la plante de tomate et de coupler l'IRM à des approches histologiques pour évaluer les liens structure-fonction des tissus conducteurs et estimer des conductivités théoriques. Nous avons dans un premier temps cherché à comprendre comment et dans quelles gammes varient les flux xylémiens dans l'architecture de la plante et quels sont les déterminants de ces variations. Dans un second temps, nous avons étudié l'impact du déficit hydrique sur ces déterminants et sur les flux dans l'architecture de la plante.

2. MATERIEL ET METHODES

a. Matériel végétal et conditions expérimentales

Les caractéristiques architecturales des différentes plantes (géotype WVA106) utilisées dans ce chapitre ainsi que les zones où les mesures ont été réalisées sont indiquées dans le Tableau 3.1.

Deux traitements différents ont été exploités au cours de ce travail de thèse. Le traitement témoin, qu'on appellera « C » pour *control* et le traitement déficit hydrique qu'on appellera « WD » pour *water deficit*. La date de chaque expérimentation est précisée. Les plantes ayant le même numéro pour les deux traitements ont la même date de semis et ont été élevées dans les mêmes conditions, excepté pour l'irrigation, le déficit hydrique ayant été appliqué sur les plantes WD, en réduisant de 50% leur apport en eau comparé aux plantes C. La hauteur des plantes ainsi que le nombre total de feuilles et de bouquets au moment de la mesure IRM sont précisés, la première feuille et le premier bouquet étant les plus âgés en bas de la tige. Selon les expérimentations, les mesures IRM et histologiques ont été réalisées à différents niveaux dans l'architecture de la plante. Le numéro de l'entre-noeud (EN) où la mesure a été réalisée est indiqué dans la colonne « Zone de mesure » avec une précision sur le numéro des feuilles (F) ou des bouquets (B) entre lesquels l'EN se situe. Afin de simplifier la nomenclature des zones de mesure, un code pour la position est proposé dans la colonne « Code position ». Par exemple, le code « B0 » correspond aux mesures réalisées en bas de la plante, le plus proche possible du collet. Le code « B3 » correspond aux mesures réalisées sous le bouquet numéro 3 (en début de maturation), dans la partie milieu-bas de la plante. Le code « B5 » correspond aux mesures réalisées sous le bouquet 5 (en croissance), dans la partie milieu-haut de la plante. Enfin, le code « B9 » correspond aux mesures réalisées sous le bouquet 9 (stade boutons floraux), dans la partie haute de la plante, où la tige est très fine. Ainsi, avec le traitement, le numéro de la plante et la position à laquelle la mesure est réalisée nous obtenons un code unique par expérimentation indiqué dans la colonne « code manip ».

La surface totale de la section de tige (mesurée sur les images IRM) est également précisée. En fonction de la zone de mesure, la plante n'est pas placée de la même façon dans l'IRM. Ainsi le nombre de feuilles qui dépassent de l'aimant et qui sont donc éclairées varie en fonction de la zone mesurée. C'est pourquoi nous avons précisé le nombre de feuilles éclairées ainsi que leur rang sur la tige.

b. Mesures histologiques et estimation des conductivités théoriques du xylème

Après chaque expérimentation IRM, un prélèvement de la zone imagée est réalisé puis la séquence d'analyse présentée dans le chapitre 1 est appliquée à ces échantillons. Pour chaque répétition biologique, 3 coupes de 80 à 100 μm d'épaisseur sont analysées afin d'avoir 3 répétitions techniques. La figure 3.1 représente une planche de coupes histologiques colorées et scannées avec un exemple d'une répétition technique par plante pour une position donnée. Les différentes plantes ne sont pas de vraies répétitions biologiques car elles ne sont pas toutes au même stade et les mesures n'ont pas été faites à la même saison (Tableau 3.1), hormis les couples C-1/C-2 et WD-1/WD-2 qui sont bien des répétitions biologiques. Les surfaces des différents tissus ont ensuite été mesurées avec Image J.

Un comptage du nombre de vaisseaux xylémiens a également été réalisé sur l'une des 3 coupes histologiques. Pour ce faire nous avons tout d'abord sélectionné la zone de xylème secondaire et transformé l'image en 8-bits, puis à l'aide de la fonction « Analyze particles » de Image J, nous avons pu compter le nombre et mesurer la surface de chaque vaisseau et ainsi estimer leur diamètre en supposant une forme sphérique. Pour ne pas surestimer le nombre de vaisseaux susceptibles de participer au transport de sève, nous n'avons pas compté les particules ayant une surface inférieure à 300 μm^2 (donc un diamètre supérieur à 19,5 μm , seuil choisi de manière arbitraire selon

| Traite- ment | Date | Plante | Hauteur plante (cm) | Nombre feuilles | Nombre bouquets | Code position | Code manip | Zone de mesure | Hauteur de la zone de mesure (cm) | Surface de tige (mm ²) | Nombre feuilles éclairées | Rangs feuilles éclairées |
|-----------------|----------------|--------|---------------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------------|-------------------------|---|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| C | 17/02/ 2020 | 1 | 252 | 40 | 10 | B5 | C-1-B5 | EN 26, entre F21 et F22 | 128 | 34.1 | 13 | F1-F13 |
| | | | | | | B3 | C-1-B3 | EN 19, entre F16 et B3 | 90 | 36.2 | 12 | F29-F40 |
| | | | | | | B0 | C-1-B0 | EN 3, entre F2 et F3 | 5 | 46.0 | 25 | F16-F40 |
| | 16/06/ 2020 | 2 | 256,5 | 40 | 10 | B5 | C-2-B5 | EN 27, entre F22 et B5 | 130 | 29.3 | 12 | F1-F12 |
| | | | | | | B3 | C-2-B3 | EN 19, entre F16 et B3 | 91 | 39.2 | 14 | F27-F40 |
| | | | | | | B0 | C-2-B0 | EN 3, entre F2 et F3 | 8 | 59.4 | 24 | F17-F40 |
| | 27/07/ 2020 | 3 | 175 | 32 | 7 | B5 | C-3-B5 | EN 28, entre F23 et B5 | 132 | 42.0 | 14 | F1-F14 |
| | | | | | | B3 | C-3-B3 | EN 20, entre F17 et B3 | 88 | 52.9 | 7 | F1-F7 |
| | | | | | | B0 | C-3-B0 | EN 5, entre F4 et F5 | 12 | 82.9 | 15 | F18-F32 |
| | 09/09/ 2019 | 4 | 200 | 36 | 9 | B9 | C-4-B9 | EN 40, entre F31 et F32 | 170 | 24.0 | 0 | NA |
| | | | | | | B5 | C-4-B5 | EN 26, entre F21 et B5 | 105 | 45.5 | 5 | F32-F36 |
| | | | | | | B0 | C-4-B0 | EN 11, entre F10 et F11 | 32 | 100.2 | 15 | F22-F36 |
| | 10/09/ 2019 | 5 | 210 | 40 | 9 | B9 | C-5-B9 | EN 44, entre F35 et F36 | 178 | 19.2 | 0 | NA |
| | | | | | | B5 | C-5-B5 | EN 27, entre F22 et B5 | 110 | 24.2 | 9 | F32-F40 |
| B0 | | | | | | C-5-B0 | EN 4, entre F3 et F4 | 7 | 42.7 | 19 | F22-F40 | |
| 16/11/ 2018 | 6 | 210 | 37 | 9 | B0 | C-6-B0 | EN 1, sous F1 | 3 | 52.8 | 20 | F15-F34 | |
| 18/01/ 2019 | 7 | 215 | 34 | 8 | B0 | C-7-B0 | EN 5, entre F4 et F5 | 12 | 67.7 | 20 | F15-F34 | |
| WD | 18/02/ 2020 | 1 | 158 | 32 | 8 | B5 | WD-1-B5 | EN 26, entre F21 et F22 | 120 | 16.5 | 13 | F1-F13 |
| | | | | | | B3 | WD-1-B3 | EN 19, entre F16 et B3 | 86 | 22.8 | 0 | NA |
| | | | | | | B0 | WD-1-B0 | EN 8, entre F7 et F8 | 22 | 44.4 | 14 | F19-F32 |
| | 17/03/ 2020 | 2 | 158 | 33 | 8 | B5 | WD-2-B5 | EN 28, entre F23 et B5 | 113 | 8.0 | 11 | F1-F11 |
| | | | | | | B3 | WD-2-B3 | EN 20, entre F17 et B3 | 84 | 17.1 | 7 | F1-F7 |
| | | | | | | B0 | WD-2-B0 | EN 2, entre F1 et F2 | 5 | 35.7 | 17 | F17-F33 |
| | 28/07/ 2020 | 3 | 150 | 29 | 7 | B5 | WD-3-B5 | EN 28, entre F23 et B5 | 136 | 28.9 | 14 | F1-F14 |
| | | | | | | B3 | WD-3-B3 | EN 20, entre F17 et B3 | 91 | 32.5 | 7 | F1-F7 |
| | | | | | | B0 | WD-3-B0 | EN 1, sous F1 | 3 | 88.0 | 13 | F17-F29 |

Tableau 3.1 : Détails sur l'architecture aérienne des différentes plantes étudiées dans ce chapitre et sur les zones où sont réalisées les mesures IRM et histologiques. F : feuille, EN : entre-noeuds, B : bouquet, C : plantes témoins, WD : plantes ayant subi un déficit hydrique. Les plantes ayant le même numéro pour les deux traitements C et WD ont la même date de semis.

l'hypothèse que les très petits vaisseaux contribuent peu à la conductance). A partir de la distribution des diamètres des vaisseaux, nous avons pu estimer une « conductivité théorique totale » (m⁴.s⁻¹.MPa⁻¹) des vaisseaux xylémiens selon la relation de Hagen-Poiseuille (Calkin et al., 1985) :

$$k_h = \left(\frac{\pi}{128\eta} \right) \sum_{i=1}^n (d_i^4) \quad (1)$$

avec η la viscosité du fluide (MPa s), d_i le diamètre (m) du ième vaisseaux et n le nombre de vaisseaux. Nous considérons ici que la viscosité de la sève xylémienne est égale à celle de l'eau ($\eta = 1 \cdot 10^{-9}$ MPa s à 20°C).

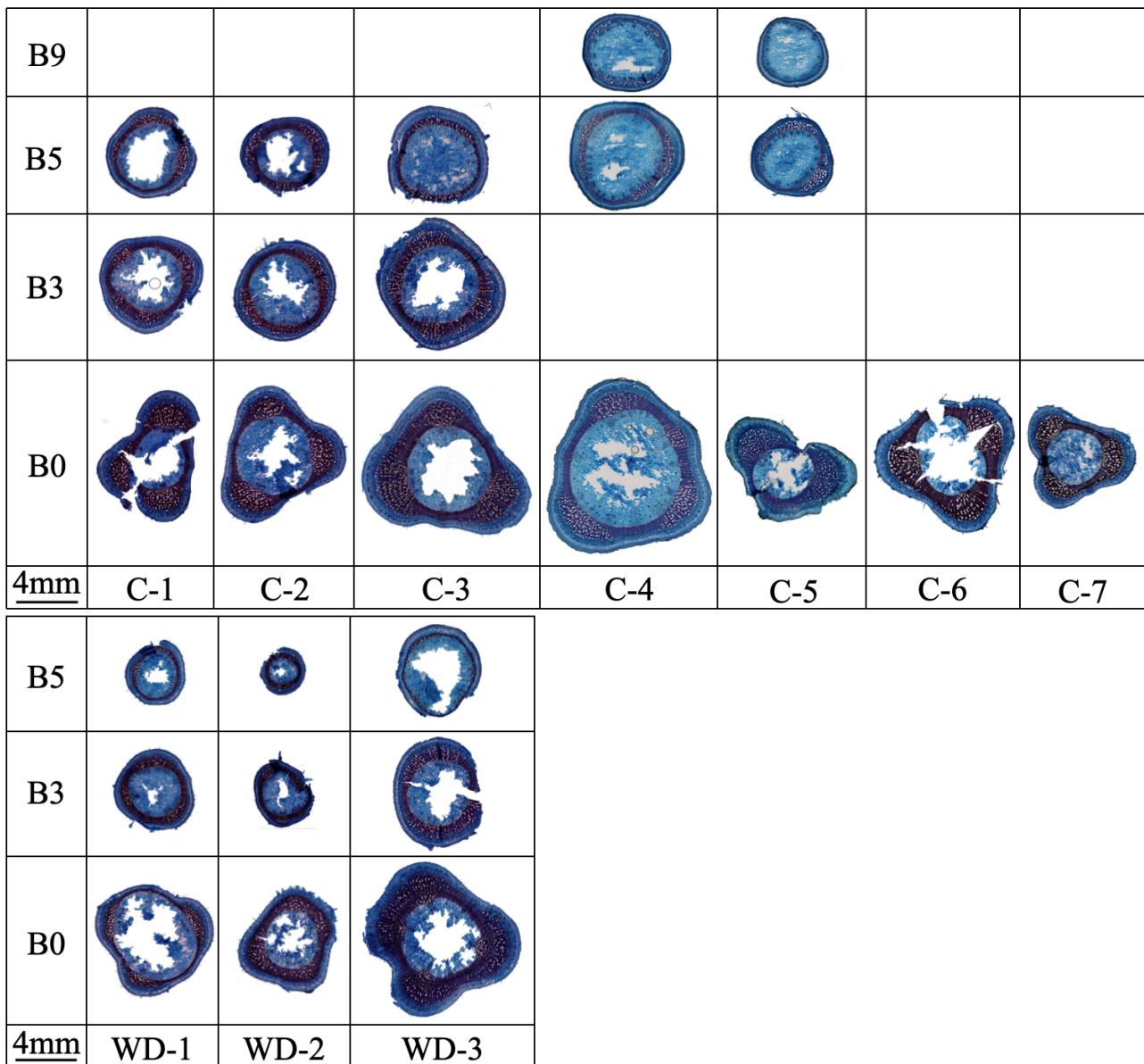


Figure 3.1 : Planche des coupes histologiques des différentes zones imagées, colorées au FASGA. Les positions (cf Tableau 3.1) sont représentées en lignes et les plantes en colonnes. Les 7 plantes du traitement C (C-1 à C-7) sont représentées sur la planche du haut tandis que les 3 plantes du traitement WD (WD-1 à WD-3) sont représentées sur la planche du bas. Les différentes coupes sont toutes à la même échelle, représentée en bas à gauche des 2 planches. Les épaisseurs de coupes varient de 80 à 100 μ m. Chaque coupe représente une répétition techniques parmi les trois qui ont été réalisées.

c. Acquisitions IRM

Le même protocole de mesures IRM a été appliqué sur les différentes plantes : nous avons réalisé des mesures d'entrée de coupes (FF) et des mesures de diffusion (cf. Chapitre I). Pour les plantes sur lesquelles nous avons réalisé des mesures à différentes hauteurs (cartographie des flux), nous avons retiré la plante de l'IRM entre les différentes mesures puis replacé l'antenne sur la zone souhaitée, en repérant cette zone pour pouvoir ensuite la prélever pour les mesures histologiques. Les LED sont restées allumées pour toutes les expérimentations, mais le nombre de feuilles éclairées était modifié en fonction des plantes et de la zone imagée (Tableau 3.1).

La figure 3.2 représente une planche d'images IRM avec en jaune la mise en évidence des zones actives, c'est à dire dans lesquelles un flux est mesuré grâce à la méthode flip-flop. Nous avons superposé les différents masques des zones actives sur les images anatomiques correspondantes,

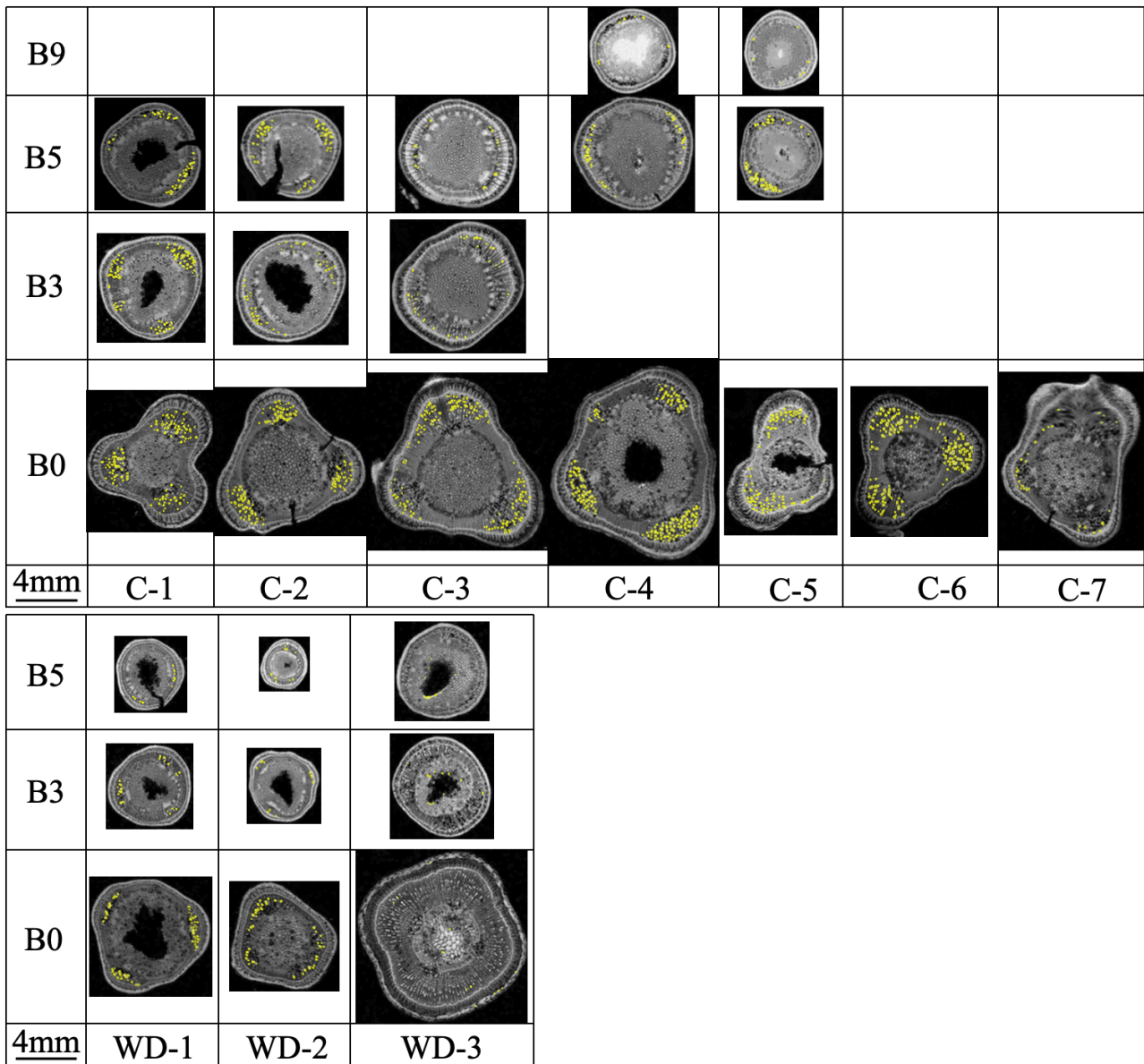


Figure 3.2 : Planche d'images IRM : superposition du résultat de la FF (zones de flux en jaune) sur une image anatomique obtenue par un contraste T1. Chaque voxel a pour dimensions $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ et $500 \mu\text{m}$ de hauteur (épaisseur de coupe). Les 7 plantes du traitement C (C1 à C7) sont représentées sur la planche du haut tandis que les 3 plantes du traitement WD (WD1 à WD3) sont représentées sur la planche du bas. Les lignes correspondent à différentes positions le long de la tige (Tableau 3.1). Les différentes coupes sont toutes à la même échelle, représentée en bas à gauche des 2 planches.

obtenues avec un contraste T1. Cette superposition permet de mettre en évidence que ces zones actives correspondent bien à des vaisseaux du xylème secondaire. Les voxels ont pour dimensions $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ sur une épaisseur de coupe de $500 \mu\text{m}$. La même échelle que la figure 3.1 a été utilisée.

De la même façon que pour les coupes histologiques, nous avons compté le nombre de vaisseaux actifs et mesuré leur diamètre. Ces informations ont permis de calculer la « conductivité théorique active » en ne considérant que les vaisseaux dans lesquels un flux est observé. La résolution spatiale en IRM étant limitée approximativement à $20 \mu\text{m}$ à cause du mouvement Brownien, il est plus difficile de distinguer les vaisseaux individuels qu'en histologie et parfois un amas de vaisseaux apparaît comme un seul gros vaisseau en traitement et visualisation d'image (Image J). Le nombre total de vaisseaux est alors sous estimé, mais surtout, les diamètres sont surestimés. Or le calcul de

la conductivité qui dépend du diamètre à la puissance 4, risque alors d'être aussi surestimé même si nous comptons moins de vaisseaux. Nous avons donc mis en place une étape de correction post-traitement : sachant qu'un vaisseau ne peut pas avoir un diamètre supérieur aux diamètres des plus gros vaisseaux mesurés en histologie, nous avons divisé ces amas de vaisseaux en 2, 3 ou 4 vaisseaux selon leur diamètre. Des vérifications post traitement sur la coupe histologique ont pu être faites sur quelques cas typiques permettant ainsi de valider les distributions.

La représentation graphique de la distribution des diamètres des vaisseaux actifs du xylème superposée à celle des diamètres de tous les vaisseaux du xylème (Figure 3.3, exemple pour la plante C-1, pour les autres plantes, voir en annexe 1) met en évidence que les vaisseaux mesurés en IRM font partie des plus gros vaisseaux du xylème quelle que soit la position le long de la tige.

d. Analyse des données

Des tests non paramétriques ont été utilisés vu le faible nombre de répétitions pour comparer les effets du traitement à chaque position dans la plante (test de Kruskal-Wallis) et les effets de la position pour chaque traitement (test de Dunnett). Ces tests ont été réalisés avec le logiciel R studio.

3. RESULTATS

a. Caractérisation anatomique de la tige

Afin de quantifier la surface et les proportions des différents tissus dans les coupes de tiges, à différents niveaux dans la plante et en réponse au déficit hydrique, les différentes coupes ont été traitées sous Image J en suivant la séquence d'analyse histologique présentée dans le chapitre I. La figure 3.4 représente la surface en μm^2 et la proportion des différents tissus dans la section de tige en fonction du traitement et de la position, donc de l'âge des tissus, les tissus à B0 étant les plus vieux et les tissus à B9 les plus jeunes.

Globalement, les variations de surfaces absolues et relatives de tissus entre les positions sont plus importantes chez les plantes C que chez les plantes WD. Pour les tissus affectés (tous sauf la moelle), on observe une diminution des surfaces du bas vers le haut de la plante.

Pour le traitement témoin (C), on observe une diminution significative ($p\text{-value} < 0.05$) de la surface absolue de xylème secondaire, de phloème externe et de phloème interne entre les positions B0 et B5, ainsi qu'une diminution significative de la surface absolue de cortex, de xylème secondaire et de phloème externe entre les positions B0 et B9. En termes de pourcentages de la surface totale de tige, on observe une diminution significative de la proportion de xylème secondaire, de phloème externe et de phloème interne aux positions B5 et B9 et une augmentation de la proportion de moelle à la position B9 comparé à la position B0. Les surfaces absolues et relatives de tissus à la position B3 sont intermédiaires et elles ne sont pas significativement différentes de celles observées aux autres positions (bas ou haut).

Pour le traitement WD, on observe une diminution significative ($p\text{-value} < 0.05$) de la surface absolue de xylème secondaire et de phloème externe entre les positions B0 et B5. De même la surface relative de cortex diminue significativement entre B0 et B5.

Concernant l'effet du déficit hydrique, les surfaces absolues de xylème secondaire et de phloème interne ainsi que la proportion de cortex sont significativement ($p\text{-value} < 0.05$) plus faibles chez les plantes WD que chez les plantes C pour la position B5. Aux autres niveaux, nous n'observons pas de différence significative entre les traitements.

Une analyse plus précise a été réalisée sur les vaisseaux du xylème secondaire. Comme expliqué dans le matériel et méthode, nous avons pu quantifier le nombre de vaisseaux ainsi que leur diamètre, la surface totale de vaisseaux ainsi que la conductivité théorique totale (Figure 3.5, données reportées dans le tableau 3.2).

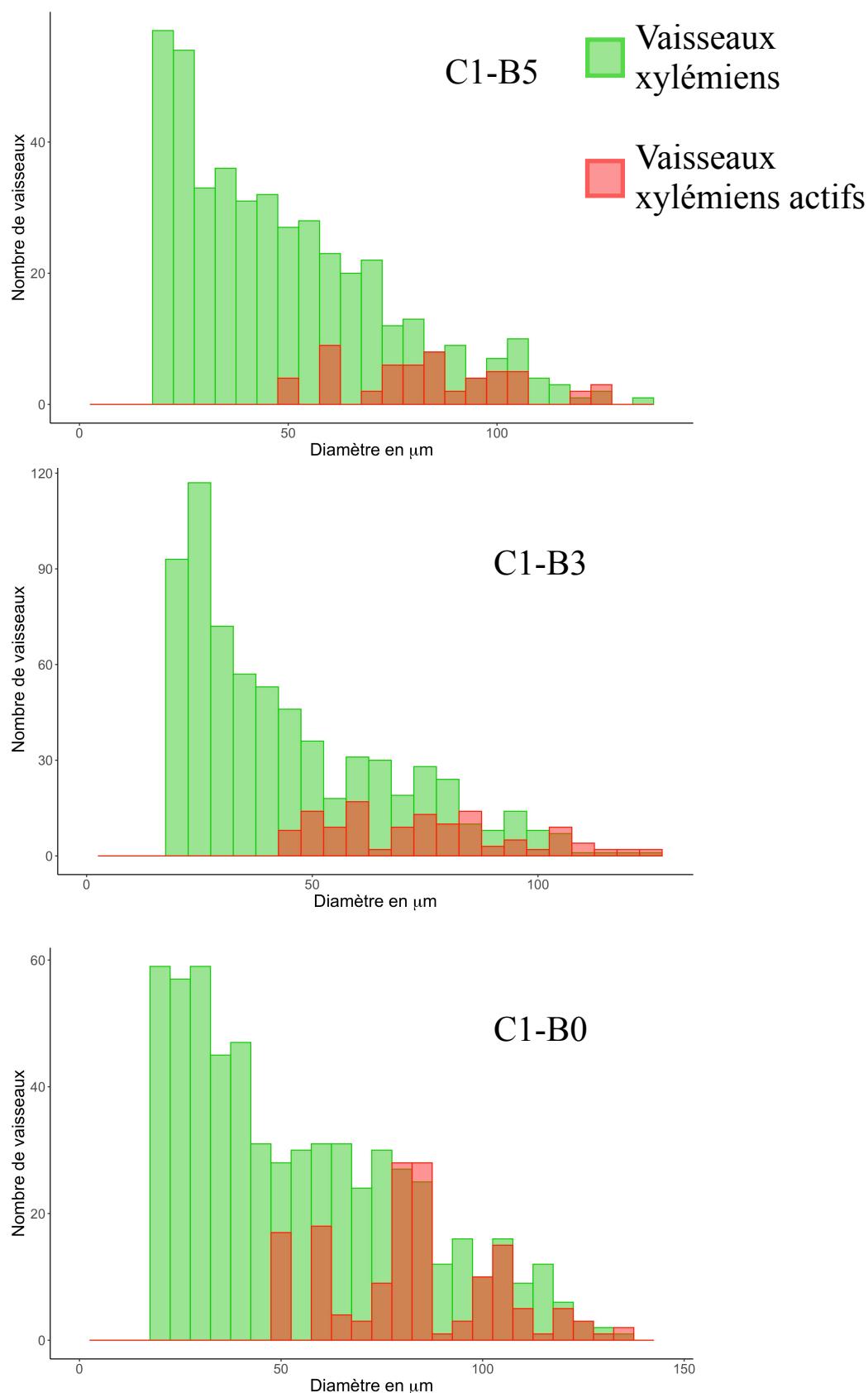


Figure 3.3 : Distribution des diamètres de vaisseaux du xylème en µm aux trois positions (B0, B3 et B5) de la plante C-1. Les distributions pour les autres plantes sont en annexe 1 de la thèse. Les vaisseaux actifs, mesurés sur les coupes IRM sont en rouge et les vaisseaux du xylème mesurés sur la coupe histologique (diamètre > 19,5 µm) sont en vert. La taille des vaisseaux xylémiens est probablement légèrement surestimée en IRM à cause de la plus faible résolution des images.

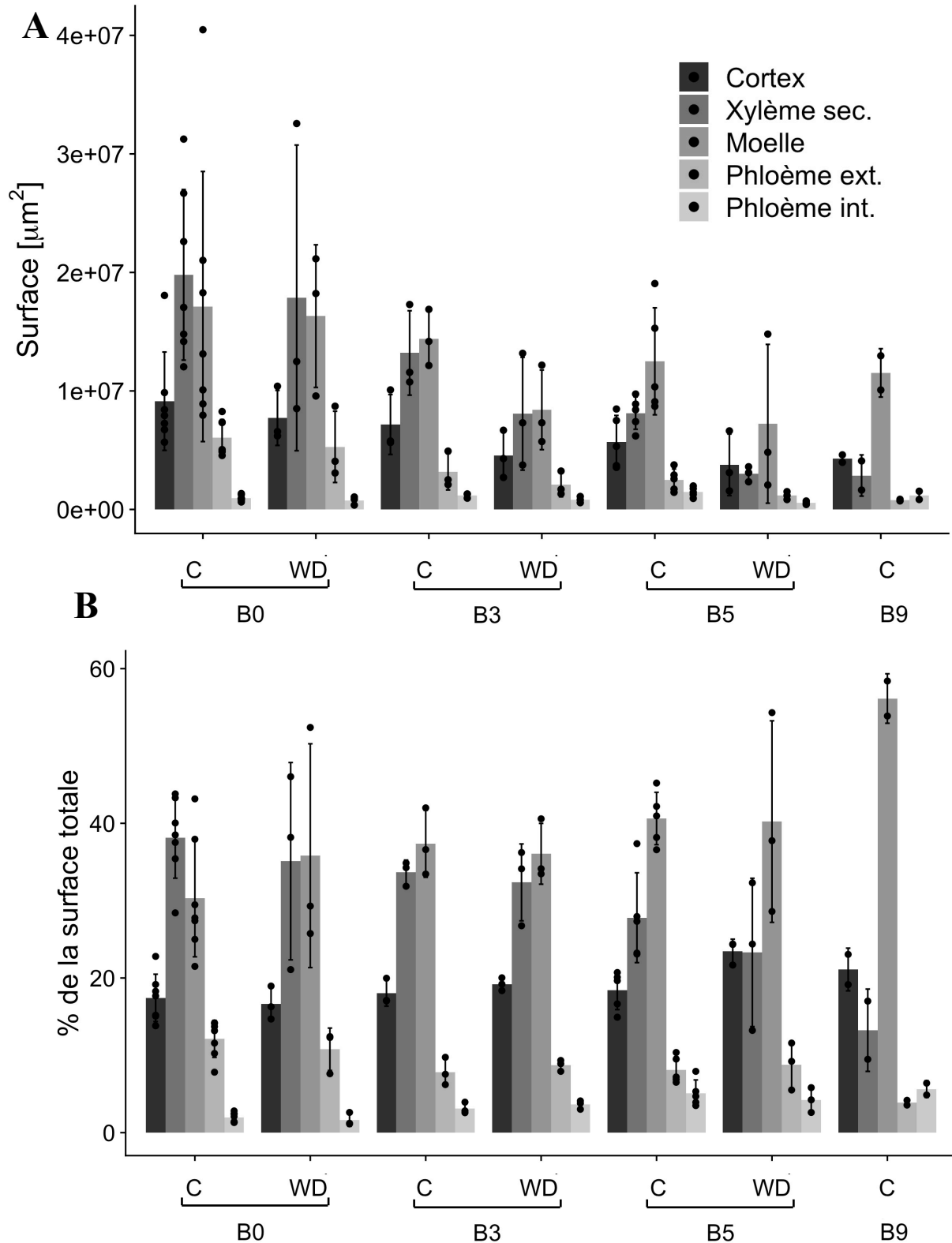


Figure 3.4 : Surface moyenne en μm^2 (A) et proportions moyennes des différents tissus dans les sections de tige (B) en fonction de la position le long de la tige (B0, B3, B5 et B9) et du traitement (C et WD). Les différentes nuances de gris représentent les différents tissus avec du plus foncé au plus clair : le cortex, le xylème secondaire, la moelle, le phloème externe et le phloème interne. Chaque point représente une répétition biologique et les colonnes représentent les moyennes des répétitions biologiques avec l'écart type indiqué par les barres d'erreurs. C-B0 : n = 7. C-B3, WD-B0, WD-B3 et WD-B5 : n = 3. C-B5 : n = 5. C-B9 : n = 2.

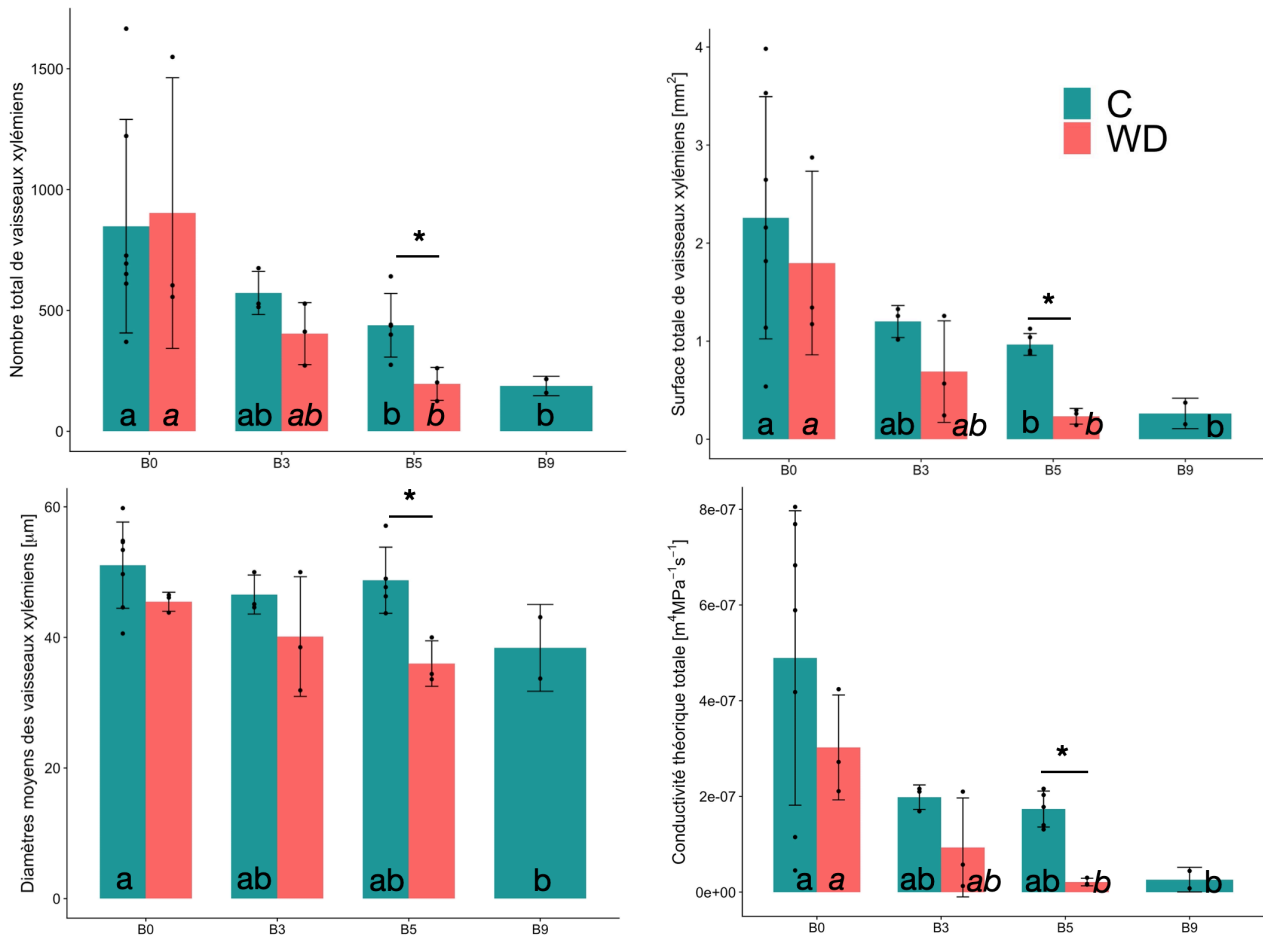


Figure 3.5 : Nombre total de vaisseaux xylémiens (A), surface totale de vaisseaux xylémiens (mm²) (B), diamètres moyens des vaisseaux xylémiens (μm) (C) et conductivité théorique totale (m⁴.s⁻¹.MPa⁻¹) (D) en fonction de la position le long de la tige (B0 à B9) et du traitement irrigation. Le traitement témoin (C) est représenté en bleu et le déficit hydrique (WD) en rouge. Chaque point représente une répétition biologique et les colonnes représentent la moyenne des répétitions biologiques avec l'écart type indiqué par les barres d'erreur. L'effet position est indiqué par les lettres : deux groupes ont des lettres différentes lorsqu'ils sont significativement différents au risque 5%. L'effet traitement hydrique testé pour chaque position est indiqué par les * (p-value < 5%) au-dessus des colonnes. C-B0 : n = 7. C-B3, WD-B0, WD-B3 et WD-B5 : n = 3. C-B5 : n = 5. C-B9 : n = 2.

Pour le traitement C, on observe une diminution significative (p-value < 0.05) du nombre total de vaisseaux xylémiens, de la surface totale de ces vaisseaux, ainsi que de la conductivité théorique totale entre la position B0 et les positions B5 et B9. Ce même phénomène est observé pour le diamètre moyen des vaisseaux xylémiens mais uniquement entre la position B0 et la position B9. Les valeurs observées en B3 sont intermédiaires.

Pour le traitement WD, on observe de manière similaire au traitement C, une diminution significative (p-value < 0.05) du nombre total de vaisseaux xylémiens, de la surface totale de vaisseaux xylémiens et de la conductivité théorique totale de ces vaisseaux, entre la position B0 et la position B5. Le diamètre moyen des vaisseaux n'est en revanche pas significativement variable en fonction de la position le long de la tige.

L'ensemble des variables tend à diminuer en condition WD comparé à la condition C, mais la différence n'est significative qu'en position B5 (p-value < 0.05).

| Code manip | # de vaisseaux | Diamètre moyen de tous les vaisseaux | Cond. théo. totale (m ⁴ .MPa ⁻¹ .s ⁻¹) | Surface (mm ²) | # de vaisseau x actifs | Diamètre moyen des vaisseaux actifs | Cond. théo. des vaisseaux actifs (m ⁴ .MPa ⁻¹ .s ⁻¹) | Surface active (mm ²) | Vitesse moyenne (mm.s ⁻¹) | Flux (mm ³ .s ⁻¹) | Flux (g h ⁻¹) | Module de la vitesse IRM de phase (mm.s ⁻¹) | Vitesse IRM Magnitude (mm.s ⁻¹) |
|------------|----------------|--------------------------------------|--|----------------------------|------------------------|-------------------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------|---|---|
| C-1-B5 | 437 | 49.0+/-25.1 | 2.03e-07 | 1.04 | 56 | 84.3+/-20.0 | 9.36e-08 | 0.346 | 0.289 | 0.1 | 0.36 | 0.21 | 0.24 |
| C-1-B3 | 675 | 44.6+/-22.8 | 2.16e-07 | 1.327 | 125 | 75.2+/-21.1 | 1.49e-07 | 0.650 | 0.52 | 0.338 | 1.217 | 0.42 | X |
| C-1-B0 | 611 | 54.8+/-28.1 | 4.18e-07 | 1.817 | 153 | 83.4+/-20.6 | 2.52e-07 | 0.874 | 0.443 | 0.387 | 1.393 | 0.44 | X |
| C-2-B5 | 400 | 47.7+/-24.6 | 1.78e-07 | 0.903 | 74 | 87.2+/-20.3 | 1.42e-07 | 0.47 | 0.203 | 0.095 | 0.342 | 0.23 | 0.29 |
| C-2-B3 | 514 | 45.1+/-21.9 | 1.69e-07 | 1.016 | 53 | 75.7+/-20.1 | 6.19e-08 | 0.246 | 0.437 | 0.107 | 0.385 | X | X |
| C-2-B0 | 694 | 54.6+/-31.3 | 5.89e-07 | 2.159 | 152 | 90.7+/-20.6 | 3.30e-07 | 1.12 | 0.739 | 0.827 | 2.977 | 0.72 | X |
| C-3-B5 | 441 | 46.3+/-20.8 | 1.31e-07 | 0.893 | 25 | 78.0+/-18.4 | 3.08e-08 | 0.114 | 0.237 | 0.027 | 0.097 | 0.14 | 0.16 |
| C-3-B3 | 528 | 50.0+/-23.1 | 2.10e-07 | 1.258 | 38 | 74.9+/-18.2 | 3.99e-08 | 0.172 | 0.152 | 0.026 | 0.094 | 0.19 | 0.22 |
| C-3-B0 | 1666 | 49.7+/-24.0 | 6.83e-07 | 3.982 | 217 | 79.9+/-17.7 | 2.82e-07 | 1.126 | 0.278 | 0.313 | 1.127 | 0.17 | 0.28 |
| C-4-B9 | 216 | 43.1+/-18.4 | 4.43e-08 | 0.373 | 12 | 77.3+/-13.9 | 1.23e-08 | 0.059 | 0.463 | 0.027 | 0.097 | 0.23 | 0.24 |
| C-4-B5 | 641 | 43.7+/-18.1 | 1.40e-07 | 1.127 | 55 | 86.3+/-19.0 | 9.5e-08 | 0.340 | 0.368 | 0.125 | 0.45 | 0.48 | 0.29 |
| C-4-B0 | 1222 | 53.4+/-28.7 | 8.05e-07 | 3.53 | 202 | 97.6+/-22.4 | 6.0e-07 | 1.588 | 0.259 | 0.411 | 1.48 | 0.17 | 0.31 |
| C-5-B9 | 159 | 33.7+/-9.6 | 7.84e-09 | 0.153 | 17 | 52.5+/-4.5 | 3.29e-09 | 0.037 | 0.290 | 0.011 | 0.04 | X | 0.19 |
| C-5-B5 | 275 | 57.1+/-28.0 | 2.16e-07 | 0.872 | 62 | 103.5+/-17.8 | 2.03e-07 | 0.547 | 0.409 | 0.223 | 0.803 | 0.41 | 0.30 |
| C-5-B0 | 651 | 44.6+/-15.4 | 1.15e-07 | 1.138 | 244 | 61.3+/-11.7 | 1.05e-07 | 0.744 | 0.390 | 0.290 | 1.044 | 0.29 | 0.25 |
| C-6-B0 | 727 | 59.8+/-32.5 | 7.69e-07 | 2.646 | 288 | 96.0+/-21.0 | 7.82e-07 | 2.194 | 0.138 | 0.304 | 1.094 | 0.23 | 0.24 |
| C-7-B0 | 370 | 40.6+/-14.2 | 4.54e-08 | 0.538 | 70 | 60.0+/-11.6 | 2.73e-08 | 0.2 | 0.139 | 0.028 | 0.101 | 0.35 | 0.25 |
| WD-1-B5 | 261 | 33.6+/-11.9 | 1.71e-08 | 0.261 | 22 | 58.2+/-12.1 | 7.93e-09 | 0.06 | 0.31 | 0.018 | 0.065 | 0.23 | 0.29 |
| WD-1-B3 | 412 | 38.5+/-16.6 | 5.74e-08 | 0.568 | 31 | 72.3+/-14.4 | 2.55e-08 | 0.128 | 0.467 | 0.06 | 0.216 | 0.64 | X |
| WD-1-B0 | 556 | 46.1+/-23.8 | 2.11e-07 | 1.174 | 87 | 80.8+/-18.3 | 1.20e-07 | 0.487 | 0.365 | 0.178 | 0.641 | 0.41 | X |
| WD-2-B5 | 125 | 34.4+/-16.9 | 1.56e-08 | 0.144 | 18 | 52.5+/-8.6 | 3.87e-09 | 0.038 | 0.577 | 0.022 | 0.079 | X | 0.24 |
| WD-2-B3 | 272 | 31.9+/-10.9 | 1.29e-08 | 0.243 | 26 | 57.5+/-11.3 | 8.68e-09 | 0.069 | 1.734 | 0.12 | 0.43 | 0.23 | 0.26 |
| WD-2-B0 | 604 | 46.5+/-25.8 | 2.72e-07 | 1.343 | 62 | 89.4+/-18.6 | 1.22e-07 | 0.401 | 0.156 | 0.063 | 0.227 | 0.24 | 0.24 |
| WD-3-B5 | 202 | 40.0+/-16.6 | 3.01e-08 | 0.297 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | X | X |
| WD-3-B3 | 528 | 50.0+/-23.1 | 2.10e-07 | 1.258 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | X | X |
| WD-3-B0 | 1549 | 43.8+/-21.2 | 4.24e-07 | 2.874 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | X | X |

Tableau 3.2 : Valeurs des différents paramètres mesurés sur les coupes histologiques et sur les images IRM. Les colonnes 3 à 5 représentent les données mesurées sur les coupes histologiques et représentées graphiquement sur la figure 3.5. Les colonnes suivantes représentent les valeurs mesurées à partir des acquisitions IRM. # = nombre de vaisseaux. Cond. = conductivité. Dans les deux dernières colonnes, « X » signifie que la vitesse n'a pas pu être mesurée, soit à cause du repliement, ou parce qu'il n'y a pas de signal.

b. Caractérisation fonctionnelle du xylème de la tige par IRM

Estimation de la surface active et de la vitesse de flux avec la méthode FF

La méthode FF nous a permis d'identifier les surfaces fonctionnelles dans le xylème dans les conditions de la mesure IRM. Ces surfaces sont représentées en jaune sur la figure 3.2. Nous n'avons jamais observé de flux dans le phloème avec cette méthode et tous les flux présentés sont donc des flux xylémiens. Comme expliqué dans le premier chapitre, les expérimentations d'entrées de coupes sont répétées dans une gamme de temps de répétitions (T_R), ce qui nous permet d'ajuster le signal obtenu en fonction du T_R et d'estimer une vitesse moyenne de flux. Trois exemples d'ajustement du signal IRM moyenné sur la surface active en fonction du temps de répétition T_R sont présentés figure 3.6, pour la plante C-1 à différentes hauteurs le long de la tige. A titre d'exemple, après ajustement, la vitesse moyenne estimée pour la position B0 de la plante C-1 est égale à 0,443 mm.s⁻¹ et comme la surface active est égale à 0,874 mm², le flux obtenu est 0,387 mm³.s⁻¹, c'est-à-dire 1,393 g.h⁻¹. Pour réaliser cet ajustement, nous avons utilisé la distribution de T_1 dans la surface active (cf. Chapitre I) et cette distribution est représentée sur la figure 3.6. Les résultats expérimentaux et ajustements obtenus pour les autres plantes sont présentés en annexe 2 de la thèse.

Pour chacune des images IRM présentées sur la figure 3.2, des ajustements ont été réalisés et les vitesses ont été déduites (Tableau 3.2). A partir de ces vitesses et des surfaces actives, les flux ont été calculés à l'échelle des sections de tiges en fonction du traitement et de la position dans la plante.

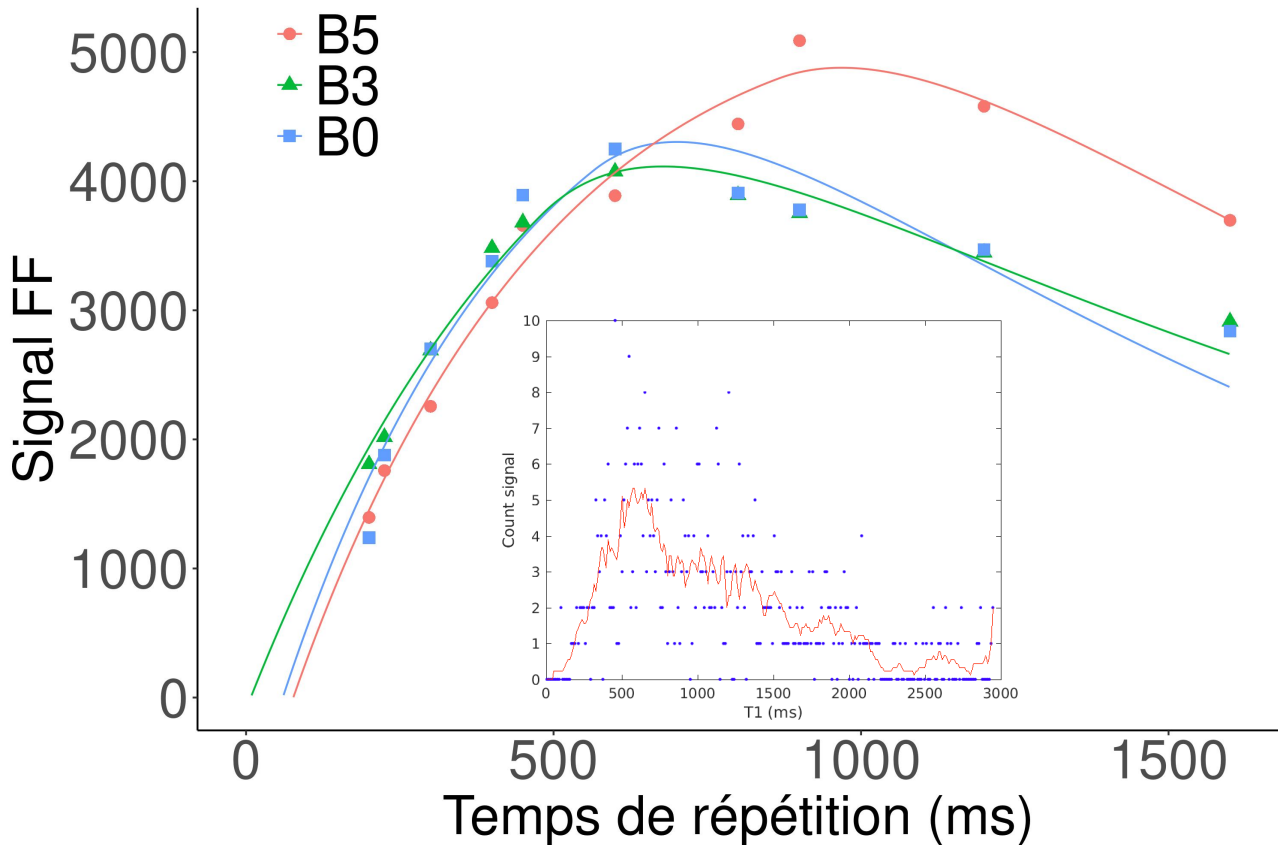


Figure 3.6 : Signal FF (unité arbitraire) mesuré à la position B0 (carrés bleus), B3 (triangles verts) et B5 (ronds rouges) pour la plante C-1 en fonction du TR en ms. Les meilleurs ajustements pour les trois positions sont représentés par les courbes, de la même couleur que les points. L'insert sous les courbes représente la distribution des T_1 dans la surface active, qui a permis de faire l'ajustement pour C-1-B0.

Estimation de la vitesse avec des expériences de pondération de diffusion

Des mesures et analyses complémentaires ont été conduites par des expériences avec pondérations de diffusion, afin de valider comme sur le système micro-fluidique (voir Chapitre 1) les vitesses et flux mis en jeu. Le tableau (3.2) présente les résultats obtenus dans les zones d'intérêts déterminées par les expériences réalisées en entrée de coupes (FF). Si les tendances générales sont retrouvées, plusieurs facteurs expérimentaux viennent entacher d'erreurs les résultats de ces mesures. Par exemple, à la différence du système micro-fluidique les zones d'intérêts sont difficiles à segmenter et peuvent se déformer, se déplacer tout au long de la mesure. Par ailleurs, la technique par pondération de diffusion présente une contrainte forte sur la valeur du gradient qui limite la gamme des vitesses qui peuvent être raisonnablement étudiées sans avoir des effets de repliement de la phase du signal RMN. Plusieurs mesures de vitesse des flux n'ont pu être extraites à cause de cet effet difficile à appréhender.

Pour ces raisons expérimentales et par souci de robustesse des mesures nous nous sommes concentrés par la suite sur les résultats des expérimentations d'entrées de coupes (FF) dans le cas des plantes qui présentent un contraste élevé et facilite la segmentation fine des zones actives.

Effets de la position le long de la tige et du traitement irrigation sur les paramètres déduits des mesures IRM

Les différents paramètres fonctionnels mesurés et déduits grâce aux acquisitions IRM sont reportés dans le tableau 3.2. Certains de ces paramètres dits fonctionnels ont été comparés aux valeurs mesurées en histologie et analysés au regard de la position sur la tige ou du traitement irrigation. Pour la suite des analyses nous avons retiré les plantes C-3 et WD-3, car l'absence de flux dans la plante WD-3 n'était pas explicable et on ne pouvait exclure l'existence d'un autre type de stress lié à l'installation dans l'IRM.

- Nombre et proportion de vaisseaux xylémiens actifs : pour le traitement C, le nombre de vaisseaux actifs au moment de la mesure est significativement plus faible (p -value < 0.05) en haut de la plante, aux positions B5 et B9, qu'en bas de la plante, à la position B0 (Figure 3.7 A). A la position B3, le nombre de vaisseaux actifs n'est pas significativement différent de celui observé aux autres positions. La figure 3.5 montre également que le nombre total de vaisseaux xylémiens observés en histologie est plus faible en haut de la plante. Le nombre de vaisseaux actifs est donc peut être tout simplement plus faible car il y a moins de vaisseaux au total. Cependant le ratio du nombre de vaisseaux actifs sur le nombre total de vaisseaux est significativement plus faible à la position B9 qu'à la position B0 (Figure 3.7 B). A la position B9 la proportion de vaisseaux actifs par rapport au nombre total de vaisseaux est donc plus faible comparé au bas de la tige. En revanche, à la position B5 ce ratio n'est pas significativement différent, ce qui signifie que s'il y a moins de vaisseaux actifs, il y a aussi moins de vaisseaux au total.

Pour le traitement WD, le nombre de vaisseaux actifs est significativement plus faible en haut de la plante à la position B5 qu'en bas de la tige alors que le ratio du nombre de vaisseaux actifs sur le nombre total de vaisseaux n'est pas significativement différent en fonction de la position. Cela indique que les nombres de vaisseaux totaux et actifs sont réduits proportionnellement en position B5 comparé à la position B0.

Pour ce qui est de la comparaison des traitements C et WD, seul le ratio du nombre de vaisseaux actifs sur le nombre total de vaisseaux est significativement différent (p -value < 0.05) et cela uniquement à la position B0 (Figure 3.7 B).

- Surface totale de vaisseaux actifs : on note une réduction significative de la surface active, c'est-à-dire la surface dans laquelle un flux a été observé, à la fois chez le témoin C et chez le traitement WD du bas vers le haut de la plante (B5 et B9 significativement différents de B0 pour le C et B5 significativement différent de B0 pour le WD) (Figure 3.7 C). Le même phénomène avait été observé pour la surface totale de vaisseaux xylémiens (Figure 3.5 B). Le ratio de la surface active sur la surface totale de vaisseaux est significativement plus faible chez les plantes témoin en haut de la plante (position B9) comparé au bas de la plante (Figure 3.7 D). Comme pour le nombre de vaisseaux actifs, on a donc une proportion de surface de vaisseaux actifs qui est plus faible à cette position comparé au bas de la plante. Pour les autres positions pour lesquelles on a observé une différence significative de surface active, les ratios ne varient pas indiquant des différences proportionnelles de surfaces totales.

Nous n'avons pas observé d'effet significatif du traitement irrigation sur ces surfaces, ni en valeur absolue, ni en proportion de la surface totale et ce quelle que soit la position sur la tige.

- Diamètres moyens des vaisseaux actifs : on ne note pas de différence significative du diamètre moyen des vaisseaux actifs en fonction de la position et du traitement (Figure 3.7 E). En revanche, ce diamètre moyen est systématiquement plus grand que le diamètre moyen de l'ensemble des

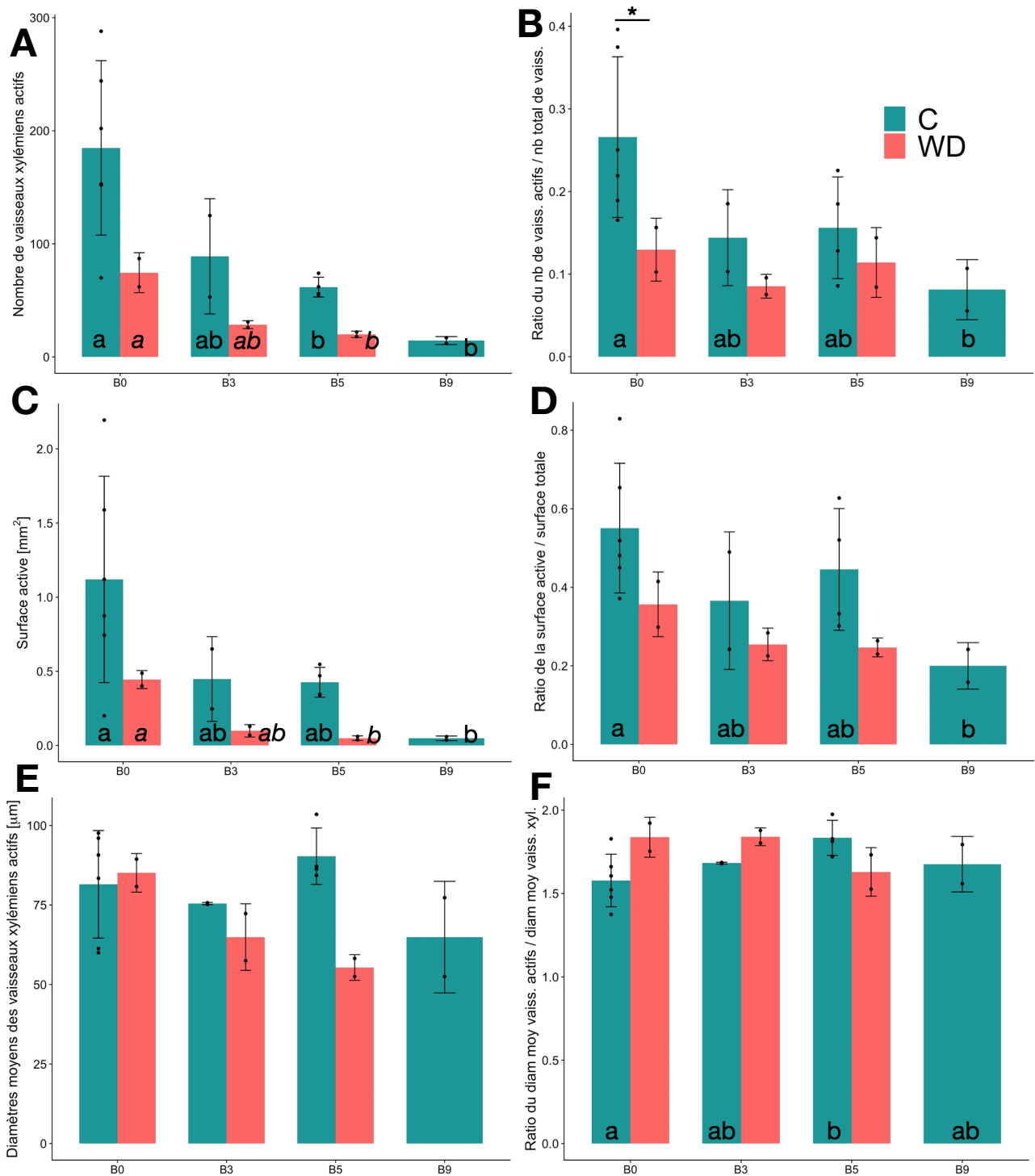


Figure 3.7 : Nombre de vaisseaux xylémiens actifs (A), ratio du nombre de vaisseaux xylémiens actifs sur le nombre total de vaisseaux xylémiens (B), surface active de vaisseaux xylémiens (mm²) (C), ratio de la surface active sur la surface totale de vaisseaux xylémiens (D), diamètres moyens des vaisseaux xylémiens actifs (μm) (E) et ratio des diamètres moyens des vaisseaux actifs sur les diamètres moyens de tous les vaisseaux du xylème (F) en fonction de la position et du traitement. Le traitement C est représenté en bleu et WD en rouge. Chaque point représente une répétition biologique et le sommet des barres représente la moyenne des répétitions biologiques avec l'écart type indiqué par les barres d'erreur. C-B0 : n = 6. C-B3, C-B9, WD-B0, WD-B3 et WD-B5 : n = 2. C-B5 : n = 4. L'effet position est indiqué par les lettres : deux groupes ont des lettres différentes lorsqu'ils sont significativement différents au risque 5%. L'effet traitement hydrique testé pour chaque position est indiqué par les * (p-value < 5%) au-dessus des colonnes.

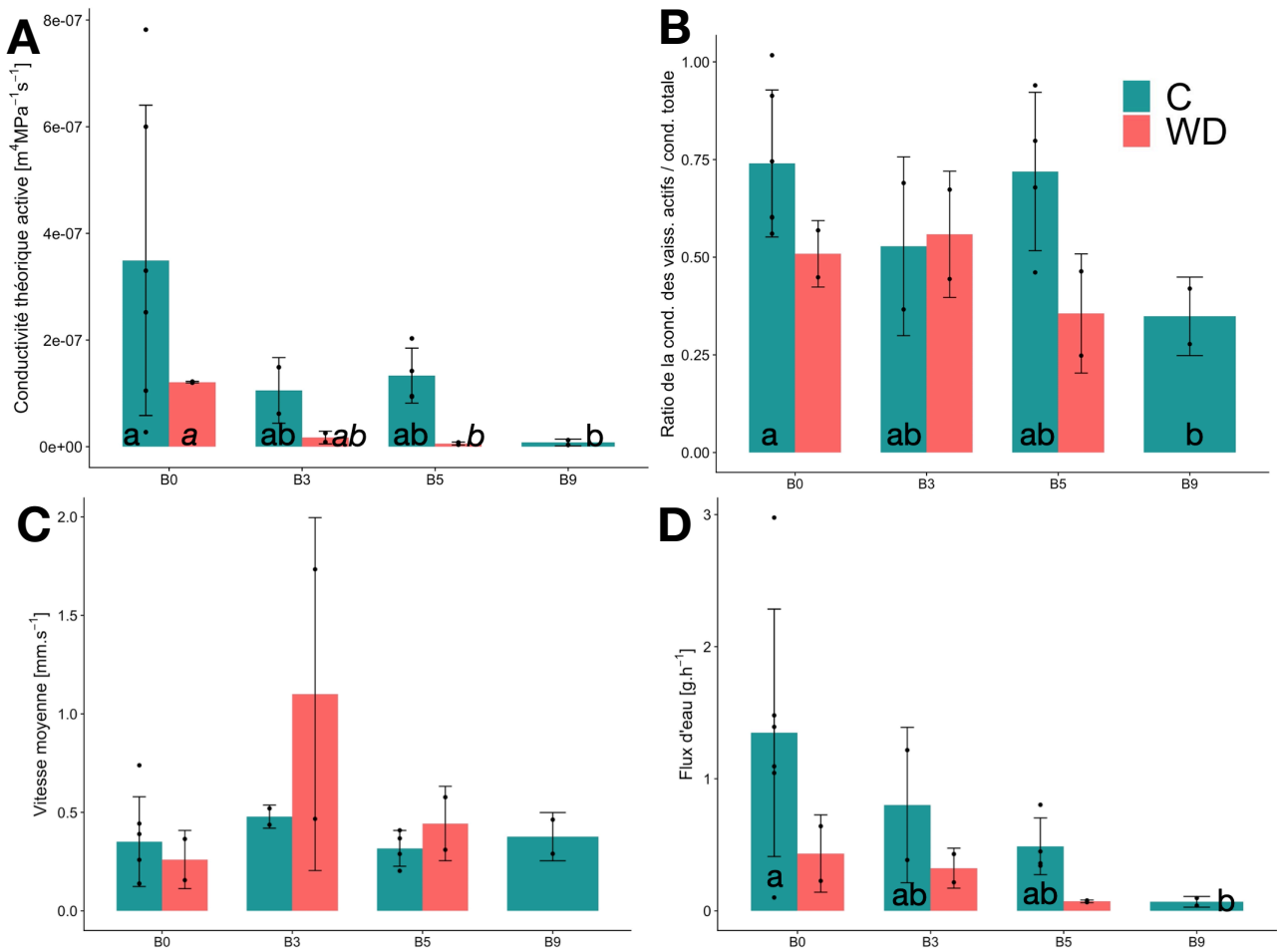


Figure 3.8 : Conductivité théorique des vaisseaux actifs ou conductivité théorique active ($m^4.s^{-1}.MPa^{-1}$) (A), ratio de la conductivité théorique des vaisseaux actifs sur la conductivité théorique totale des vaisseaux du xylème (B), vitesse moyenne des flux xylémiens mesuré par IRM ($mm.s^{-1}$) (C) et flux d'eau moyen circulant à travers les vaisseaux du xylème ($g.h^{-1}$) (D) en fonction de la position et du traitement. Le traitement C est représenté en bleu et WD en rouge. Chaque point représente une répétition biologique et le sommet des barres représente la moyenne des répétitions biologiques avec l'écart type indiqué par les barres d'erreur. C-B0 : n = 6. C-B3, C-B9, WD-B0, WD-B3 et WD-B5 : n = 2. C-B5 : n = 4. L'effet position est indiqué par les lettres : deux groupes ont des lettres différentes lorsqu'ils sont significativement différents au risque 5%.

vaisseaux xylémiens représenté figure 3.5 A. En effet, le ratio de ces deux diamètres est toujours largement supérieur à 1 (Figure 3.7 F). Nous n'observons pas de différence significative de ce ratio entre les positions et entre les traitements, mis à part un ratio supérieur en B5 qu'en B0 pour le traitement C.

- Conductivité du xylème : pour le traitement C, la conductivité théorique active (déduite des vaisseaux actifs) est significativement plus faible en position B9 qu'en position B0, tout comme le ratio de la conductivité théorique active sur la conductivité théorique totale (Figure 3.8 A et B).

Pour le traitement WD, la conductivité théorique active est significativement plus faible à la position B5 qu'à la position B0 (Figure 3.8 A) tout comme l'était la conductivité théorique totale (Figure 3.5 D). Ainsi la proportion de conductivité théorique totale qui est active n'est pas significativement différente en fonction de la position pour le traitement WD.

Enfin nous n'observons pas de différence significative entre les traitements ni pour la conductivité théorique active, ni pour le ratio entre la conductivité théorique active et la conductivité théorique totale.

- Vitesse de flux moyenne et flux xylémiens : la vitesse moyenne du flux sur la section de tige ne varie pas significativement le long de la tige ni en fonction du traitement hydrique. Cette valeur moyenne est égale à $0,43 \pm 0,34$ mm.s⁻¹. Cet écart-type élevé est lié à une vitesse très élevée mesurée chez une des plante WD-B3.

Enfin, en ce qui concerne les flux d'eau déduits à partir des vitesses et des surfaces actives, on observe une différence significative en fonction de la position pour le traitement C uniquement, liée à une diminution de la surface active du bas vers le haut de la plante et non pas à une différence de vitesse. Le flux d'eau mesuré à la position B9 est significativement plus faible que celui mesuré à B0 (Figure 3.8). Nous n'observons pas non plus de différence entre les traitements hydriques, sûrement à cause de la grande variabilité des valeurs mesurées.

4. DISCUSSION

Les expérimentations IRM ont été réalisées avec un scanner IRM ayant un champ magnétique suffisamment élevé et homogène de 9,4 T permettant d'avoir une résolution descendante jusqu'à $39 \mu\text{m} \times 39 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$, ce qui est suffisant pour imager en détails les vaisseaux xylémiens. Nous avons observé uniquement un flux montant, transporté dans des vaisseaux du xylème d'après la localisation des vaisseaux et après comparaison avec les coupes histologiques. Nous n'avons donc pas observé de flux phloémien dans nos conditions de mesure. Ceci peut être dû à la résolution qui est peut-être insuffisante pour imager les flux phloémiens, mais d'autres études IRM avec des résolutions moins bonnes (Windt et al., 2006 ; Prusova, 2016) ont réussi à imager des amas de vaisseaux phloémiens actifs chez la tomate. Une autre explication peut être que la vitesse des flux phloémiens est trop faible pour que nous puissions la mesurer avec notre méthode. En effet, comme expliqué dans le chapitre 1, notre méthode ne permet pas de correctement quantifier des flux ayant des vitesses inférieures à $0,05$ mm.s⁻¹. Windt et al. (2006) ont mesuré des flux phloémiens ayant des vitesses d'environ $0,4$ mm.s⁻¹, c'est à dire du même ordre de grandeur que nos vitesses de flux xylémiens. Comparé aux flux mesurés par ces auteurs, nous mesurons des flux xylémiens 10 fois plus faibles. Cette différence est principalement liée à une différence de vitesse car nos valeurs de surfaces actives ne sont pas si éloignées de celles qu'ils mesurent. Dans le chapitre 1 nous avons pu observer que dans les conditions environnementales des mesures IRM, les plantes n'étaient pas très actives et transpiraient très peu. Cette hypo-activité des plantes expliquerait alors ce facteur 10 car Windt et al. (2006) ont utilisé un IRM vertical et un rayonnement plus élevé. Afin d'avoir une contre-mesure de la transpiration des plantes il aurait fallu relever les variations de poids de la plante au cours des mesures IRM, mais la contrainte expérimentale liée à l'encombrement de l'aimant et à la position horizontale de la plante ne nous a pas permis d'installer un tel dispositif.

Nos résultats ont mis en évidence que seule une partie des plus gros vaisseaux xylémiens étaient actifs, *i.e* contribuaient significativement au flux mesuré. Nous avons pu mettre en évidence que, chez les plantes témoins, le flux diminuait significativement du bas vers le haut de la tige et que cette diminution était liée à une plus faible surface active plutôt qu'à une plus faible vitesse de flux (Figure 3.8 et Tableau 3.2). En effet, nous avons observé une vitesse quasi identique quelle que soit la position dans la plante ou le traitement (C ou WD). Ces résultats sont en accord avec ceux de Prusova (2016) qui a mis en évidence que les variations de flux xylémiens étaient principalement liées aux variations de surfaces actives et non à des variations de la vitesses du flux. Chez les plantes WD, le flux tend à être plus faible en haut de la tige également, mais au vu du faible nombre de répétitions cette réduction n'est pas significative.

Globalement nous avons observé une grosse variabilité dans les flux mesurés.

Sur les coupes histologiques, nous avons pu observer que le déficit hydrique diminuait le nombre total de vaisseaux xylémiens (-31%), la surface totale des vaisseaux xylémiens (-74%), le diamètre moyen (-20%) des vaisseaux xylémiens ainsi que la conductivité théorique totale (-65%) en haut de la tige principale qui a été initiée alors que la plante était déjà soumise au WD depuis plusieurs semaines. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Aliche et al. (2020) qui se concentre sur deux génotypes de pomme-de-terre. Dans cette étude, l'exposition des plantes à un déficit hydrique se traduisait par une densité de xylème par unité de surface plus élevée que chez les plantes témoins et par un diamètre moyen des vaisseaux xylémien plus faible en raison d'un plus grand nombre de vaisseaux de petite taille et à une diminution du nombre de gros vaisseaux.

Au niveau fonctionnel, la seule différence observée entre les traitements était celle du ratio entre le nombre de vaisseaux actifs et le nombre total de vaisseaux en bas de la tige, qui était plus faible chez les plantes WD que chez les plantes témoins. Avec l'IRM, nous avons pu mettre en évidence que les vaisseaux actifs sont les vaisseaux les plus larges, même si un grand nombre de petits vaisseaux étaient visibles sur la section de la tige. Le faible ratio de vaisseaux actifs indique probablement que la faible demande évaporative dans les conditions IRM (cf. Chapitre I) est facilement alimentée par un faible nombre de gros vaisseaux. Dans de futures expérimentations, il serait intéressant d'étudier si le nombre de vaisseaux actifs varie en fonction des conditions environnementales dans l'IRM, à vitesse de flux constante. Par exemple, une faible intensité lumineuse pourrait réduire le flux total de sève et augmenter la contribution relative du xylème à l'entrée d'eau dans le fruit comme montré par Hanssens et al. (2015). La cavitation du xylème amenant à la présence d'air dans les vaisseaux pourrait être un autre artefact mais cela aurait été facilement identifiable par IRM. D'autres blocages physique du xylème peuvent se produire comme cela a été observé dans des tiges de vigne et dans le pédicelle des baies de raisin mais cela n'empêche pas le fonctionnement du xylème grâce aux interconnexions des vaisseaux (Knipfer et al., 2015).

Dans les conditions environnementales que les plantes perçoivent lors des expérimentations IRM, la conductance théorique totale du xylème varie de un ou deux ordres de grandeur le long de la tige principale et ces variations résultent principalement du nombre de vaisseaux actifs. A notre connaissance, aucune valeur de conductivité n'a été mesurée à différents niveaux de la tige principale de tomate, mais les valeurs estimées dans le tableau 3.2 sont du même ordre de grandeur que les valeurs de conductivité mesurées dans les racines de maïs (Doussan et al., 1998) et chez les arbres (Cruziat et al., 2002). Les valeurs de conductivité que nous avons mesurées à l'échelle de la tige principale sont supérieures à celles estimées à l'échelle du pédicelle du fruit de tomate par Rancic et al (2010), ce qui est logique car la surface de xylème est plus élevée dans la tige que dans le pédicelle (comparaison entre la Figure 2.6 et la Figure 3.4 dans le cas du génotype WVA106). La conductivité théorique a été calculée à partir de la relation de Hagen-Poiseuille (Calkin et al., 1985) selon laquelle les vaisseaux les plus larges contribuent plus que les petits vaisseaux au flux de sève global car le flux dans les vaisseaux dépend du rayon à la puissance 4. De fait, nous avons trouvé que ce sont les vaisseaux actifs les plus larges qui contribuent le plus à la conductance théorique ce qui suggère que l'étude des gros vaisseaux uniquement serait suffisante pour estimer la conductivité des tissus. Bouda et al. (2019) ont récemment remis en cause ce calcul de conductivité en confrontant les flux prédits à l'aide du modèle théorique appliqué à un réseau de vaisseaux reconstruit à l'aide d'imagerie μ CT à rayons X, aux flux mesurés *in vivo* par IRM sur une tige de vigne d'un an. Le modèle de flux théorique n'est pas conforté par les mesures de flux réalisées par IRM. En fait, l'hétérogénéité du réseau de vaisseaux donne lieu à des gradients de pression transverses qui redirigent les flux des vaisseaux les plus larges vers les vaisseaux les plus étroits. Ce

phénomène provoquerait une réduction de 15% de la contribution des gros vaisseaux au flux, qui reste cependant majoritaire.

Les résultats présentés mettent en évidence l'intérêt de combiner des mesures d'IRM et d'histologie pour étudier les régulations hydrauliques de manière non destructive dans l'architecture des plantes. Ils mettent également en évidence une variation du pourcentage de surface active en fonction des conditions environnementales, qui souligne l'importance de considérer à la fois les aspects anatomiques et fonctionnels.

CHAPITRE IV : UTILISATION D'UN MODÈLE STRUCTURE-FONCTION POUR INTÉGRER LES DONNÉES ACQUISES PAR IRM ET HISTOLOGIE

1. INTRODUCTION

Dans les chapitres précédents nous avons pu mettre en évidence l'importance des aspects fonctionnels pour mieux comprendre les liens entre surface de tissus conducteurs et flux d'eau dans l'architecture de la plante de tomate.

Dans le chapitre III, des conductivités théoriques totales et fonctionnelles du xylème ont pu être estimées en mesurant le diamètre des vaisseaux xylémiens sur les coupes histologiques et sur les images IRM. Dans ce chapitre, l'objectif est d'utiliser la modélisation comme outil d'intégration des connaissances acquises dans les chapitres précédents afin d'évaluer l'impact des traits anatomiques et fonctionnels potentiellement impliqués dans la plasticité génétique et environnementale des réponses à la contrainte hydrique.

Nous avons utilisé le modèle structure-fonction PlaNet (Baldazzi et al., 2013) présenté en introduction (Figure 0.4). Ce modèle relie l'architecture de la plante à la spatialisation des flux d'eau et de carbone vers les différents organes. Les flux d'eau xylémiens sont pilotés par la transpiration foliaire et par la conductivité axiale des différents axes composant l'architecture de la plante. L'évolution de la conductivité axiale est reliée au diamètre des différents axes de la plante (entrenœud de la tige, rachis foliaire, pédoncule). A notre connaissance, nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données permettant de formaliser cette relation sur la tomate. Dans la version actuelle du modèle, cette conductivité a été paramétrée à partir de données acquises sur le pêcher (Vercambre et al., 2002) mais n'a jamais été confrontée à des données expérimentales de tomate.

Dans un premier temps nous allons présenter le modèle puis décrire sa paramétrisation afin de pouvoir simuler l'architecture et les conditions environnementales de l'IRM. Ensuite, nous utiliserons nos mesures de conductivités théoriques totales et actives pour paramétrer le calcul de la conductivité à partir du diamètre de la tige. Enfin nous comparerons les résultats de simulations pour des conditions de serre avec ceux obtenus dans les conditions de l'IRM et ce pour deux plantes, une plante témoin et une ayant subi un déficit hydrique. Enfin, une analyse de sensibilité du modèle à la conductivité hydraulique permettra d'évaluer l'impact de la variabilité génotypique des conductances mesurée dans le chapitre II.

2. MATERIEL ET METHODES

a. Présentation du modèle

Architecture de la plante

Dans le modèle PlaNet, l'architecture de la plante se construit au fur et à mesure de l'apparition des organes et de leur croissance. La plante est vue comme un assemblage d'unités élémentaires appelées phytomères. Chaque phytomère est composé d'un entrenœud (tige) et d'une feuille (composée de plusieurs folioles) ou d'un bouquet dont le nombre de fruits est fixé. Le plant de tomate est donc vu comme une succession de phytomère végétatif et de phytomère génératif. Pour la tige, seule l'axe principal est modélisé car les ramifications sont retirées au fur et à mesure de la

croissance des plantes, selon la technique de l'ébourgeonnage classiquement réalisée en serre de production.

Pour les génotypes de tomates de type indéterminé, le développement des organes dépend du temps thermique. Le phyllochrone, c'est-à-dire le temps qui sépare l'apparition de 2 feuilles ou dans le cas de la tomate de 2 phytomères, est stable quelles que soient les conditions environnementales et a été estimé préalablement (Baldazzi et al., 2013). Il y a donc un phytomère qui apparaît tous les 20,83°C et ce phyllochrone reste constant pendant le développement de la plante.

Chaque organe commence sa croissance après son émergence et après un temps de latence donné (Najla et al., 2009). La longueur d'un organe végétatif (entrenœud, rachis foliaire ou pédoncule) au temps t (s) dépend alors de sa vitesse d'élongation, de sa date d'émergence et du temps de latence :

$$l_A = v_{elong} \times (t - d_{emergence} - d_{latence}) \quad (\text{eq. 4.1})$$

avec l_A la longueur de l'article considéré A (entrenœud, rachis ou pédoncule, cm), v_{elong} la vitesse d'élongation (cm.s^{-1}), $d_{emergence}$ la date d'émergence (s) et $d_{latence}$ la durée de latence (s). La vitesse d'élongation est supposée constante pour un phytomère. La longueur maximale d'un entrenœud est donc directement proportionnelle à sa vitesse et à sa durée de croissance. La vitesse d'élongation dépend du rang du phytomère. Les mesures de la durée de croissance et des longueurs maximales atteintes par les organes végétatifs permettent alors de paramétrer les vitesses de croissance suivant le rang du phytomère.

Les feuilles sont divisées en folioles et rachis foliaires et de la même façon que pour les entrenœuds, des durées et vitesses d'élongation sont estimées pour les folioles et les rachis. Le nombre de folioles latérales est renseigné pour notre génotype d'intérêt (WVA106) ainsi que les vigueurs des folioles et des rachis (longueur petit foliole ou rachis / longueur grand foliole ou rachis). Des relations allométriques sont estimées permettant de relier la surface d'une feuille à sa longueur au cours de sa croissance. Des angles d'insertion (de la feuille et des bouquets sur la tige), la phyllotaxie (angle de rotation pour l'insertion des organes autour de la tige) et l'effet de la gravité sur la courbure des feuilles et des bouquets permettent de construire une architecture dynamique de la plante.

Pour ce qui est du système racinaire, une relation allométrique relie la biomasse souterraine à la biomasse végétative aérienne (Jones et al., 1991).

Photosynthèse et concentration en carbone

L'architecture 3D de la plante est utilisée pour calculer l'interception de la lumière : la radiation incidente est estimée pour chaque feuille, en fonction de sa position dans le couvert. Les hypothèses de base de l'interception du rayonnement sont (i) les rayons traversant la canopée sont atténués en fonction de la loi de la Beer-Lambert, (ii) le feuillage est uniformément réparti dans l'espace occupé par la canopée et (iii) le coefficient d'extinction est lié à la distribution de l'inclinaison des feuilles (Wang et al., 2007). Le rayonnement incident est alors estimé pour chaque feuille, en fonction de sa position dans la canopée et donc de la distance de trajet calculée des rayons.

Pour calculer la photosynthèse, le modèle utilisé est issu du modèle biochimique de la photosynthèse foliaire (Farquhar et al., 1980), dont les paramètres ont été estimés pour la tomate (Sarlikioti et al., 2011).

Les assimilats carbonés produits par la photosynthèse sont stockés dans les feuilles puis chargés dans le phloème. Pour la tomate, le saccharose pénètre dans les complexes tubes criblés-cellules compagnes par un chargement actif alimentée (DeWitt et Sussman, 1995) qui a été modélisée suivant une cinétique de Michaelis-Menten. Le saccharose est alors transporté depuis les organes sources vers les organes puits à travers le réseau phloémien. Les déchargements et les rechargements en carbone ont lieu simultanément le long du phloème (Van Bel, 2003). Dans le

modèle, de tels processus se produisent pour chaque entrenœud et chaque rachis. Le mécanisme de fuite est associé à un processus de diffusion et est modélisé par une fonction linéaire de la concentration en glucides du phloème, puisque la concentration apoplastique est très faible (Patrick et al., 2001). Le rechargement phloémien dépend des transporteurs de saccharose et est donc sensible à la concentration apoplastique en sucre. Ce processus est formalisé par la cinétique de Michaelis-Menten (Patrick et al., 2001). La concentration en assimilats carbonés est calculée dans tous les compartiments de stockage. Les dimensions et la matière sèche de l'architecture végétative modélisée est utilisée pour estimer la demande en assimilats des organes végétatifs. Les sucres utilisés pour la respiration d'entretien sont estimés par un taux de respiration d'entretien et une loi de Q10 pour incorporer l'effet de la température (Jones et al., 1991). Le coût de la croissance, la respiration de croissance et l'accumulation de la biomasse sèche sont estimés en utilisant l'efficacité qui tient compte de la respiration de croissance.

La croissance des fruits est modélisée par le modèle Fruit Virtuel (Fishman and Génard, 1998 ; Liu et al., 2007), en faisant l'hypothèse que le péricarpe du fruit se comporte comme une seule cellule. Les conditions aux limites pour chaque fruit sont le potentiel hydrique du xylème et la concentration du phloème en carbone au point d'insertion du fruit. La concentration du phloème en carbone est considérée comme étant uniforme à travers la plante, alors que le potentiel hydrique xylémien varie avec la position du fruit dans l'architecture hydraulique de la plante. La croissance de chaque fruit est simulée en couplant le modèle Plante au modèle Fruit Virtuel, avec les conditions aux limites données par le modèle plante au sein de l'architecture. Les paramètres du modèle Fruit Virtuel sont identiques quelque soient la localisation du fruit ou le traitement.

Bilan d'énergie, transpiration foliaire et flux dans la plante

Le modèle de rayonnement a été couplé à un modèle de bilan d'énergie. Pour chaque feuille, le bilan radiatif dépend du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR), du rayonnement proche infrarouge (NIR) et du rayonnement infrarouge thermique (TIR). Le flux de chaleur sensible et le flux de chaleur latente sont calculés en fonction des conductances de la couche limite de la feuille et des conductances stomatiques (Sinoquet et al., 2001). La transpiration foliaire dépend (1) des conditions climatiques et (2) de la conductance stomatique. Dans le modèle, la conductance stomatique est simulée par le modèle de Jarvis (1976), les conditions environnementales pouvant diminuer la conductance maximale par des fonctions de réduction. Les variables considérées dans le modèle sont à la fois le rayonnement, la température et le déficit de pression de vapeur (VPD) pour les variables climatiques ainsi que le potentiel hydrique des feuilles comme variable plante. Les conditions environnementales permettent alors de calculer un bilan d'énergie à l'échelle de chaque feuille et d'en déduire un flux transpiratoire. Ce flux transpiratoire local permet de calculer l'arbre des flux dans l'ensemble de la plante. Le flux d'eau dans la plante permet d'en déduire l'arbre des potentiels hydriques, classiquement déduits de l'analogie ohmique appliquée au transfert de l'eau dans la plante. La conductance et le flux d'eau sont impliqués dans le calcul du potentiel hydrique des entrenœuds. Entre 2 points *A* et *B*, le flux d'eau est alors égal à :

$$w_f = K_{hAB} \times (\psi_B - \psi_A) \quad (\text{eq. 4.2})$$

avec ψ_A et ψ_B les potentiels hydriques aux points *A* et *B* (MPa), w_f ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) le flux d'eau xylémien entre *A* et *B*, et K_{hAB} la conductance hydraulique entre *A* et *B* ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$). Le flux d'eau est donc proportionnel à la conductance hydraulique et à la différence de potentiel hydrique le long de la section parcourue. Le flux d'eau résulte à la fois de la demande transpiratoire au niveau des feuilles ainsi que des flux d'eau vers les fruits en croissance. Dans le modèle PlaNet, la conductivité

hydraulique xylémienne est estimée à partir du diamètre du segment (Tyree, 1988) et est donc variable au niveau de chaque phytomère selon la relation :

$$k_h = a \times diam^b \quad (\text{eq. 4.3})$$

avec k_h la conductivité axiale xylémienne du segment ($\text{m}^4 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$), $diam$ le diamètre du segment (m), a ($\text{m}^4 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$) et b (sans unité) des paramètres dérivés empiriquement (d'après Vercambre et al., 2002).

Dans le modèle PlaNet la conductivité est exprimée en $\text{m}^4 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$. La conductance ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$) d'un segment est alors simplement la conductivité de ce segment divisée par sa longueur en cm.

Connaissant l'arbre des flux, les conductances hydrauliques des axes et le potentiel hydrique au collet, il est alors possible de simuler l'arbre des potentiels hydriques dans la plante. Le potentiel hydrique des feuilles peut induire une régulation de la conductance stomatique et donc du bilan d'énergie. Ce processus est itératif et permet progressivement de converger vers l'arbre des flux et des potentiels hydriques dans la plante.

b. Estimation des paramètres architecturaux

L'objectif est de parvenir à reproduire avec le modèle, l'architecture aérienne de la plante qui était dans l'IRM. Pour cela les paramètres du modèle PlaNet ont tout d'abord été estimés pour le génotype WVA106, en utilisant notamment les paramètres fruit que nous avons estimés précédemment pour le modèle Fruit Virtuel (cf. Chapitre II). Ensuite, il s'agissait d'estimer les paramètres plante par plante, pour avoir une architecture aérienne simulée qui représente une maquette de la plante observée.

Dans ce chapitre, nous nous sommes concentrés sur deux plantes présentées dans le chapitre III, la plante C-1 et la plante WD-1. Pour rappel, ces deux plantes ont la même date de semis et ont été élevées dans les mêmes conditions, excepté pour l'irrigation, le déficit hydrique ayant été appliqué chez la WD-1, en réduisant de 50% les apports d'eau comparé à la plante C-1 après l'apparition du premier bouquet.

L'architecture de la plante est simulée de manière dynamique par le modèle, dépendant à la fois du développement (apparition des organes végétatif et génératif selon le temps thermique) et de leur croissance (vitesse de croissance et durée de croissance). L'architecture aérienne des plantes a été caractérisée après chaque expérimentation IRM afin d'estimer les différents paramètres de croissance architecturale de la plante. Pour cela nous avons mesuré : la hauteur totale de la plante, la hauteur des différents bouquets, la hauteur des différentes zones où une acquisition IRM a été réalisée, la longueur de toutes les feuilles présentes et le diamètre des fruits.

Des mesures de longueur et de surface foliaires ont été réalisées sur d'autres plantes WVA106 afin d'établir une relation allométrique entre la longueur des feuilles, variable mesurable rapidement et de manière non destructive et leur surface. Cette relation est du type:

$$S = a \times l^b \quad (\text{eq. 4.4})$$

avec S surface de la feuille en mm^2 , l longueur de la feuille en mm avec $a = 0,01$ et $b = 2,49$ dans notre cas.

Cette relation (Figure 4.1) est identique pour les deux conditions témoin et déficit hydrique (thèse G. Koch 2018), le déficit hydrique altérant la croissance globale de la feuille sans modifier cette relation.

Une comparaison de l'architecture aérienne des plantes simulées et des plantes observées est décrite dans la tableau 4.1.

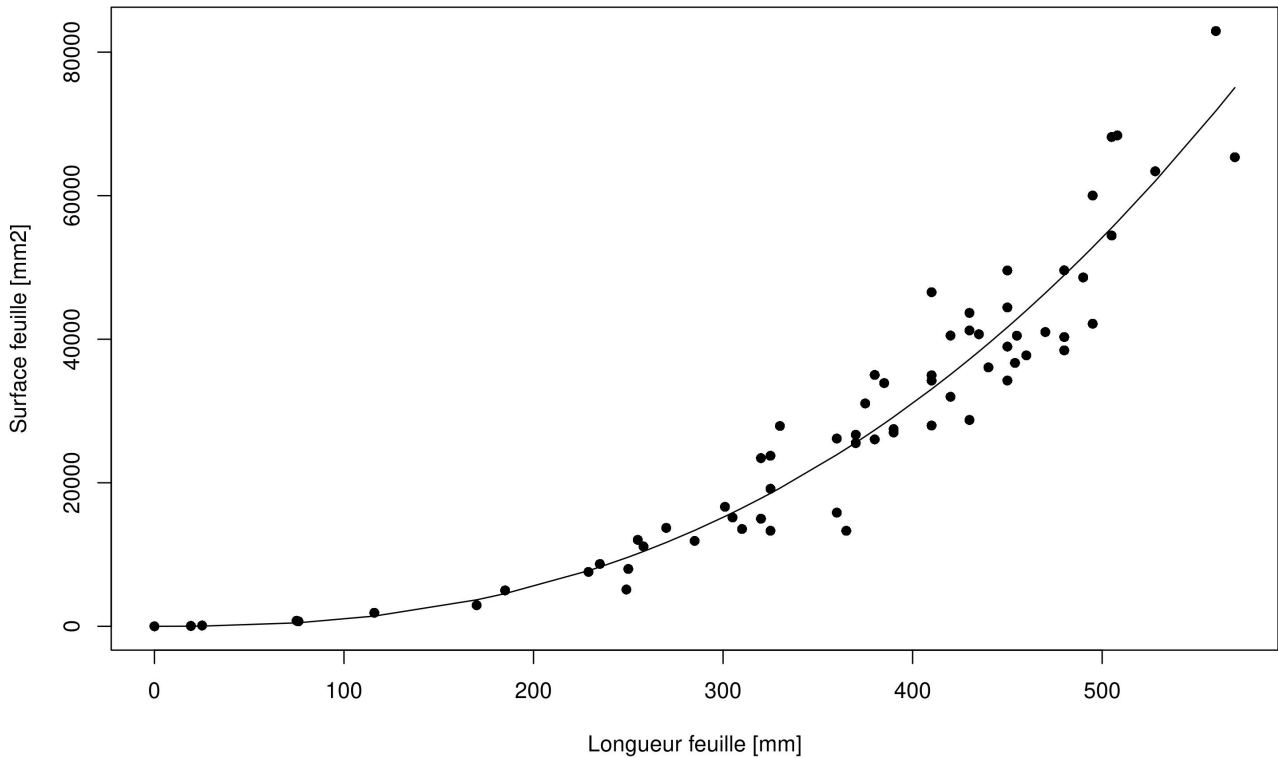


Figure 4.1 : Surface foliaire en mm² en fonction de la longueur des feuilles en mm pour le génotype WVA106. Les points noirs représentent les données observées et la courbe noire représente le modèle de type $S = a \times l^b$ (équation 4.4), avec $a = 0,01$ et $b = 2,49$.

| Trt-Pte | Date | H | <i>H sim</i> | Nb F | <i>Nb F sim</i> | Nb bouq | <i>Nb bouq sim</i> | SF | <i>SF sim</i> | <i>D sim</i> | CP | Z mes | Nb F ecl | Num F ecl | Rgs ecl |
|---------|------------|-----|--------------|------|-----------------|---------|--------------------|-------|---------------|--------------|----|-------|----------|-----------|-----------|
| C-1 | 17/02/2020 | 252 | 231 | 40 | 40 | 10 | 9 | 0,472 | 0,505 | 2264 | B5 | EN 26 | 13 | F1-F13 | EN1-EN14 |
| | | | | | | | | | | | B3 | EN 19 | 12 | F29-F40 | EN36-EN50 |
| | | | | | | | | | | | B0 | EN 3 | 25 | F16-F40 | EN18-EN50 |
| WD-1 | 18/02/2020 | 158 | 158 | 32 | 32 | 8 | 7 | 0,298 | 0,317 | 1896 | B5 | EN 26 | 13 | F1-F13 | EN1-EN14 |
| | | | | | | | | | | | B3 | EN 19 | 0 | X | X |
| | | | | | | | | | | | B0 | EN 8 | 14 | F19-F32 | EN22-EN40 |

Tableau 4.1 : Caractéristiques architecturales des plantes C-1 et WD-1 (cf. Chapitre III) avec en italique les caractéristiques architecturales des plantes simulées et la durée de simulation en heures nécessaires pour obtenir ces valeurs. **Trt-Pte** = traitement- plante. **H** = hauteur totale (cm). ***H sim*** = hauteur totale de la plante simulé (cm). **Nb F** = nombre de feuilles. ***Nb F sim*** = nombre de feuilles de la plante simulée. **Nb bouq** = nombre de bouquets. ***Nb bouq sim*** = nombre de bouquets sur la plante simulée. **SF** = surface foliaire (mm²). ***SF sim*** = surface foliaire de la plante simulée (mm²). ***D sim*** = durée de la simulation (heures). **CP** = code position. **Z mes** = zone de mesure (numéro d'entreoeud (EN)). **Nb F ecl** = nombre de feuilles éclairées. **Num F ecl** = numéro feuilles éclairées. **Rgs ecl** = rangs éclairés (numéro d'EN).

c. Conditions aux limites

Les données horaires de température, rayonnement et potentiel hydrique au collet mesurées en serre sont les entrées du modèle, permettant en particulier de calculer le temps thermique. Pour les plantes du traitement WD, les mêmes entrées climatiques ont été utilisées mais le potentiel hydrique au collet était plus faible pour simuler un effet du déficit hydrique. En serre, à la date où la simulation est réalisée, la température varie de 22°C la nuit jusqu'à 31°C au midi solaire, l'humidité relative est comprise entre 60 et 75%, le rayonnement global est supérieur à 1500 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ au midi solaire et le potentiel hydrique descend jusqu'à -0,3 MPa la journée pour les plantes témoins et jusqu'à -0,8 MPa pour les plantes subissant un déficit hydrique.

Les conditions environnementales spécifiques de l'IRM ont également été renseignées. Dans le cas des expérimentations réalisées sur les plantes C-1 et WD-1, les plantes ont été placées pendant 24h dans des conditions précises de rayonnement, aussi bien en termes d'intensité que de phytomères exposés à la lumière. Le rang des feuilles éclairées a été varié en fonction de la zone d'intérêt placée au centre de l'IRM pour être imagée (Tableau 4.1). Les panneaux de LED disposés autour de ces feuilles ont permis d'imposer un rayonnement de 200 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ (cf. Chapitre I, figure 1.4), les autres feuilles étant à l'obscurité, avec un rayonnement nul.

Les conditions de température et d'humidité relative sont différentes dans l'IRM et en serre. Les conditions environnementales restent constantes durant l'expérimentation IRM car l'environnement de la cage de Faraday est stable : la température est de 21°C et l'humidité relative à 50% à partir de la date où la plante est placée dans l'IRM. Etant donnée la faible intensité lumineuse, la transpiration de la plante est très faible (cf. Chapitre I) pendant les 24h de simulation qui correspondent à la mesure IRM. Le potentiel hydrique au collet reste égal au potentiel hydrique de base : -0,1 MPa pour les plantes témoins et -0,2 MPa pour les plantes stressées.

Ainsi calibrée et ajustée, la maquette architecturale construite et les conditions environnementales imposées permettent de simuler le fonctionnement de la plante pendant la mesure IRM et en particulier la distribution des flux et des potentiels hydriques dans la plante.

Pour une même plante, nous avons réalisé des mesures IRM à différents niveaux le long de la tige, correspondant à la partie basse de la tige et aux feuilles basales (B0), à la partie intermédiaire de la tige (B3) et enfin à la partie haute de la plante et aux feuilles apicales (B5). En fonction de ces zones de mesures, le nombre de feuilles, leurs surfaces et le rang des feuilles éclairées sont différents (Tableau 4.1). Nous avons donc trois séries d'observations/simulations par plante, correspondant à ces 3 conditions de rayonnement.

3. RESULTATS

a. Estimation des paramètres associés à la conductivité hydraulique

A partir des données de conductivité théorique totale (mesurées sur les coupes histologiques en considérant l'ensemble des vaisseaux du xylème) et active (mesurées sur les images IRM en ne considérant que les vaisseaux participant au flux observé) calculées dans le chapitre III, il est possible d'établir une relation entre la conductivité et le diamètre de la tige de tomate équation 4.2 (Figure 4.2). Les paramètres obtenus à partir de la conductivité théorique totale sont $a = 1,157.10^{-10}$ ($\text{m}^4.\text{s}^{-1}.\text{MPa}^{-1}$) et $b = 3,683$. Les paramètres obtenus à partir de la conductivité théorique active sont $a = 1,730.10^{-11}$ ($\text{m}^4.\text{s}^{-1}.\text{MPa}^{-1}$) et $b = 4,387$ pour une conductivité en $\text{m}^4.\text{s}^{-1}.\text{MPa}^{-1}$ et un diamètre en mm. Pour établir ces relations, nous avons mélangé les deux traitements hydriques car le traitement n'a pas d'effet significatif sur la conductivité théorique associée.

La différence entre les deux hypothèses de conductivité (totale ou active) n'est pas stable en fonction du diamètre : elle est plus forte pour les petits diamètres que pour les diamètres plus

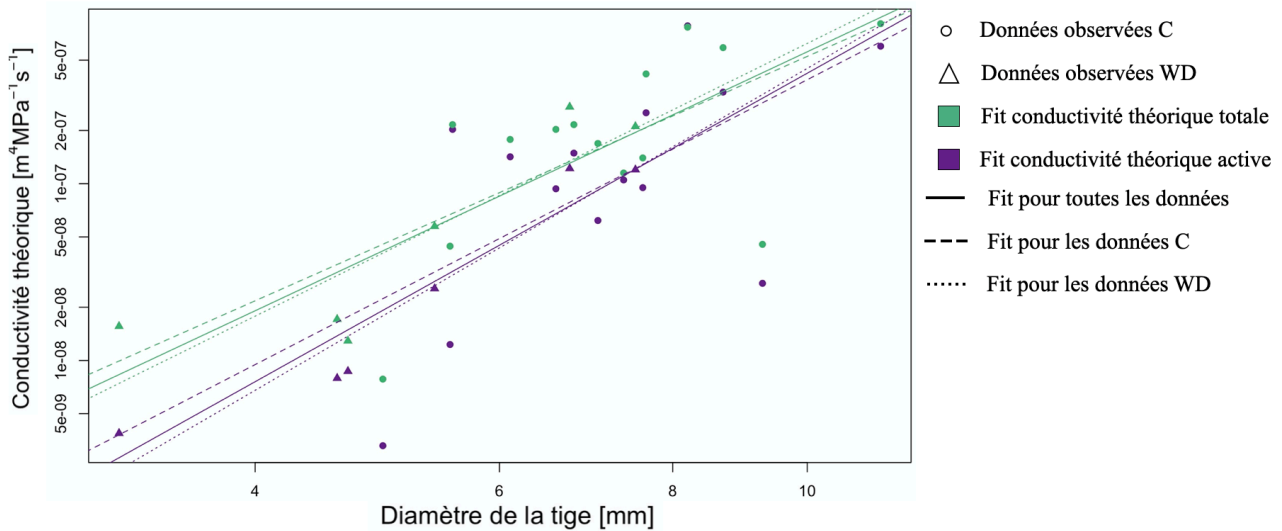


Figure 4.2 : Conductivité théorique ($m^4 \cdot s^{-1} \cdot MPa^{-1}$) calculée en fonction du diamètre de la tige (mm) mesuré. Échelle log-log. Les ronds verts représentent les données de conductivité théorique totale du xylème mesurée sur des plantes témoins (C) et les triangles verts les données de conductivité théorique totale du xylème mesurée sur les plantes en déficit hydrique (WD). Les ronds violets représentent les données de conductivité théorique active du xylème mesurée sur des plantes C et les triangles violets les données de conductivité théorique active du xylème mesurée sur les plantes WD. Les courbes vertes et violettes correspondent à l'ajustement de l'équation du modèle $K_h = a \times diam^b$, pour respectivement la conductivité théorique totale et active. Dans chaque cas, les lignes en trait plein correspondent à un ajustement sur l'ensemble des données des deux traitements (C et WD), les lignes en pointillés larges ne concernent que les données pour le traitement contrôle (C) et les lignes en petits pointillés que les données en condition de déficit hydrique (WD).

élevés. Par exemple, pour un diamètre de 5 mm, donc dans la gamme basse, la conductivité théorique totale est égale à $4,3 \cdot 10^{-8} m^4 \cdot s^{-1} \cdot MPa^{-1}$ et la conductivité théorique active est égale à $2 \cdot 10^{-8} m^4 \cdot s^{-1} \cdot MPa^{-1}$, soit 47 % de la conductivité théorique totale. Cette différence est encore plus forte pour des diamètres d'axes plus petits, avec des conductances pouvant être réduites d'un ordre de grandeur en ne considérant que les vaisseaux actifs. Dans la gamme haute des diamètres observés, la différence est moins marquée : pour un diamètre de 10 mm, la conductivité théorique totale est égale à $5,6 \cdot 10^{-7} m^4 \cdot s^{-1} \cdot MPa^{-1}$ et la conductivité théorique active est égale à $4,2 \cdot 10^{-7} m^4 \cdot s^{-1} \cdot MPa^{-1}$, soit 75 % de la conductivité théorique totale.

Paramètres associés à la régulation stomatique

Dans les conditions de l'IRM, pour un PAR de $200 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, selon le rang foliaire la transpiration et la conductance stomatique varient entre 0,5 et $1,5 mm H_2O \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ et entre 0,02 et $0,09 mol H_2O \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ respectivement (voir Chapitre I). Ces données ont été utilisées pour paramétrer les fonctions de réduction associées au calcul de la conductance stomatique avec le modèle de Jarvis. Ces fonctions de réduction du PAR, du VPD, de la température et du potentiel hydrique sont représentées sur la figure 4.3.

b. Simulations des flux et des champs de potentiels hydriques

Dans cette partie sont présentées les simulations réalisées à la fois dans les conditions classiques sous serre ainsi que dans les conditions imposées avec l'expérimentation IRM pour les plantes C-1 et WD-1 (Tableau 4.1). La différence entre les simulations en serre et dans les conditions de l'IRM sont les conditions environnementales aux limites imposées à la plante (cf. Matériel et Méthodes) et notamment le rayonnement (intensité et nombre de feuilles éclairées). Pour les simulations dans les conditions de l'IRM, trois simulations différentes sont présentées par plante : C-1-B0, C-1-B3 et

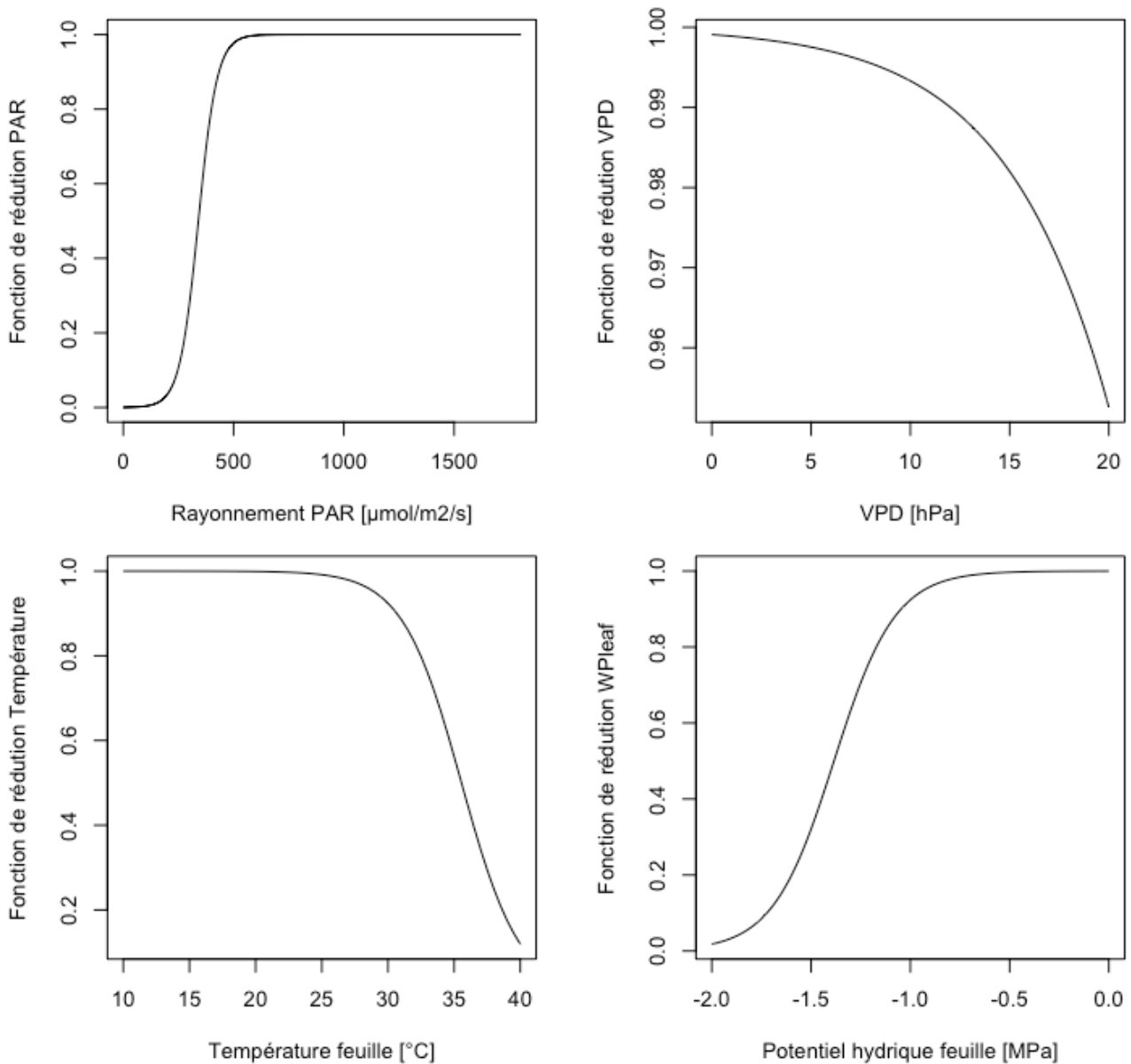


Figure 4.3 : Fonctions de réduction du PAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), du VPD (hPa), de la température de la feuille ($^{\circ}\text{C}$) et du potentiel hydrique de la feuille (MPa) utilisées dans le le modèle pour calculer la conductance stomatique.

C-1-B5 pour la plante C-1 et WD-1-B0, WD-1-B3 et WD-1-B5 pour la plante WD-1. Les différences entre ces trois types de simulations sont le rang et le nombre de feuilles éclairées (Tableau 4.1). Pour une plante donnée, dans les quatre situations (serre et les trois cas IRM), les plantes ont la même architecture aérienne et les mêmes diamètres de tige, elles ont donc des conductivités hydrauliques calculées équivalentes pour un même entrenœud, mais variables le long de la tige.

- Simulation des flux xylémiens dans la tige (Figure 4.4)

Les flux transpiratoires des feuilles dépendent des conditions expérimentales et en particulier de la lumière. Quelque soit l'hypothèse de conductivité hydraulique théorique (active ou totale) (équation 4.2), le flux transpiratoire des feuilles n'est quasiment pas modifié (les valeurs sont très proches ou se superposent sur la figure 4.4), les potentiels hydriques simulés au niveau foliaire n'entraînant pas de régulation stomatique, excepté pour la position B3 de la plante WD-1. Dans les conditions aux

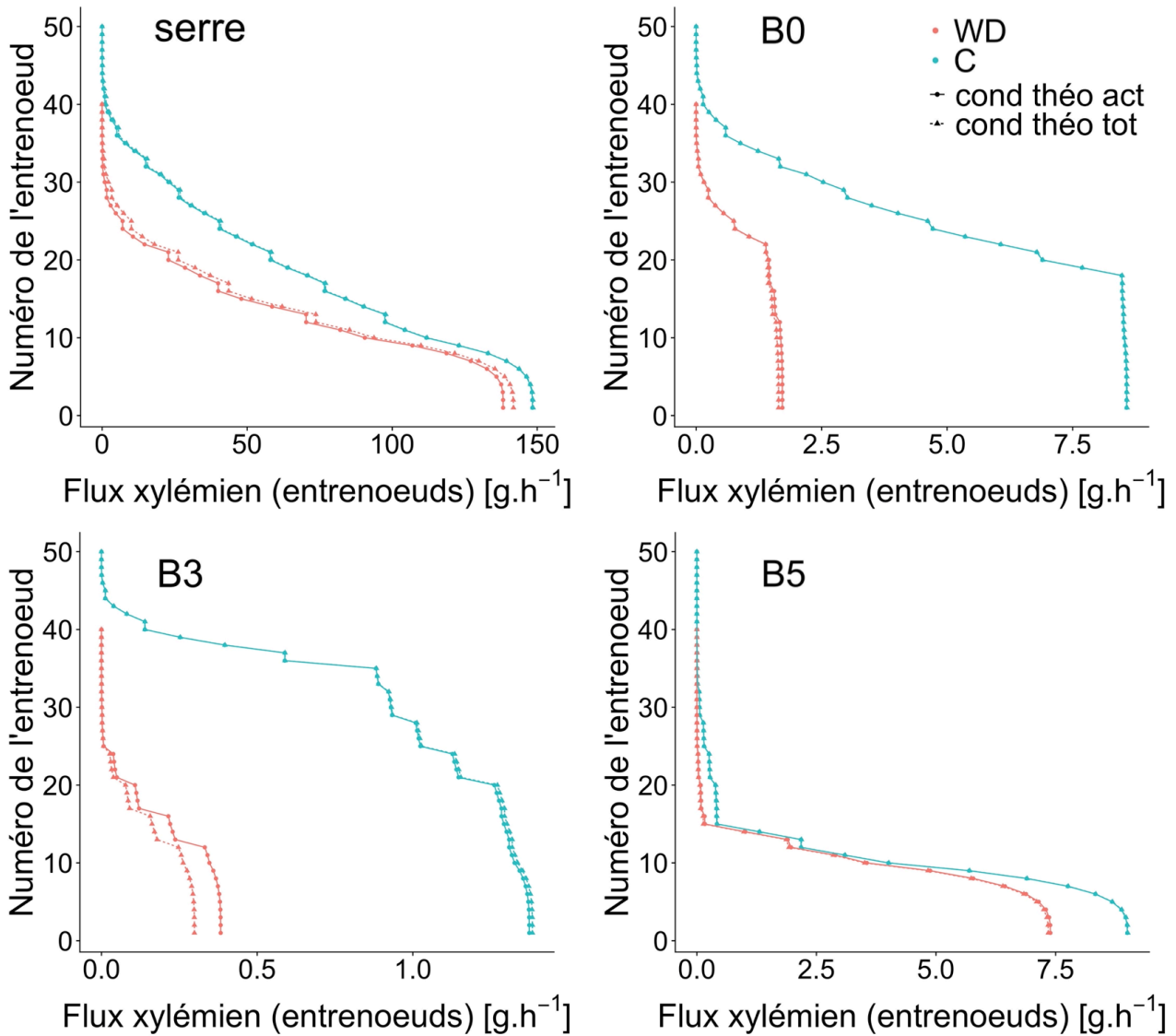


Figure 4.4 : Flux xylémiens simulés à l'échelle de la tige ($g \cdot h^{-1}$) selon le rang de l'entre-noeud, pour les quatre simulations différentes : simulations dans les conditions de la serre (serre), simulations dans les conditions de l'IRM lorsque le bas de la tige est dans l'IRM (B0), lorsque le milieu de la tige est dans l'IRM (B3) et lorsque le haut de la tige est dans l'IRM (B5) et pour les deux plantes (C-1 en bleu et WD-1 en rouge). Les triangles reliés par un trait pointillé représentent les simulations réalisées avec les conductivités théoriques totales (cond théo tot) et les ronds reliés par un trait plein représentent les simulations réalisées avec les conductivités théoriques actives (cond théo act).

limites appliquées, l'hypothèse sur la conductivité hydraulique joue essentiellement sur la concentration phloémienne et donc sur les gradients de potentiel hydrique entre le pédicelle et le fruit simulé par le modèle Fruit Virtuel. Avec l'hypothèse de conductivité hydraulique active, ces gradients sont plus forts, entraînant des flux vers les fruits plus importants.

Pour les quatre simulations (serre, B0, B3 et B5), les flux xylémiens simulés pour la plante WD-1 sont plus faibles que ceux de la plante C-1, ce qui s'explique par sa plus faible surface foliaire. Le flux transpiratoire surfacique n'est pas affecté (le déficit hydrique est faible), mais la croissance en dimension des feuilles a été affecté entraînant donc une plus faible transpiration à l'échelle de la plante entière (Tableau 4.1).

Pour les simulations dans les conditions de serre, les flux xylémiens en bas de la tige principale des plantes C-1 et WD-1 sont proches de $150 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ et $140 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivement. Ces flux représentent la

somme des flux transpiratoires de chaque feuille de la plante et des flux pour la croissance des fruits. A partir du quatrième entrenœuds, le flux commence à diminuer associé au flux transpiratoire vers les feuilles et au flux vers les fruits. Les valeurs de flux le long de la tige deviennent proches de 0 au niveau l'EN 40 pour la plante C-1 et de l'EN 30 pour WD-1 et ce jusqu'en haut de la plante (EN 50 pour C-1 et EN 40 pour WD-1). La contribution des feuilles du haut de la plante au flux transpiratoire total est quasiment négligeable car la surface foliaire de ces feuilles est très faible (feuilles en croissance).

Pour les simulations dans les conditions IRM, l'arbre des flux est directement lié aux feuilles éclairées. Pour la simulation avec les feuilles éclairées seulement à partir de la position médiane chez la plante C-1 (feuilles de 16 à 40 ce qui correspond aux EN 18 à 50 pour C-1-B0), le flux xylémien est constant de l'EN 1 à l'EN 18, les feuilles du bas (jusqu'à l'EN 18) étant à l'obscurité et ne transpirant pas. Au-delà, le flux commence à diminuer en montant dans les étages foliaires et tendre vers 0 à partir de l'EN 40. Le flux xylémien en bas de la tige est environ égal à $8,6 \text{ g.h}^{-1}$, soit plus de 17 fois plus faible qu'avec les conditions prévalant en serre.

Pour la simulation C-1-B3, les feuilles éclairées sont les feuilles 29 à 40, c'est-à-dire les feuilles placées en position apicale (EN 36 à EN 50), la surface foliaire totale éclairée est donc plus faible et la diminution du flux xylémien a lieu plus haut dans la plante car la totalité des feuilles en position basale (jusqu'à l'EN 36), placées à l'obscurité ne transpirent pas. En revanche nous pouvons observer que pour ces rangs où les feuilles ne sont pas éclairées, les flux diminuent tout de même légèrement : cette diminution correspond aux flux orientés pour la croissance des fruits. Le flux xylémien en bas de la tige est inférieur à $1,4 \text{ g.h}^{-1}$, il est donc plus de 100 fois plus faible que pour la simulation en conditions de serre et presque 6 fois plus faible que pour la simulation C-1-B0. Cette réduction du flux simulée est associée à la réduction de la surface foliaire éclairée dans ces deux conditions.

Pour la simulation C-1-B5, c'est-à-dire lorsque seules les feuilles placées en situation basale sont éclairées (EN de 1 à 14), le flux xylémien est légèrement supérieur à celui simulé pour C-1-B0. Ceci s'explique par le fait que dans cette simulation, les feuilles éclairées sont les feuilles basales, qui ont une grande surface foliaire. Au-dessus de la feuille 13, les feuilles ne transpirent plus et le flux est proche de 0, mais pas tout à fait encore car il reste les flux liés à la croissance des fruits.

Pour la plante WD-1 les mêmes phénomènes sont observés pour les trois simulations IRM avec simplement un décalage au niveau des EN, les rangs foliaires éclairés étant différents (Tableau 4.1) mais aussi des valeurs de flux plus faibles, car comme déjà évoqué, la surface foliaire éclairée est plus faible. Pour la simulation B3, aucune feuille n'est éclairée, les flux simulés sont donc uniquement dus à la croissance des fruits.

- Comparaison des flux simulés avec les flux mesurés par IRM

Si nous comparons les flux xylémiens simulés avec les conductivités théoriques actives aux flux xylémiens mesurés par IRM, dans le cas de C-1-B0, le flux simulé à l'EN3, qui est l'EN où le flux est mesuré par l'IRM (Tableaux 4.1 et 4.2), est égal à $8,57 \text{ g.h}^{-1}$ alors que le flux mesuré par IRM est de $1,393 \text{ g.h}^{-1}$ (Tableau 4.2). Le flux simulé est donc plus de 6 fois plus fort que le flux mesuré. Pour C-1-B3, l'EN d'intérêt est l'EN 19, le flux simulé est égal à $1,28 \text{ g.h}^{-1}$ et celui mesuré en IRM est de $1,217 \text{ g.h}^{-1}$, ce qui est relativement proche. Dans le cas de C-1-B5, l'EN d'intérêt est l'EN 26, le flux simulé est égal à $0,15 \text{ g.h}^{-1}$ alors que celui mesuré en IRM est plus de deux fois plus élevé : il est égal à $0,36 \text{ g.h}^{-1}$. Toutes ces valeurs sont reportées dans la table 4.2.

Dans l'ensemble, il semblerait que le modèle surestime le flux mesuré par IRM en bas de la tige; en revanche, plus on se dirige vers le haut de la tige plus les valeurs de flux mesurées en IRM et les valeurs simulées sont proches, avec une légère sous estimation du modèle dans le cas de C-1-B5. Pour la plante WD-1, on observe également une surestimation du flux prédit par le modèle en bas

| Code manip | Nombre feuilles éclairées | Numéro feuilles éclairées | Rangs feuilles éclairées | SF éclairée (m ²) | Flux transpiratoire e à l'échelle de la plante (g.h ⁻¹) | Flux mesuré à l'IRM (g.h ⁻¹) | Flux xylémiens simulés au niveau des entrenoeuds (g.h ⁻¹) | | | | Flux xylémiens simulés à l'entrée des bouquets (g.h ⁻¹) | | | |
|------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|---|--|---|------------------|------------------------|-------------------------|---|------------------|------------------------|-------------------------|
| | | | | | | | Cond théo totale | Cond théo active | -50 % cond théo active | +350 % cond théo active | Cond théo totale | Cond théo active | -50 % cond théo active | +350 % cond théo active |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| C-1-serre | 40 | F1-F40 | EN1-EN50 | 0,472 | 76,464 | X | 35,67 | 35,15 | 32,08 | 35,70 | 0,045 | 0,044 | 0,041 | 0,046 |
| | | | | | | | 64,24 | 63,82 | 60,53 | 64,31 | 0,074 | 0,072 | 0,069 | 0,075 |
| | | | | | | | 148,35 | 148,20 | 144,60 | 148,53 | X | X | X | X |
| C-1-B5 | 13 | F1-F13 | EN1-EN14 | 0,186 | 12,05 | X | 0,15 | 0,14 | 0,14 | 0,15 | 0,078 | 0,076 | 0,074 | 0,078 |
| | | | | | | | 0,40 | 0,40 | 0,39 | 0,40 | 0,117 | 0,115 | 0,117 | 0,117 |
| | | | | | | | 8,97 | 8,96 | 8,95 | 8,97 | X | X | X | X |
| C-1-B3 | 13 | F1-F13 | EN1-EN14 | 0,054 | 3,5 | X | 1,02 | 1,02 | 1,01 | 1,02 | 0,078 | 0,076 | 0,074 | 0,078 |
| | | | | | | | 1,28 | 1,27 | 1,26 | 1,28 | 0,117 | 0,115 | 0,112 | 0,117 |
| | | | | | | | 1,38 | 1,37 | 1,36 | 1,38 | X | X | X | X |
| C-1-B0 | 13 | F1-F13 | EN1-EN14 | 0,251 | 16,26 | X | 4,02 | 4,02 | 4,01 | 4,02 | 0,078 | 0,075 | 0,073 | 0,078 |
| | | | | | | | 7,70 | 7,69 | 7,67 | 7,70 | 0,117 | 0,114 | 0,111 | 0,117 |
| | | | | | | | 8,59 | 8,57 | 8,56 | 8,58 | X | X | X | X |
| WD-1-serre | 32 | F1-F32 | EN1-EN40 | 0,298 | 48,276 | X | 7,38 | 4,72 | 2,65 | 7,28 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | 32,04 | 28,58 | 21,29 | 32,05 | 0,019 | 0,022 | 0,025 | 0,020 |
| | | | | | | | 121,60 | 118,75 | 106,45 | 122,00 | X | X | X | X |
| WD-1-B5 | 13 | F1-F13 | EN1-EN14 | 0,162 | 10,5 | X | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | 0,07 | 0,08 | 0,10 | 0,07 | 0,031 | 0,041 | 0,05 | 0,033 |
| | | | | | | | 5,74 | 5,78 | 5,82 | 5,74 | X | X | X | X |
| WD-1-B3 | 13 | F1-F13 | EN1-EN14 | 0 | 0 | X | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | 0,08 | 0,11 | 0,11 | 0,09 | 0,039 | 0,058 | 0,057 | 0,042 |
| | | | | | | | 0,28 | 0,37 | 0,36 | 0,29 | X | X | X | X |
| WD-1-B0 | 13 | F1-F13 | EN1-EN14 | 0,066 | 4,28 | X | 0,055 | 0,055 | 0,54 | 0,55 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | | 1,43 | 1,46 | 1,46 | 1,43 | 0,038 | 0,055 | 0,057 | 0,039 |
| | | | | | | | 1,63 | 1,70 | 1,71 | 1,63 | X | X | X | X |

Tableau 4.2 : Flux xylémiens simulés (g.h⁻¹) au niveau des entrenoeuds et à l'entrée des bouquets pour 3 entrenoeuds d'intérêts, selon l'hypothèse de conductivité théorique. SF = surface foliaire. Cond = conductivité. EN = entrenoeuds.

de la tige principale; en revanche, pour le niveau B3 (EN 19) et B5 (EN 26) les flux simulés par le modèle sont plus faibles que ceux mesurés en IRM.

- Les flux xylémiens à l'entrée des bouquets (Figure 4.5)

Les flux dirigés vers les fruits dépendent du gradient de potentiel hydrique entre le point d'insertion du fruit et le fruit. Les flux xylémiens simulés à l'entrée des bouquets semblent plus sensibles à la conductivité que les flux simulés au niveau de la tige, en particulier pour les simulations de la plante WD-1, pour laquelle les flux simulés à partir de la conductivité théorique totale sont plus faibles qu'avec la conductivité théorique active.

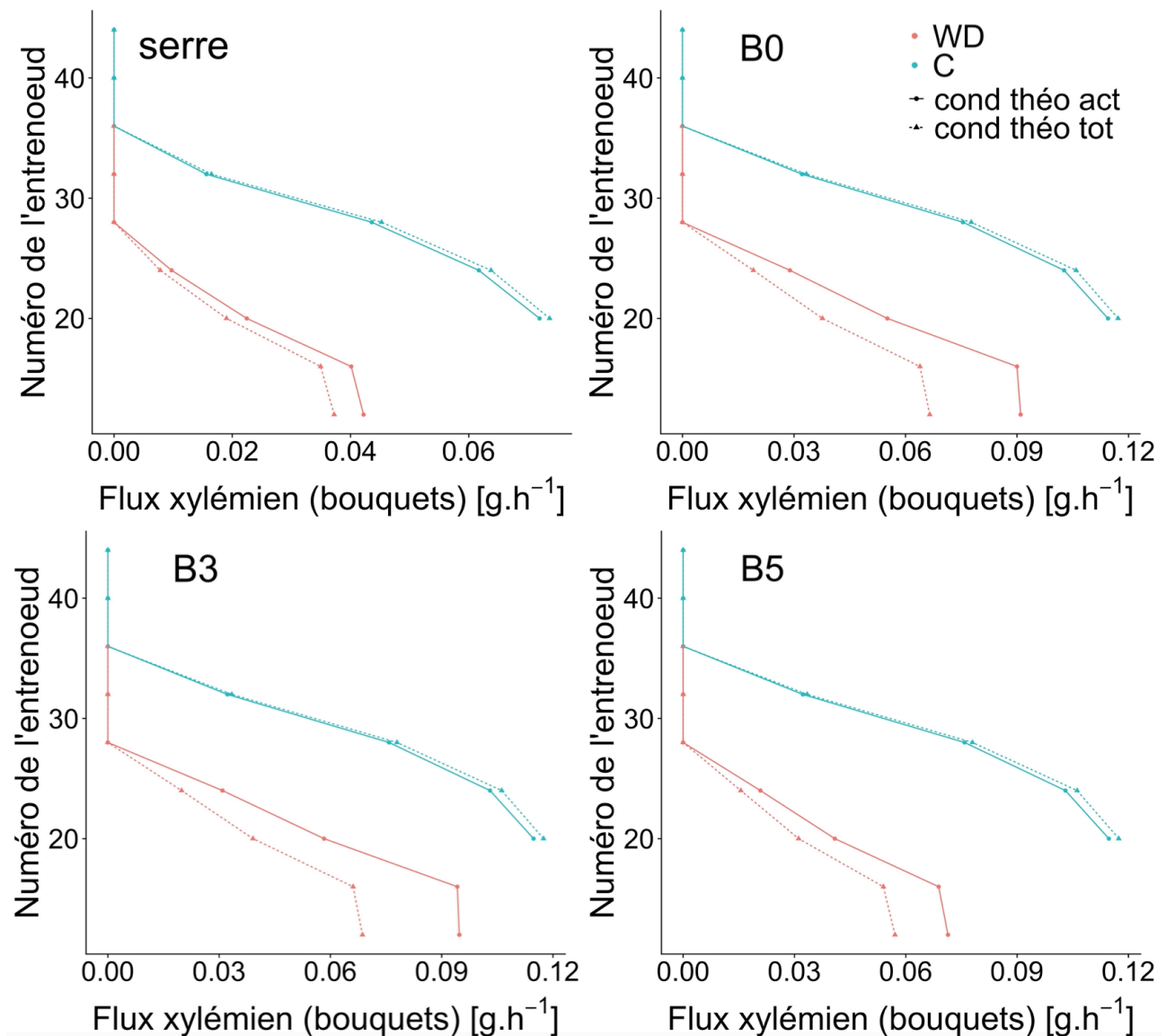


Figure 4.5 : Flux xylémiens simulés à l'entrée du bouquet ($g \cdot h^{-1}$) selon le rang de l'entreoeud qui porte le bouquet, pour les quatre situations différentes : simulations dans les conditions de la serre (serre), simulations dans les conditions de l'IRM lorsque le bas de la tige est dans l'IRM (B0), lorsque le milieu de la tige est dans l'IRM (B3) et lorsque le haut de la tige est dans l'IRM (B5) et pour les deux plantes (C-1 en bleu et WD-1 en rouge). Les triangles reliés par un trait pointillé représentent les simulations réalisées avec les conductivités théoriques totales (cond théo tot) et les ronds reliés par un trait plein représentent les simulations réalisées avec les conductivités théoriques actives (cond théo act).

Dans les quatre situations et pour les deux plantes, le flux diminue lorsqu'on se dirige vers les bouquets les plus jeunes, avec des flux nuls pour les trois derniers bouquets, dont les fruits sont très jeunes et petits. Pour la plante C-1, à l'entrée du bouquet le plus âgé (EN 20), là où les flux simulés sont les plus élevés, le flux est environ égal à 0,07 g.h⁻¹ pour la serre et 0,12 g.h⁻¹ dans le cas des simulations IRM, soit 1,7 fois plus élevé. Dans les conditions de l'IRM, la demande transpiratoire est faible. La chute de potentiel hydrique est donc moins marquée en conditions IRM. Ce statut hydrique plus favorable de la plante a pour conséquence des gradients de potentiels hydriques plus marqués entre le pédicelle et le fruit, ce qui entraîne un flux xylémien plus important vers les fruits qu'en conditions de serre. Ce phénomène s'observe également chez la plante WD-1, entre la situation serre et IRM.

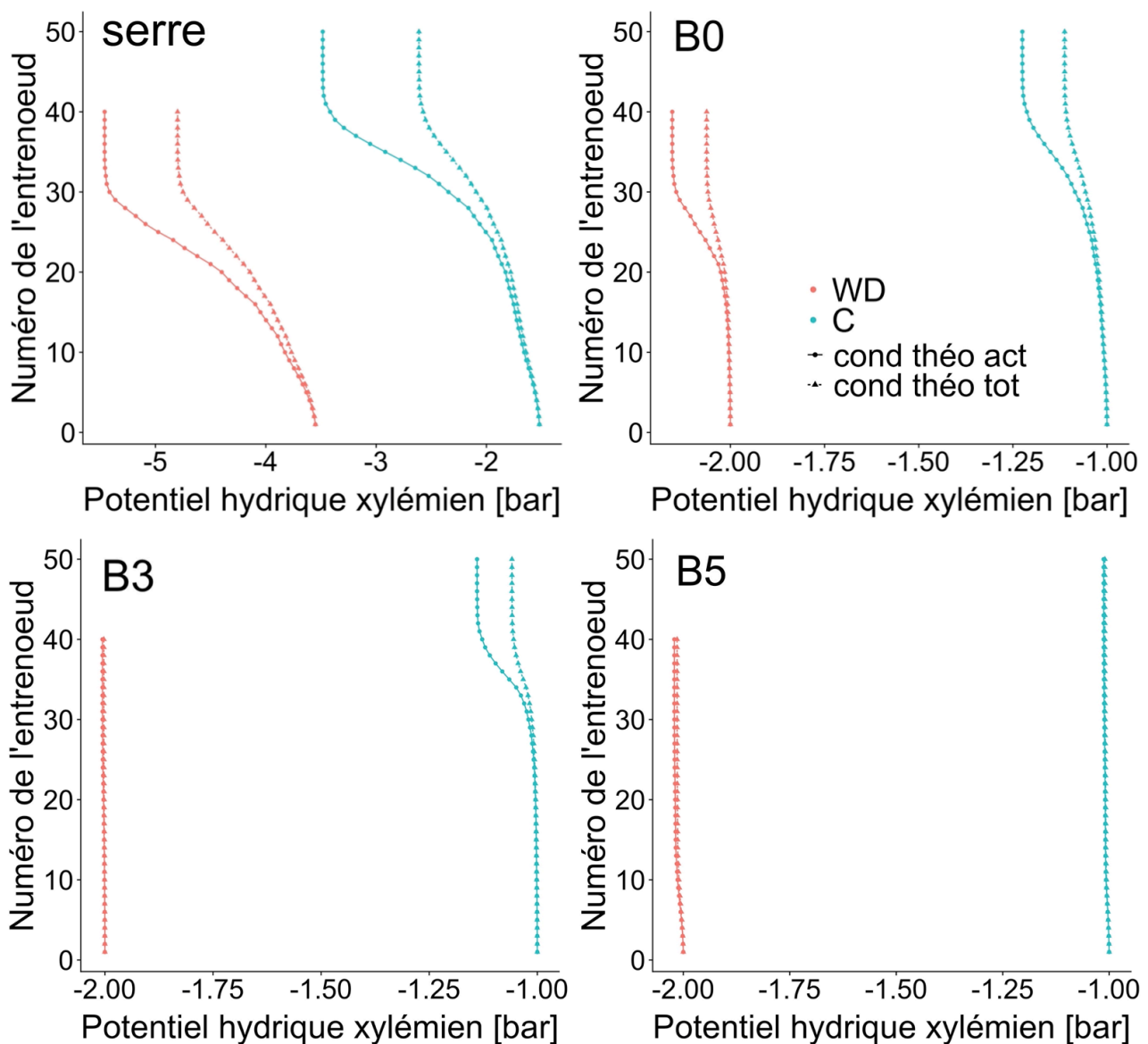


Figure 4.6 : Potentiels hydriques xylémiens simulés à l'échelle de la tige (bar) selon le rang de l'entre-noeud, pour les quatre situations différentes : simulations dans les conditions de la serre (serre), simulations dans les conditions de l'IRM lorsque le bas de la tige est dans l'IRM (B0), lorsque le milieu de la tige est dans l'IRM (B3) et lorsque le haut de la tige est dans l'IRM (B5) et pour les deux plantes (C-1 en bleu et WD-1 en rouge). Les triangles reliés par un trait pointillé représentent les simulations réalisées avec les conductivités théoriques totales (cond théo tot) et les ronds reliés par un trait plein représentent les simulations réalisées avec les conductivités théoriques actives (cond théo act).

- Simulation du potentiel hydrique le long de la tige (Figure 4.6)

Le potentiel hydrique de la tige dépend à la fois des flux transpiratoires des feuilles, des flux vers les fruits et de la conductivité hydraulique qui varie avec le diamètre de la tige.

Pour les quatre simulations, les potentiels hydriques xylémiens simulés en bas de la tige (EN1) sont très proches, que la conductivité soit estimée à partir de la conductivité théorique totale ou de la conductivité théorique active. Ces valeurs sont égales à -1 bar pour les trois simulations dans les conditions de l'IRM pour la plante C-1 et à -2 bar pour la plante WD-1. La demande transpiratoire étant très faible, le potentiel hydrique est très proche du potentiel hydrique au collet. En serre, la demande transpiratoire est plus forte, le potentiel hydrique varie légèrement autour de -1,5 bar pour la plante C-1 et -3,5 bar pour la plante WD-1. Plus on se dirige vers le haut de la tige, plus l'écart se creuse entre les potentiels hydriques simulés suivant les paramètres de conductivités utilisés (théoriques ou actives). L'entre-nœud à partir duquel les différences de potentiel hydrique se creusent est variable en fonction des simulations. En effet, l'intensité des flux xylémiens et leurs distributions dans la plante varient avec le rang des feuilles éclairées, avec des conséquences sur la distribution du potentiel hydrique et ses ordres de grandeurs.

Entre les 3 simulations dans les conditions de l'IRM et suivant l'hypothèse de conductivité considérée, les gradients de potentiel hydrique sont également impactés, quelle que soient les conditions de rayonnement imposées. Cet impact sur l'arbre des potentiels hydriques dans la plante, en modifiant les gradients de potentiel pédicelle-fruit, va également impacter la croissance des fruits. Ce sont pour les simulations C-1-B0 que la diminution de potentiel est la plus forte entre le bas et le haut de la plante, associée à la fois à une grande surface foliaire éclairée et une réduction progressive du diamètre de la tige.

- Le potentiel hydrique au point d'insertion des fruits (Figure 4.7)

Les potentiels hydriques à l'entrée des fruits suivent la même tendance que les potentiels hydriques des tiges. Sur la figure 4.7 nous nous concentrons sur un cas (C-1-B3) pour analyser les variations intra-bouquets des conditions au niveau du pédicelle des fruits, visibles par les différentes valeurs de potentiels à un même rang. Ces variations illustrent un gradient de potentiel hydrique entre les fruits proximaux et distaux, les fruits proximaux ayant un potentiel hydrique moins faible que les fruits distaux, qui se trouvent plus loin de la base du bouquet. Les diamètres des rachis du bouquet et du pédicelle entraînent des conductivités réduites ayant pour conséquence une variabilité des conditions au point d'insertion des fruits composants le bouquet.

c. Analyse de sensibilité du modèle vis à vis de la conductivité hydraulique

Dans cette partie nous avons analysé la sensibilité du modèle aux paramètres a et b (eq 4.3) qui relie la conductivité hydraulique au diamètre de l'axe. La gamme de variation du paramètre a , a été déterminée à partir de la variabilité génotypique des surfaces de tissus xylémien présentées dans le Chapitre II. Dans la gamme des génotypes étudiés, par rapport au génotype WVA106, les surfaces de tissus variaient de 0 à +332%. Nous supposons ici que la distribution des vaisseaux est la même selon les génotypes et nous faisons varier le paramètre a de +350% afin d'évaluer l'impact sur les distributions des flux et des potentiels hydriques simulés le long de la tige. Parmi les 11 génotypes étudiés, WVA106 était le génotype dont la surface de xylème était la plus faible et donc hypothétiquement le génotype avec la conductivité la plus faible. Nous avons également réalisé des simulations en réduisant le paramètre a de 50%, sachant que les calculs de conductivité théorique surestiment les valeurs réelles de conductivité hydraulique car elles négligent d'autres types de résistances, les vaisseaux xylémiens n'étant pas des capillaires parfaits, étant de dimensions finies et séparés par des ponctuations engendrant localement une forte augmentation de la résistance au flux d'eau dans la plante (Sperry et al., 2002 ; Tyree et Zimmermann 2002). Par

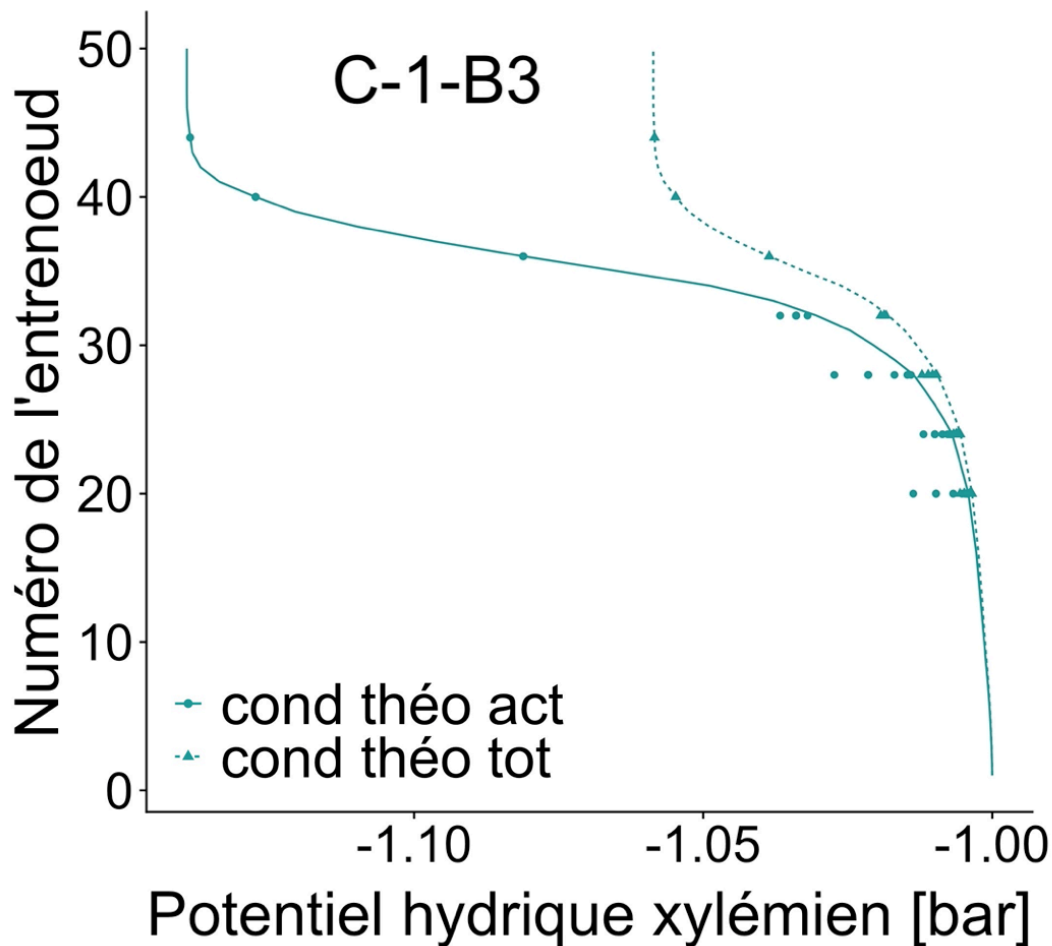


Figure 4.7 : Potentiels hydriques xylémiens simulés à l'échelle de la tige et aux points d'insertion des fruits (bar) selon le rang de l'entreoeud auquel le bouquet est attaché. Simulation lorsque le milieu de la tige est dans l'IRM (B3) pour la plante C-1. En trait pointillé et triangles bleus, représentent les simulations réalisées avec les conductivités théoriques totales (cond théo tot). En trait plein et ronds bleus, les simulations réalisées avec les conductivités théoriques actives (cond théo act). Les traits représentent les valeurs de potentiels hydriques au niveau des entreoeuds et les points représentent les potentiels hydriques aux points d'insertion des fruits.

ailleurs, les phénomènes d'embolie peuvent engendrer également une très forte réduction de la conductance xylémienne (Tyree et Sperry, 1989). La valeur de référence de conductivité utilisée ici est la conductivité théorique active. Or nous avons pu voir que pour un diamètre de 5 mm, la conductivité théorique active était égale à 47 % de la conductivité théorique totale. Dans ce cas, dans le cadre de l'analyse de sensibilité, la réduction de la conductivité théorique active de 50% revient à considérer une conductance hydraulique réduite de plus de 76% par rapport à la conductivité théorique totale. Pour un diamètre de 10 mm, la conductivité théorique active est égale à 75 % de la conductivité théorique totale. Donc pour les plus gros diamètres, la réduction appliquée à la conductivité théorique totale de 50% revient à réduire la conductivité théorique active de plus de 62 %.

- Les flux xylémiens dans la tige (Figure 4.8)

Les flux xylémiens simulés ne sont pas sensibles aux variations de la conductivité hydraulique. De fait, le flux transpiratoire n'est pas sensible aux variations de paramètre de conductance, même dans des cas où la transpiration est élevée comme en serre. Ceci s'explique par le fait que les

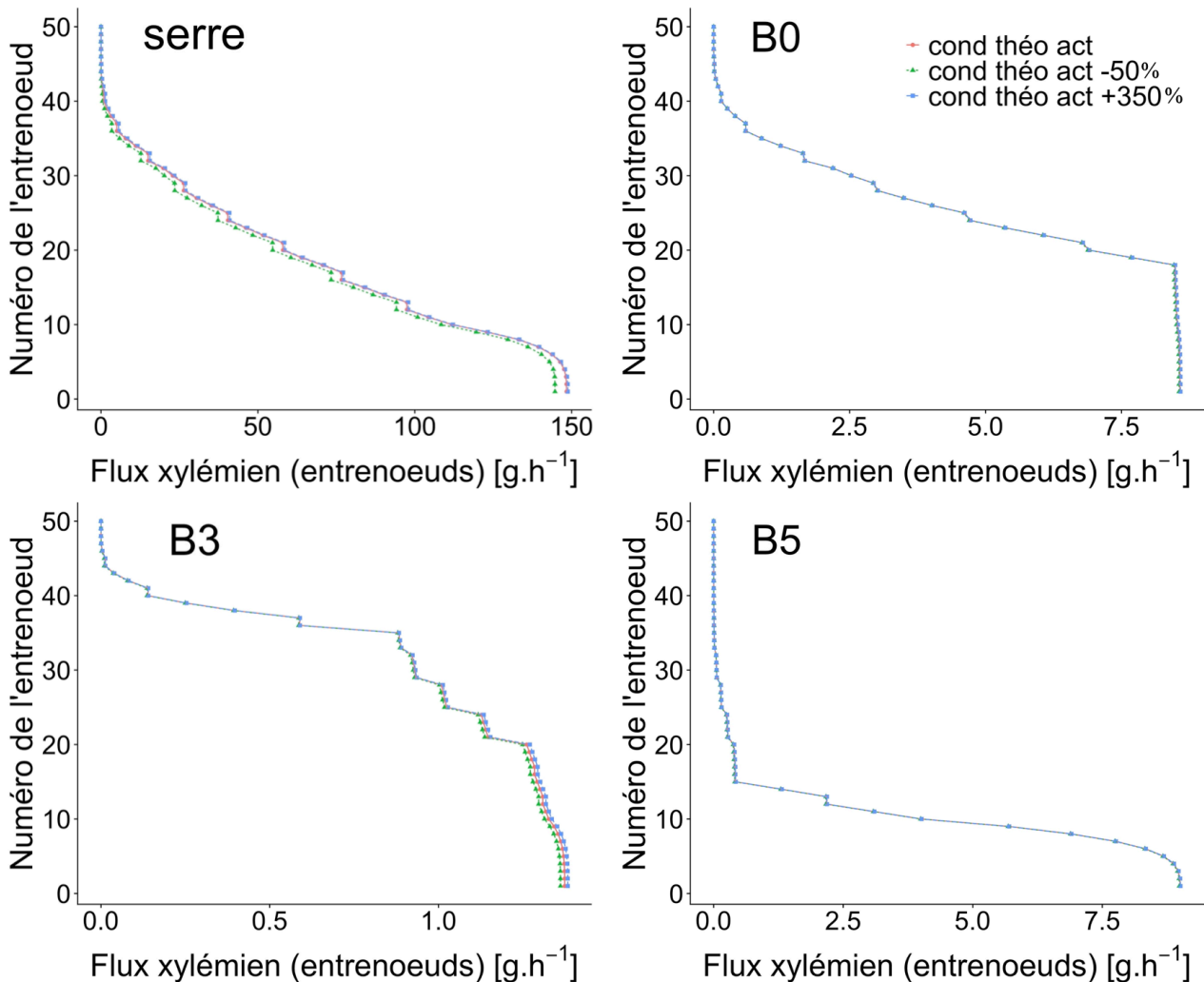


Figure 4.8 : Flux xylémiens simulés à l'échelle de la tige ($g.h^{-1}$) selon le rang de l'entre-noeud, pour les quatre simulations différentes : simulations dans les conditions de la serre (serre), simulations dans les conditions de l'IRM lorsque le bas de la tige est dans l'IRM (B0), lorsque le milieu de la tige est dans l'IRM (B3) et lorsque le haut de la tige est dans l'IRM (B5), pour la plante C-1. Les ronds reliés par un trait rouge représentent les simulations réalisées avec les conductivités théoriques actives (cond théo act), les triangles reliés par un trait vert représentent les simulations réalisées après avoir réduit les conductivités théoriques actives de 50% (cond théo act -50%) et les ronds reliés avec un trait bleu représentent les simulations réalisées après avoir augmenté les conductivité théoriques active de 350% (cond théo act +350%).

potentiels hydriques foliaires, même plus faibles ne sont pas assez bas pour entrainer une régulation stomatique.

- Les flux xylémiens à l'entrée des bouquets (Figure 4.9)

Nous n'observons pas de grosses différences du flux xylémien simulé à l'entrée du bouquet selon les paramètres utilisés pour estimer la conductivité hydraulique. Pour les quatre simulations, la réduction de la conductivité hydraulique se traduit par une très légère diminution du flux et a contrario l'augmentation de la conductivité se traduit par une très légère augmentation du flux.

Le calcul du flux xylémien à l'entrée du bouquet n'est donc pas très sensible à l'estimation des paramètres reliant le diamètre de la tige à la conductivité théorique.

- Le potentiel hydrique dans la tige (Figure 4.10)

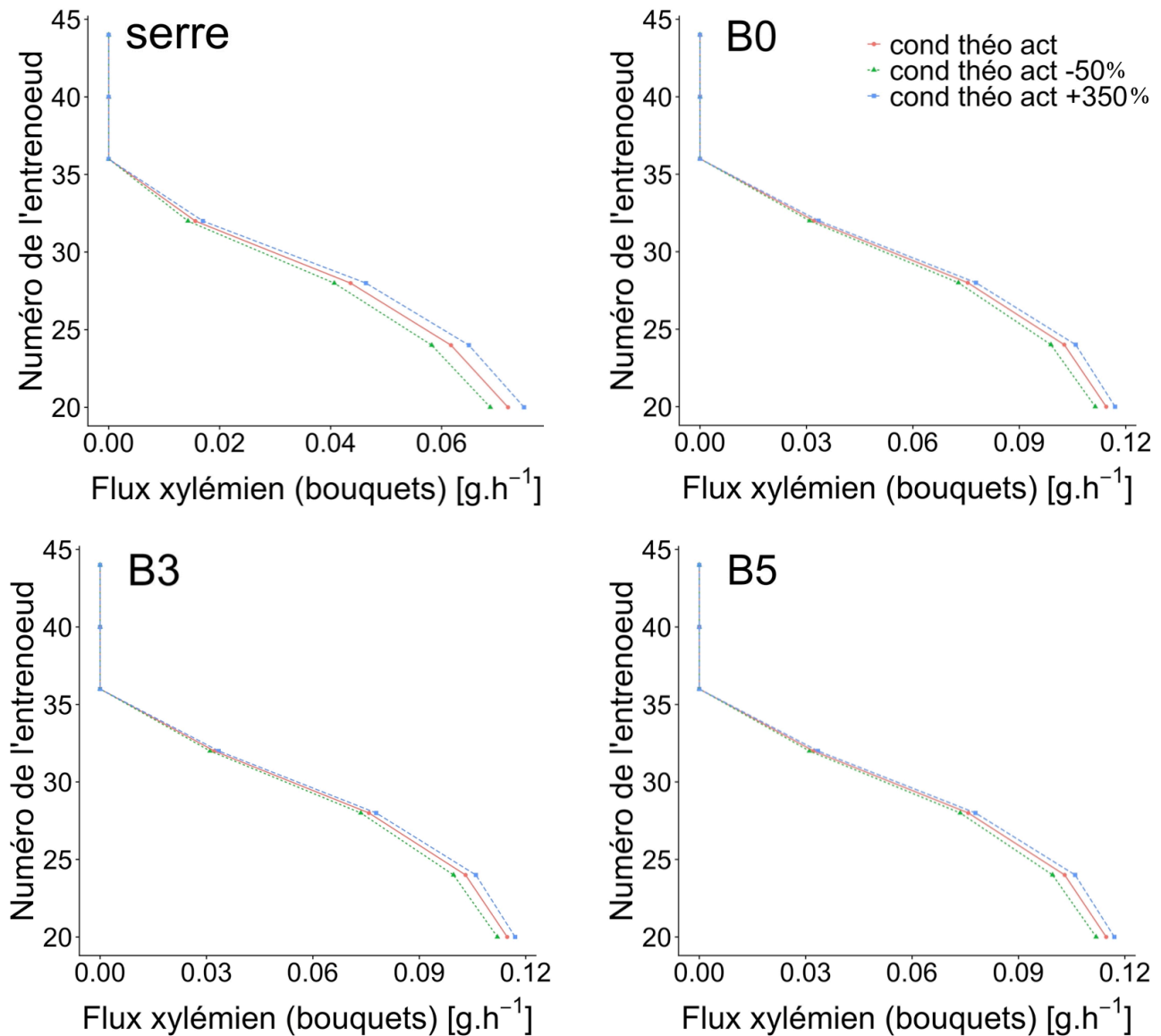


Figure 4.9 : Flux xylémiens simulés à l'entrée du bouquet ($g \cdot h^{-1}$) selon le rang de l'entrenoead, pour les quatre simulations différentes : simulations dans les conditions de la serre (serre), simulations dans les conditions de l'IRM lorsque le bas de la tige est dans l'IRM (B0), lorsque le milieu de la tige est dans l'IRM (B3) et lorsque le haut de la tige est dans l'IRM (B5), pour la plante C-1. Les ronds reliés par un trait rouge représentent les simulations réalisées avec les conductivités théoriques actives (cond théo act), les triangles reliés par un trait vert représentent les simulations réalisées après avoir réduit les conductivités théoriques actives de 50% (cond théo act -50%) et les ronds reliés avec un trait bleus représentent les simulations réalisées après avoir augmenté les conductivité théoriques active de 350% (cond théo act +350%).

Dans les quatre situations, les variations du paramètre a impliqué dans le calcul de la conductivité (équation 4.2) provoquent de fortes variations des potentiels hydriques simulés au niveau des EN et plus globalement dans la plante le long des bouquets. Pour la simulation C-1-serre, le potentiel hydrique en bas de la plante est le même dans les trois simulations : autour de -1 bar. La réduction du paramètre a de 50% entraîne une réduction identique de la conductivité hydraulique des différents axes. Comme les flux transpiratoires ne sont pas affectés (pas de régulation stomatique pour les potentiels hydriques foliaires atteints), les gradients de potentiels hydriques dans la plante doublent entraînant un potentiel hydrique minimal de l'ordre de -4,5 bars, soit une diminution de 1 bar. Dans le cas où la conductivité hydraulique est augmentée de 350%, la variation de potentiel

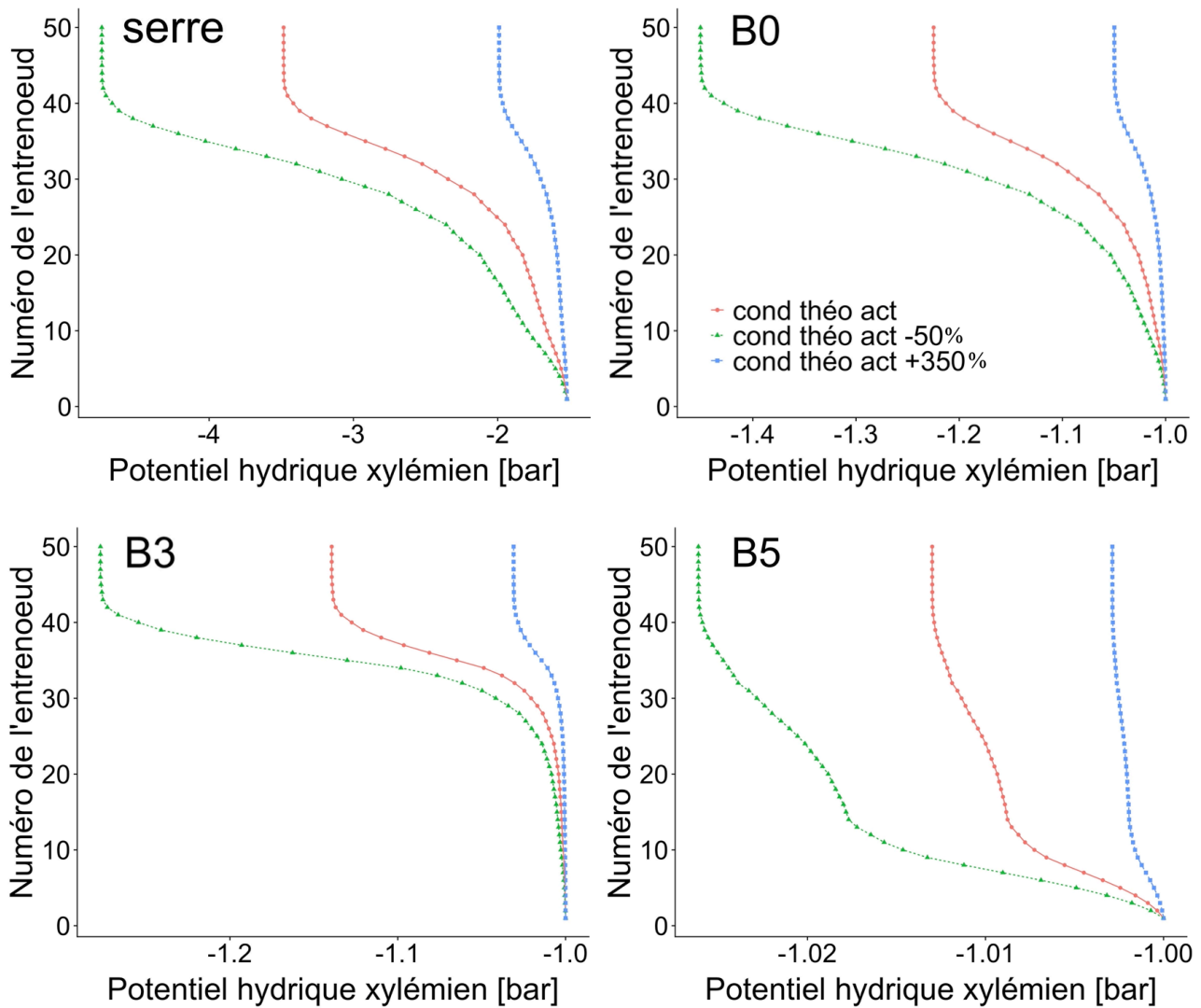


Figure 4.10 : Potentiels hydriques xylémiens simulés à l'échelle de la tige (bar) selon le rang de l'entrenoëud, pour les quatre simulations différentes : simulations dans les conditions de la serre (serre), simulations dans les conditions de l'IRM lorsque le bas de la tige est dans l'IRM (B0), lorsque le milieu de la tige est dans l'IRM (B3) et lorsque le haut de la tige est dans l'IRM (B5), pour la plante C-1. Les ronds reliés par un trait rouge représentent les simulations réalisées avec les conductivités théoriques actives (cond théo act), les triangles reliés par un trait vert représentent les simulations réalisées après avoir réduit les conductivités théoriques actives de 50% (cond théo act -50%) et les ronds reliés avec un trait bleus représentent les simulations réalisées après avoir augmenté la conductivité théorique active de 350% (cond théo act +350%).

hydrique entre le bas et le haut de la plante est beaucoup plus faible que pour la simulation de référence, les gradients de potentiel hydrique étant très fortement réduits.

Pour les simulations dans les conditions de l'IRM on observe la même tendance : une réduction de 50% du paramètre provoque une plus forte chute du potentiel hydrique lorsqu'on se dirige vers le haut de la plante, mais les gradients de potentiel hydrique sont beaucoup plus faibles, les flux transpiratoires étant faibles.

Pour C-1-B0 : entre le bas et le haut de la plante on observe une réduction légèrement supérieure à -0.1 bar alors que cette réduction est de -0.25 bar lorsque a est réduit de 50 % et cette réduction est

quasi nulle lorsque a est augmenté de 350%. Dans l'ensemble, le calcul du potentiel hydrique est donc sensible à l'estimation de la conductivité théorique.

- Le potentiel hydrique au point d'insertion des fruits (Figure 4.11)

Comme nous l'avons montré dans la partie précédente, les résistances xylémiennes sont les plus marquées à l'échelle du bouquet, entraînant des gradients plus marqués et une variabilité des potentiels hydriques au niveau du pédicelle du fruit selon la position du fruit le long du bouquet. Nous observons donc que le potentiel hydrique à l'entrée des fruits est très sensible aux hypothèses sur la conductivité hydraulique, avec des potentiels plus faibles lorsque la conductivité est réduite de 50%.

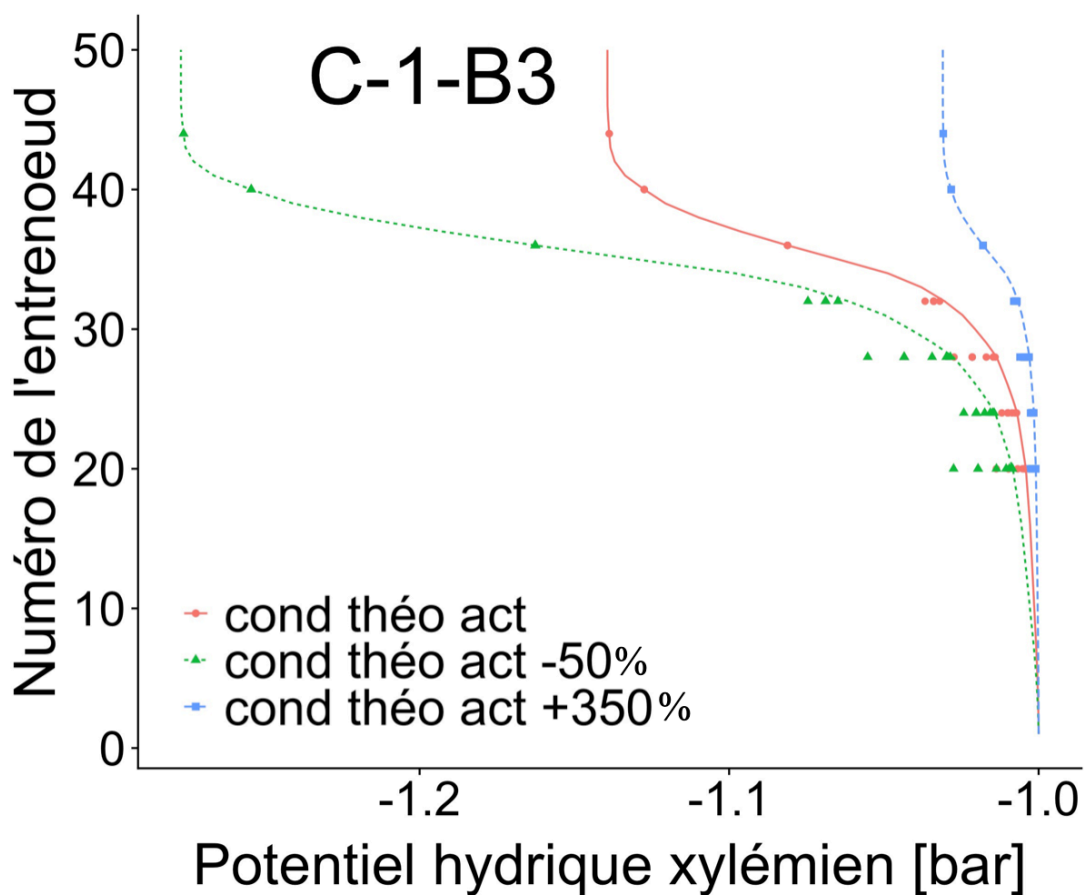


Figure 4.11 : Potentiels hydriques xylémiens simulés à l'échelle de la tige et aux points d'insertion des fruits (bar) selon le rang de l'entre-noeud. Simulation lorsque le milieu de la tige est dans l'IRM (B3) pour la plante C-1. En trait plein et ronds rouges, les simulations réalisées avec les conductivités théoriques actives (cond théo act). En trait pointillé et triangles verts, les simulations réalisées après avoir réduit les conductivités théoriques actives de 50% (cond théo act -50%). En trait tireté et ronds bleus, les simulations réalisées après avoir augmenté les conductivité théoriques active de 350% (cond théo act +350%). Les traits représentent les valeurs de potentiels hydriques au niveau des entre-noeuds et les points représentent les potentiels hydriques aux points d'insertion des fruits.

4. DISCUSSION

Dans ce chapitre nous avons commencé par paramétrer le modèle afin de pouvoir simuler l'architecture des plantes placées dans l'IRM et avoir une maquette de la plante. Les conditions environnementales (température, humidité et rayonnement) ont également été reproduites d'une part pour la serre et d'autre part pour mimer les conditions en IRM. Deux hypothèses de paramétrage de la conductivité hydraulique xylémienne ont été posées : la première en utilisant des données de conductivité théorique totale, estimée à partir de coupes histologiques et la seconde en utilisant les données de conductivité théorique active, en utilisant les acquisitions IRM discriminant les vaisseaux actifs (Figure 4.2). Des arbres des flux et de potentiels hydriques le long de l'architecture de la plante ont alors été simulés, suivant les conditions d'éclairage imposées.

Les simulations ont montré que quelque soit l'hypothèse sur la conductivité hydraulique (active ou totale), le flux transpiratoire des feuilles n'était pas modifié, en tout cas avec la distribution supposée des conductivités dans la plante et pour les conditions d'irrigation observées. Des déficits hydriques plus marqués, en réduisant la disponibilité en eau au niveau racinaire et en abaissant le potentiel hydrique au collet, auraient entraîné des variations fortes des flux transpiratoires, les potentiels hydriques foliaires atteints entraînant alors une forte régulation stomatique. Au niveau des fruits, les flux sont au contraire modifiés car ils dépendent du gradient de potentiel hydrique entre le point d'insertion du fruit et le fruit. L'arbre des potentiels hydriques est sensible aux hypothèses de conductivité, en particulier pour les axes où le diamètre est faible comme le long du bouquet et du pédicelle (Figure 4.5).

Des forts gradients de potentiels hydriques ont également été observés en fonction de la position dans la plante et en fonction du mode de calcul de la conductivité hydraulique. En effet, les potentiels hydriques dans la plante dépendent des flux transpiratoires des feuilles et des flux vers les fruits, mais aussi de la conductivité hydraulique et donc de l'hypothèse de calcul (active ou totale) et du diamètre qui varie le long de la tige de plus d'un ordre de grandeur.

Ici nous nous sommes concentrés sur les variations de flux et de potentiel hydrique, mais la conductivité a également un impact sur la pression de turgescence dans le phloème et donc sur la concentration en sucre dans le phloème car le flux de masse sera modifié. Ces modifications peuvent donc avoir des effets sur les entrées d'eau et de sucres dans les fruits.

Globalement nous avons pu voir que selon les rangs foliaires éclairés, les arbres des flux et des potentiels étaient différents. Dans l'optique de maximiser l'activité de la plante lors des acquisitions IRM, les résultats de ces simulations peuvent nous indiquer quelles feuilles éclairer préférentiellement pour maximiser le flux transpiratoire sans trop diminuer le potentiel hydrique afin de maximiser les flux d'eau vers les fruits.

Nous avons également pu voir que les flux simulés par le modèle et ceux mesurés en IRM étaient plutôt proches (même ordre de grandeur). Bien sur, la reproduction de nos conditions IRM n'était pas forcément parfaite, par exemple, lorsque nous faisons les mesures IRM, les plantes sont pré-adaptées aux conditions de faible luminosité pendant environ deux semaines avant l'acquisition, environnement que nous ne prenons pas en compte pour les simulations, puisque les conditions de l'IRM sont imposées dans le modèle seulement sur une période courte correspondant à la durée des mesures IRM. Nous ne connaissons pas non plus l'impact du stress mécanique que perçoivent les

plantes pendant l'installation dans l'IRM et qui peut entraîner des réactions de la plante, par exemple au niveau vasculaire des ruptures et/ou des phénomènes d'embolie.

Les données de conductivité théorique totale surestiment les valeurs de conductance, puisque seule une partie des vaisseaux participe aux flux dans les conditions de mesures IRM. Utiliser la conductivité théorique active semble donc plus adapté, même si cette conductivité estimée peut encore être très différente de la conductance vraie. Nos valeurs de conductivités sont du même ordre de grandeur que celles mesurées chez les arbres (Cruziat et al., 2002).

Vercambre et al (2002) a montré que pour les racines de pêcher, la conductivité axiale mesurée est 2 à 100 fois plus faible que la conductivité théorique estimée à partir de la relation de Hagen-Poiseuille. Ils montrent que pour des racines ayant un petit diamètre, la conductivité théorique est environ égale à deux fois la conductivité mesurée mais que pour des racines ligneuses ayant un plus gros diamètre, la différence est encore plus grande. Des études sur des segments de tiges ont également comparé les conductivités théoriques du xylème aux conductivités mesurées (Calkin et al, 1985 ; Gibson et al., 1985 ; Schulte et al, 1989 ; Hargrave et al., 1994 ; Martre et al., 2000 ; Martre et al., 2001 ; Santiago et al., 2004 ; Choat et al 2007). Ces auteurs ont montré que les valeurs de conductivité théorique et de conductivité réelle sont généralement corrélées mais que les valeurs de conductivité théorique surestiment la conductivité réelle, d'un facteur qui dépend de l'espèce considérée. Ceci peut s'expliquer par le fait que le calcul de la conductivité théorique considère que les capillaires sont de longueur infinie sans tenir compte des ponctuations qui, au niveau des jonctions des éléments de vaisseaux, augmentent la résistance au flux (Sperry et al., 2005 ; Wheeler et al., 2005 ; Hacke et al., 2006). De plus, la mesure du diamètre des vaisseaux n'est pas une mesure extrêmement précise et une légère surestimation du diamètre peut entraîner une grosse surestimation de la conductivité car elle dépend du diamètre à la puissance 4. Aussi, comme nous l'avons évoqué dans la discussion du chapitre 3, Bouda et al. (2020) ont mis en évidence que l'hétérogénéité du réseau de vaisseaux xylémiens donne lieu à des gradients de pression transverses qui redirigent les flux des vaisseaux les plus larges vers les vaisseaux les plus étroits, réduisant ainsi de 15% la contribution des gros vaisseaux aux flux.

Dans notre cas, nous avons pu voir que les différences entre la conductivité théorique totale (tous les vaisseaux du xylème) ou active (seulement les vaisseaux actifs) étaient plus importantes pour les petits diamètres de tige. En effet, pour un diamètre de 5 mm, la conductivité théorique active était égale à 47 % de la conductivité théorique totale alors que pour un diamètre de 10 mm la conductivité théorique active est égale à 75 % de la conductivité théorique totale.

Le pourcentage de vaisseaux actifs varie en fonction des conditions environnementales, la conductivité n'est donc pas uniquement liée au diamètre de la tige et nous pouvons nous demander si la relation utilisée dans le modèle est suffisante dans la mesure du diamètre de tige et la conductance active peuvent varier de manière non synchronisée au cours du développement de la plante et en fonction des conditions environnementales. Tout cela montre l'importance d'être capable de mesurer *in situ* les flux et les potentiels hydriques pour mieux estimer les conductivités hydrauliques dans la plante.

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse pluridisciplinaire, combinant écophysiologie végétale et techniques d'IRM avait pour but (i) d'explorer les techniques d'IRM pour mesurer les flux d'eau dans l'architecture de la plante de tomate, (ii) de coupler l'IRM à des approches histologiques afin d'évaluer les liens structure-fonction des tissus conducteurs et (iii) d'utiliser la modélisation comme outil d'intégration des connaissances acquises afin d'identifier des traits anatomiques et fonctionnels potentiellement impliqués dans la plasticité génétique et environnementale des déterminants des flux. Pour répondre à ces objectifs nous nous sommes concentrés sur quatre questions scientifiques. Cette partie discute les réponses que nous avons pu apporter ainsi que les perspectives ouvertes par les résultats.

• **La méthode « flip-flop » d'entrée de coupe permet-elle de quantifier des flux xylémiens et phloémiens dans l'architecture de la plante en croissance ?**

Dans le premier chapitre, nous avons présenté plusieurs méthodes IRM dont la méthode « flip-flop » (FF) (Buy et al., 2018, Simon et al. 2019 & 2019b), basée sur une technique IRM développée spécifiquement pour l'étude des plantes. Ces développements ont été principalement utilisés au cours de ce travail de thèse réalisé entre Montpellier et Avignon.

Le principe de cette méthode permet d'estimer une vitesse de flux à partir d'un signal RMN pondéré par le temps de relaxation longitudinal T_1 et la vitesse d'entrée d'un flux laminaire dans une sélection de coupe. Une validation méthodologique a été réalisée sur un « fantôme » micro-fluidique spécialement conçu montrant des canaux de micro-métries similaires aux dimensions des vaisseaux du xylème. Les vitesses et débits de l'eau circulant dans les canaux ont été mesurés par différentes méthodes. Les valeurs des débits massiques mesurés par une micro-balance, des débits imposés par le contrôleur micro-fluidique, des débits par IRM (FF) et contraste de phase ont permis de valider notre approche expérimentale.

La méthode d'entrée de coupe permet donc de quantifier de manière non destructive les flux xylémiens à l'échelle de la tige principale.

Sur la base de ces résultats, un protocole complet d'expérimentation a été construit ainsi que toute la chaîne de traitement des données. Ce travail a nécessité de nombreux aller/retour entre les observations IRM et les connaissances physiologiques de la plante. Plusieurs aspects expérimentaux comme l'observation fine des pédicelles n'ont pu être accomplis à cause des limitations liées à la technique IRM.

Dans ce manuscrit, nous avons fait le choix de nous focaliser sur les acquisitions IRM réalisées à différents niveaux dans l'architecture de la tige principale et en réponse au déficit hydrique. De nombreuses autres expérimentations ont été réalisées, certaines sur plusieurs jours permettant d'observer l'évolution des flux à un niveau donné dans la plante. L'ensemble de ces résultats expérimentaux est actuellement disponible et forme une base de données importante qui pourra être exploitée ultérieurement.

Dans toutes les expérimentations que nous avons réalisées au cours de la thèse, nous nous sommes focalisés sur les flux xylémiens et très ponctuellement sur les flux phloémiens. En effet, les flux phloémiens sont plus délicats à observer de par les vitesses et tissus concernés et de par des limitations expérimentales en IRM.

Nous nous sommes aussi appuyés sur plusieurs études récentes qui ont pu quantifier les flux xylémiens et phloémiens chez différentes espèces de plantes, dont la tomate (Windt et al., 2006; Windt et al., 2009; Prusova, 2016; Aliche et al., 2020). Dans nos études, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour expliquer pourquoi nous n'avons pas pu clairement identifier les flux phloémiens.

La première est que malgré une haute résolution ($39 \mu\text{m} \times 39 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$) au cours de nos expérimentations, quasiment aux limites des capacités des techniques IRM, celle-ci n'est pas suffisante pour mesurer des détails structurels des tissus phloémiens.

On notera que les études IRM citées plus haut, ont réussi cependant à quantifier des flux phloémiens, malgré des résolutions spatiales plus faibles. Cependant, ces travaux ne permettent pas de distinguer le flux vaisseau par vaisseau, mais mesurent plutôt un flux transporté par un amas de vaisseaux actifs. On peut donc se demander avec quelle précision le flux mesuré est réellement un flux phloémien étant donné la proximité des différents tissus.

Une deuxième hypothèse est que les flux phloémiens circulent trop lentement avec des vitesses jusqu'à 10 fois plus faibles que celle des flux xylémiens, rendant ainsi, l'observation des pondérations sur des images en entrée de coupes difficile en dessous d'un niveau de signal sur bruit exploitable.

Au cours de nos expérimentations, nous avons montré (voir chapitre I et III) que la méthode FF permettait d'observer avec précision des vitesses comprises entre $0,05 \text{ mm.s}^{-1}$ et 2 mm.s^{-1} . Chez la tomate, Prusova (2016) a mesuré des vitesses minimales de flux phloémien égales à $0,2 \pm 0,01 \text{ mm.s}^{-1}$, vitesses qui sont dans la gamme que nous sommes capables de quantifier avec notre méthode.

Une autre hypothèse, sur laquelle nous reviendrons plus loin dans la discussion, est que la plante est peu active dans notre configuration expérimentale de l'IRM et les flux phloémiens sont très probablement plus faibles que dans les études citées plus haut.

Enfin, notre méthode se base sur l'hypothèse d'un flux laminaire dans les vaisseaux conducteurs, hypothèse qui ne pose a priori pas de problème pour les vaisseaux du xylème. La sève élaborée est chargée en sucre ce qui augmente sa viscosité comparée à celle de la sève brute (Bussièrès et al., 2011). De ce fait, il est probable que l'hypothèse d'un flux laminaire ne s'applique pas avec une telle viscosité. De plus le transport de la sève phloémienne dépend de la longueur des éléments de tubes criblés (le temps de transport du saccharose à travers les tubes criblés est inversement proportionnel au carré de la longueur du tube) et la conductivité axiale du phloème est réduite de 85% par les cribles (Thompson et Holbrook, 2003a & 2003b).

Pour conclure, sans amélioration future de la méthode d'entrée de coupe, nous ne pourrions réellement observer ou quantifier les flux phloémiens. En revanche, dans notre protocole expérimental, après chaque expérimentation FF, nous avons réalisé des mesures de diffusion et nous envisageons d'explorer ce qui se passe dans le phloème, avec un a priori sur sa localisation dans la coupe. En effet sur certaines images, le phloème peut être observé en hyper signal, comme illustré sur la Figure 5.1. Ainsi, en segmentant ces tissus, il serait envisageable de mesurer les contrastes de phase ou bien la modification de la magnitude du signal qui pourraient être liés à un flux. Une fois la région segmentée, il serait également intéressant d'étudier les distributions du temps de relaxation transversal T_2 et d'effectuer une analyse multi composante sur la base des modifications par la concentration en carbone.

Il serait donc intéressant de faire ces mesures dans les tissus du xylème et du phloème et de les comparer à des valeurs calibrées, sur des solutions d'eau et de saccharose à différentes concentrations.

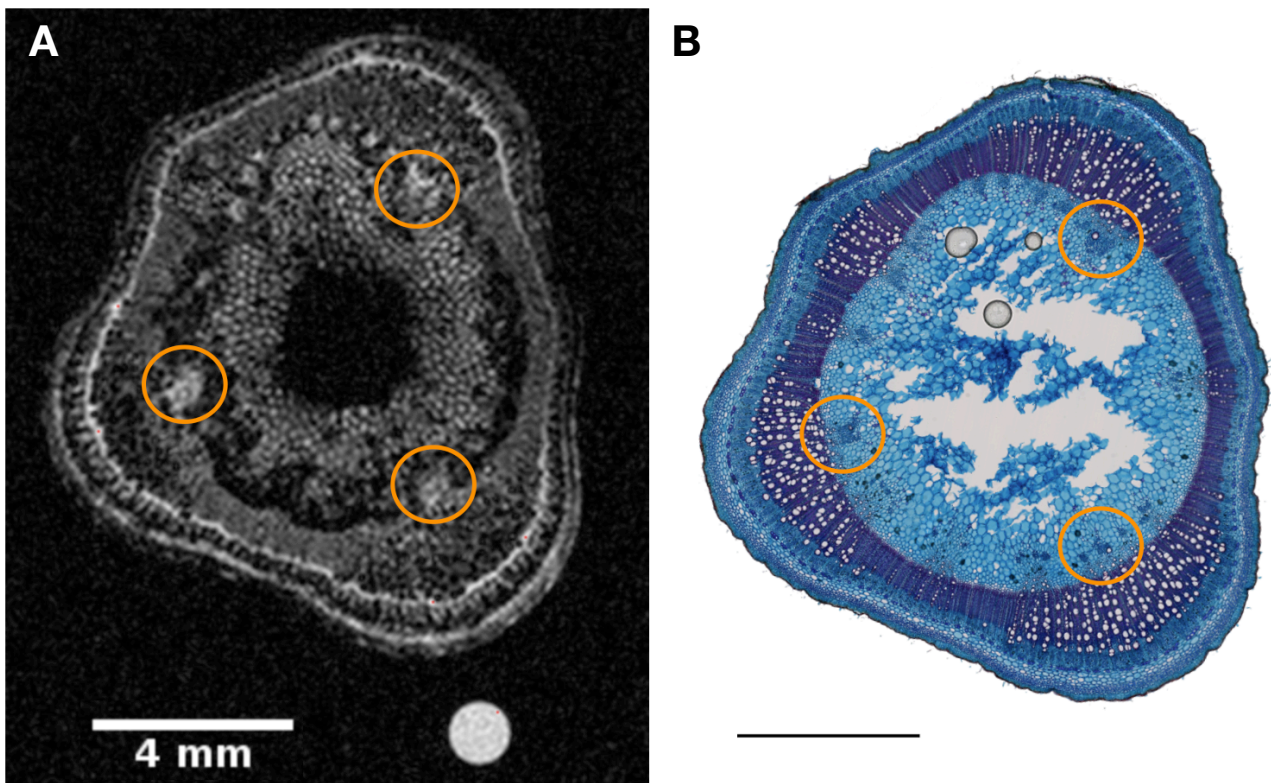


Figure 5.1 : (A) Image pondérée diffusion perpendiculaire au plan de coupe (BVALUE = 500) du bas de la tige d'une tomate WVA106. Résolution : 512 x 512. $T_R = 3000\text{ms}$ et $TE = 40\text{ms}$. Les ronds oranges entourent des tissus qui ressortent en hyper-signal. (B) Coupe histologique de la même coupe de tomate, colorée au FASGA. Epaisseur de coupe = 80 μm et barre d'échelle = 4 mm. Les ronds oranges sont placés au même endroit que pour (A) et mettent en évidence du phloème interne.

• **Quelle est la contribution aux variations de masse des fruits de la variabilité de surface des vaisseaux conducteurs liée au génotype et au déficit hydrique ?**

Dans le chapitre II, nous avons évalué l'implication de la variabilité génétique et environnementale des surfaces de tissus conducteurs du pédicelle dans les variations de masses fraîche et sèche du fruit. En effet ce trait avait été suggéré comme un trait d'adaptation possible au déficit hydrique chez la tomate (Constantinescu et al., 2016). Pour répondre à cet objectif nous avons couplé des approches histologiques et de modélisation, appliquées au pédicelle de la tomate, pour une large gamme de génotypes. Nous avons mis en évidence que les variations génotypiques et induites par le déficit hydrique de la surface des tissus conducteurs n'expliquaient que partiellement la variabilité de masse fraîche et de teneur en matière sèche des fruits. Ces résultats mettent en évidence une très grande variabilité des surfaces de tissus conducteurs qui n'avait jamais été caractérisée et qui covarie avec la masse des fruits. Ces surfaces pourraient ainsi être un trait de phénotypage intéressant pour la sélection même si son implication reste partielle.

Il est évident que l'étude anatomique de la surface des tissus conducteurs n'est pas suffisante pour comprendre tous les mécanismes d'accumulation de l'eau et du carbone dans le fruit. Il serait intéressant de compléter cette étude par une analyse des distributions des diamètres des vaisseaux conducteurs dans le pédicelle. En effet, chez la tomate, Rancic et al. (2008) ont mis en évidence qu'un déficit hydrique réduisait le diamètre des vaisseaux du xylème dans le pédicelle comme observé sur la tige d'autres espèces, comme la vigne (Lovisollo et Schubert, 1998), le maïs (Abdel-Rahim et al., 1998) et le peuplier (Arend et Fromm, 2007). De plus, cela nous permettrait de mieux caractériser la viabilité génotypique des diamètres de vaisseaux. La résolution des images de nos

coupes histologiques n'est pas suffisante pour mesurer précisément les diamètres des vaisseaux xylémiens dans le pédicelle (diamètre < 10 μm) et encore moins ceux des tubes criblés du phloème. Une solution aurait été de ré-analyser les coupes, en prenant cette fois-ci des photos au microscope à plus fort grossissement afin de pouvoir mesurer les diamètres des vaisseaux, mais cela est très chronophage et n'a pas pu être fait pendant la thèse.

Au-delà de la mesure des diamètres des vaisseaux, un point clef serait de mieux comprendre et caractériser la partie fonctionnelle des tissus conducteurs, comme par exemple la proportion de vaisseaux actifs en fonction des conditions environnementales, dans l'optique d'améliorer les modèles. Pour ce faire, une antenne dédiée au pédicelle ou pédoncule de tomate a été développée (Chapitre I) pour mesurer des flux à l'entrée du fruit, ou bien à l'entrée du bouquet, dans l'optique de confronter nos résultats à ceux de Windt et al. (2009) qui trouvent que la majorité des flux d'eau vers les fruits sont de type xylémien. Il serait également très intéressant d'utiliser une telle antenne pour mesurer les flux entrant et sortant des fruits avant et après la zone d'abscission pour évaluer le rôle de cette zone dans la résistance aux efflux d'eau en condition de stress hydrique (Van Ieperen et al., 2003). De nombreux tests ont été réalisés avec cette antenne, aussi bien sur plante entière que sur des bouquets détachés; nous avons réalisé des images anatomiques des pédoncules et pédicelles de tomate, mais nous n'avons pas réussi à mesurer de flux avec la méthode d'entrée de coupe. De la même manière que pour les flux phloémiens, les flux dans le pédicelle des fruits sont peut être beaucoup trop faibles pour que nous puissions les mesurer. Des mesures à l'échelle du pédoncule ont également été réalisées, mais aucun flux n'a pu être détecté. La résolution est sûrement le facteur limitant. En effet, les vaisseaux du xylème dans le pédoncule ont des diamètres de l'ordre de ceux des tubes criblés du phloème dans la tige principale. Il est également probable que les flux vers les fruits sont trop faibles dans les conditions de mesures de l'IRM puisque nous avons mesuré une croissance des fruits trois fois inférieure à celle mesurée en serre.

Une instrumentation dédiée pourra être développée dans le futur afin d'augmenter le rapport signal sur bruit et accéder ainsi à des données physiologiques au niveau de ces tissus. Ces données seraient très utiles pour mieux comprendre l'impact des facteurs environnementaux sur la croissance et la qualité des fruits et pour améliorer les modèles écophysologiques comme le Fruit Virtuel.

**• Comment et dans quelle gamme varient les flux xylémiens dans l'architecture de la plante ?
Et quels sont les déterminants de ces variations ?**

Afin d'étudier la variation des flux, nous avons appliqué la méthode FF à différents niveaux de la tige principale de tomate (Chapitre III). Les résultats ont mis en évidence que seule une partie des plus gros vaisseaux du xylème sont actifs et donc contribuent au flux mesuré. Nous avons observé une diminution significative du flux du bas vers le haut de la plante, liée essentiellement à une réduction de la surface active de transport et non à une vitesse plus faible du flux. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Prusova (2016), qui a montré que les flux augmentent avec l'intensité lumineuse, mais pas leur vitesse moyenne, suggérant que l'augmentation est bien liée à une augmentation de la surface active. Dans l'ensemble, les vitesses de flux xylémien étaient du même ordre de grandeur que les vitesses de flux phloémiens observés dans les autres études sur la tomate (Windt et al., 2006 ; Prusova 2016) et environ 10 fois plus faibles que les vitesses des flux xylémiens (Windt et al., 2006). Les surfaces actives que nous avons mesurées en bas de la tige sont du même ordre de grandeur que celles que Windt et al (2006) mesurent sur la tomate. Comme discuté dans le chapitre III, nous expliquons ces différences par les différences de conditions expérimentales. Alors que nous travaillons sur un aimant horizontal avec une faible intensité lumineuse, conditions dans lesquelles nous avons mis en évidence que la plante était en hypo-activité (Chapitre I), Windt et al (2006) travaillent avec un aimant vertical à une intensité lumineuse

comparable à la notre mais une T° supérieure. Il est intéressant de noter qu'entre leur étude et la notre, la différence de flux s'explique par une différence de vitesse et non pas par une différence de surface active, suggérant que la vitesse est sensible aux conditions environnementales. Cela est contraire à l'hypothèse de Prusova (2016) et aux résultats obtenus dans le chapitre III. Dans le chapitre I nous avons mis en évidence que pour une même intensité lumineuse, la plante transpire plus de deux fois moins dans les conditions de l'IRM horizontale qu'en serre. Cette différence pourrait justifier une partie du facteur 10 existant entre nos mesures et celles de Windt et al. (2006). En travaillant à l'échelle de la tige principale, la résolution des images de coupes histologiques était suffisamment bonne pour que nous puissions mesurer la distribution des diamètres des vaisseaux du xylème et ainsi estimer une conductivité théorique à partir de la relation de Hagen-Poiseuille (Calkin et al., 1985). La conductivité estimée en mesurant le diamètre de tous les vaisseaux du xylème, sans tenir compte de leur niveau de fonctionnalité, représente la conductivité théorique totale. La méthode d'entrée de coupe nous a permis d'identifier les vaisseaux actifs parmi les vaisseaux du xylème et ainsi, en ne considérant que ces vaisseaux, nous avons pu estimer une conductivité théorique active. Les valeurs de conductivité que nous avons mesurées sont du même ordre de grandeur que les conductivités mesurées dans les racines de maïs (Doussan et al., 1998), les racines et tiges de pêchers (Vercambre et al., 2002) et chez les arbres (Cruziat et al., 2002). Il existe très peu de données de conductivité sur les plantes annuelles telle que la tomate. Ces relations nous ont alors été utiles pour paramétrer le modèle structure-fonction PlaNet, utilisé dans le chapitre IV, en tenant compte de la relation entre cette conductivité et le diamètre de l'axe.

Il serait également intéressant d'étudier la variabilité génotypique des flux dans l'architecture de la tomate. Dans cette thèse, toutes les expérimentations IRM ont été réalisées sur le génotype de type cerise WVA106 possédant des bouquets de petite taille pouvant rentrer aisément dans le tunnel de l'IRM. Pour parvenir à travailler sur une gamme plus large de génotype, comme celle étudiée dans le chapitre II, avec des fruits plus gros, il faudrait alors retirer les bouquets qui peuvent gêner pour l'installation dans l'IRM, ce qui rendrait la méthode destructive, ou alors prévoir en amont de tailler les bouquets à 3 fruits par exemple. Les autres études IRM telles que celle de Windt et al (2009) ont procédé à des effeuillages ou à des ablations de bouquets en prévision des expérimentations pour ne pas stresser la plante juste avant les acquisitions. Un tel protocole est à réfléchir à l'avenir pour étudier la variabilité génétique des flux xylémiens, à différents niveaux dans l'architecture de la plante.

• Quel est l'impact du déficit hydrique sur les flux dans l'architecture de la tomate ?

Dans le chapitre III, nous avons observé que le déficit hydrique provoquait une réduction de la surface de xylème secondaire, du nombre total de vaisseaux, de leur diamètre moyen et donc de la conductivité théorique totale en haut de la tige principale. L'absence d'effet en bas de la tige s'explique par le fait que le déficit n'a été appliqué qu'après l'apparition du premier bouquet. En revanche, au niveau fonctionnel, c'est-à-dire en termes de nombre de vaisseaux actifs, de leur surface et de leur diamètre mais aussi en termes de conductivité théorique active et de flux xylémiens, nous n'avons pas observé d'effet du déficit hydrique, même si une tendance à la diminution semblait se dessiner, ce qui serait en accord avec les observations d'Aliche et al. (2020) notamment pour les flux xylémiens. Pour la partie fonctionnelle, deux plantes ayant subi un déficit hydrique ont été étudiées et il serait nécessaire d'augmenter le nombre de répétitions biologiques pour confirmer ces résultats.

Dans le chapitre IV nous avons mis en évidence que la relation entre la conductivité théorique (active ou totale) en fonction du diamètre de tige était la même pour les plantes témoins et pour les plantes ayant subi un déficit hydrique. Le modèle PlaNet était calibré pour la pêche à partir de

données issues de Vercambre et al. (2002) et nos données de conductivités nous ont permis de calibrer cette fonction chez la tomate. Comparées aux données mesurées sur tomate, les données du pêcher surestimaient la relation entre le diamètre de la tige et la conductivité. Ainsi, lorsque nous avons paramétré le modèle pour reproduire les conditions des expérimentations IRM, les différences entre la plante témoin et la plante stressée concernant l'arbre des potentiels hydriques et l'arbres des flux étaient uniquement dues à la surface foliaire éclairée qui était plus faible en conditions stressées, ce qui a induit une réduction de la demande transpiratoire et donc des flux associés à cette demande.

Il est important de rappeler que nos mesures de vitesse sont des valeurs de vitesse moyenne sur la section de tige obtenues sur 3h (durée du protocole FF). Dans l'optique d'étudier l'effet de l'environnement sur les flux et les vitesses de flux, il semblerait judicieux d'étudier les variations de vitesses à des pas de temps plus courts. Dans cette optique, de nouveaux développements numériques réalisés à la fin de la thèse permettent d'envisager cette possibilité. Il s'agirait de réaliser une première expérience d'entrée de coupe classique, à T_R variables (durée 3h) qui permettrait de choisir un $T_R \approx 800 \text{ ms}$ où la différence ΔS est maximale, puis de répéter ce T_R pour les expérimentations permettant ainsi d'estimer une vitesse toutes les 20 min. Une étude préliminaire de ce type a été réalisée sur une plante témoin WVA106, en bas de la tige principale. La plante est restée 11 jours dans l'IRM. L'expérimentation FF de 20 min suivie d'une expérimentation pondérée diffusion (1h) a été répétée tout au long de ces 11 jours. Les LED étaient allumées de 7h à 19h, ainsi nous avons pu étudier les cycles jour-nuit. Nous avons également appliqué des cycles de dessèchement et de ré-hydratation du sol. Les premiers résultats de cette expérimentation sont encourageants et présentés sur la figure 5.2, en termes de variations de surface de tige et de surface active. D'autres analyses sont à réaliser sur cette expérimentation, mais il est clair que la surface active (Figure 5.2 B) est très sensible non seulement au statut hydrique de la plante mais également aux cycles jour/nuit. Nous observons une diminution de la surface active la nuit, alors que la surface de la tige augmente légèrement, probablement lié à un stockage d'eau (Molz et Klepper, 1972). En situation de déficit hydrique extrême (juste avant l'irrigation), la surface active diminue fortement ainsi que la section de la tige qui s'est fortement contractée. L'estimation de la vitesse reste encore à faire afin de savoir si dans ces conditions on observe une variation de vitesse. Ce nouveau protocole permettra de mieux appréhender la réponse des flux xylémiens en termes de vitesse et de surface mobilisée en fonction des conditions environnementales. Ce type de mesure permettrait également de mieux exploiter les mesures faites traditionnellement avec des capteurs de diamètre de tige qui ne donnent qu'une information globale.

• **Conclusion et perspectives : conception d'un protocole « idéal »**

Pour conclure, ce travail de thèse a permis de mettre au point un protocole d'étude rigoureux pour étudier les flux xylémiens à différents niveaux dans l'architecture de la plante et en réponse au stress hydrique. Il a également apporté des éléments nouveaux sur la variabilité génétique des tissus conducteurs dans le pédicelle du fruit. Outre des résultats biologiques importants, de nombreuses idées d'amélioration ont vu le jour et devraient permettre à court terme de mesurer des flux phloémiens à l'échelle de la tige, ou des flux xylémiens et phloémiens à l'entrée des fruits ou des bouquets. Toutes ces données sont essentielles pour évaluer et faire évoluer les modèles écophysologiques, notamment ceux qui prédisent la croissance et la qualité des fruits.

Un scanner IRM vertical 3T sera bientôt opérationnel sur la plateforme d'imagerie BNIF de l'Université de Montpellier, qui permettra de lever un certain nombre de contraintes expérimentales rencontrées au cours de la thèse.

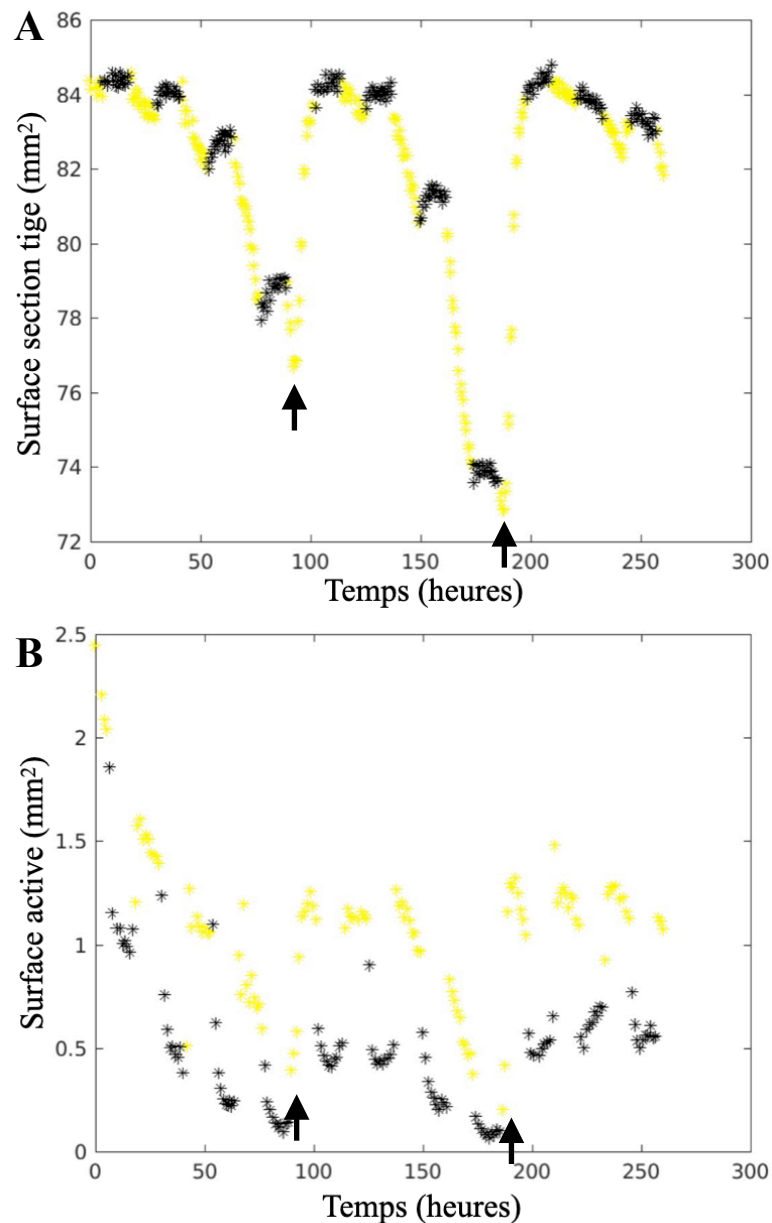


Figure 5.2 : Evolution de la surface de la section de la tige (mm^2) (A) et de la surface active (mm^2) (B) mesurée avec la méthode FF à T_R fixe en fonction du temps (h). Les points jaunes représentent les mesures la journée et les points noirs la mesure la nuit. Les flèches noires indiquent les irrigations.

Pour clôturer le manuscrit, je souhaitais proposer un protocole « idéal » dans le but de continuer à faire évoluer les méthodes IRM pour l'étude du fonctionnement des plantes. La figure 5.3 est une représentation schématique d'une future installation de la plante de tomate dans ce nouvel IRM vertical. Une caractérisation rigoureuse de l'environnement de l'enceinte climatique devra être faite, avec des capteurs de rayonnement à différentes hauteurs, des capteurs d'humidité, de température, éventuellement un capteur de diamètre de tige et surtout, un relevé précis des variations de poids de la plante pour mesurer sa transpiration. Des antennes spécifiques au champ de cet aimant devront être conçues, aussi bien pour réaliser des acquisitions IRM au niveau de la tige principale qu'au niveau du pédicelle. Enfin, le protocole d'estimation de la vitesse à T_R fixe pourrait être appliqué, afin d'étudier finement la réponse de la plante à des variations environnementales sur des pas de temps variables.

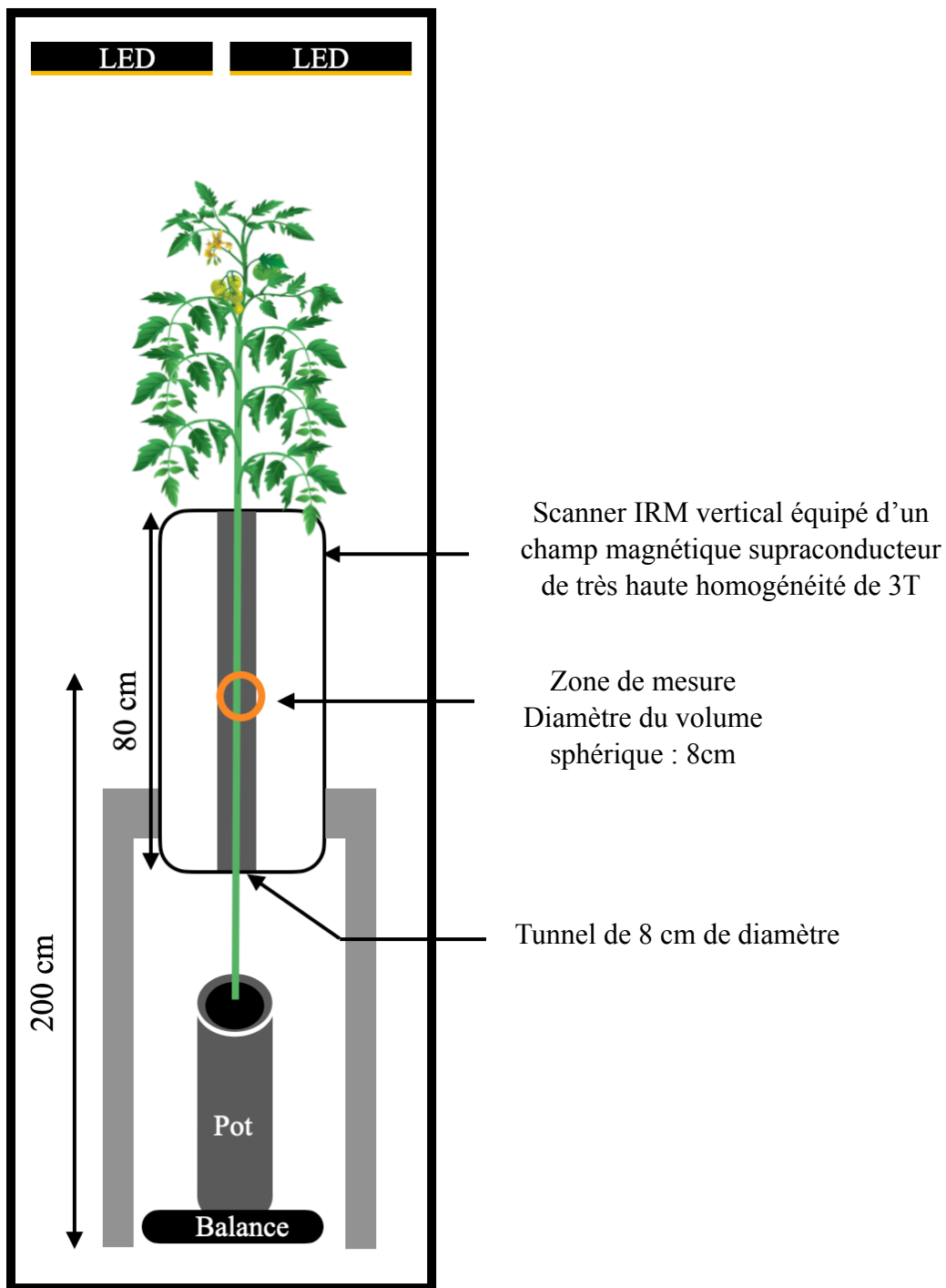


Figure 5.3 : Représentation schématique d'une future installation d'une plante de tomate dans l'IRM vertical 3T. Différents capteurs permettront de caractériser le rayonnement que perçoivent les plantes à différentes hauteurs, l'humidité relative et la température de l'enceinte climatique. Le poids de la plante sera enregistré sur une balance pour évaluer la transpiration de la plante et avoir une contre mesure des acquisition IRM, un capteur de variation de diamètre de tige pourra également être installé sur la bas de la tige. De nouvelles antennes clipsables seront développées pour étudier la tige principale, ainsi qu'une nouvelle antenne pédicelle pour mesurer les flux à l'entrée du fruit.

BIBLIOGRAPHIE

- Abd El-Rahim, M.F., Fahmy, G.M., Fahmy, Z.M., 1998. Alterations in transpiration and stem vascular tissues of two maize cultivars under conditions of water stress and late wilt disease. *Plant Pathology* 47, 216–223. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00211.x>
- Albert, E., Segura, V., Gricourt, J., Bonnefoi, J., Derivot, L., Causse, M., 2016. Association mapping reveals the genetic architecture of tomato response to water deficit: focus on major fruit quality traits. *Journal of Experimental Botany* 67, 6413–6430. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw411>
- Aliche, E.B., Prusova-Bourke, A., Ruiz-Sanchez, M., Oortwijn, M., Gerkema, E., Van As, H., Visser, R.G.F., van der Linden, C.G., 2020. Morphological and physiological responses of the potato stem transport tissues to dehydration stress. *Planta* 251, 45. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03336-7>
- André, J., Catesson, A., Liberman, M., 1999. Characters and origin of vessels with heterogenous structure in leaf and flower abscission zones. *Canadian Journal of Botany* 77, 253–261. <https://doi.org/10.1139/b98-213>
- Angeles, G., Bond, B., Boyer, J.S., Brodribb, T., Brooks, J.R., Burns, M.J., Cavender-Bares, J., Clearwater, M., Cochard, H., Comstock, J., others, 2004. The cohesion-tension theory. *New Phytologist* 163, 451–452. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01142.x>
- Arend, M., Fromm, J., 2007. Seasonal change in the drought response of wood cell development in poplar. *Tree Physiology* 27, 985–992. <https://doi.org/10.1093/treephys/27.7.985>
- Baldazzi, V., Pinet, A., Vercambre, G., Bénard, C., Biais, B., Génard, M., 2013. In-silico analysis of water and carbon relations under stress conditions. A multi-scale perspective centered on fruit. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00495>
- Bel, A.J.E.V., 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment* 26, 125–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00963.x>
- Belda, R.M., Ho, L.C., 1993. Salinity effects on the network of vascular bundles during tomato fruit development. *Journal of Horticultural Science* 68, 557–564. <https://doi.org/10.1080/00221589.1993.11516385>
- Bonnemain, J.-L., 1968. Transport du ¹⁴C assimilé chez les Solanacées. Librairie Générale de l'Enseignement.
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Neuberger, T., 2012. Surveying the plant's world by magnetic resonance imaging. *The Plant Journal* 70, 129–146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04927.x>
- Bouda, M., Windt, C.W., McElrone, A.J., Brodersen, C.R., 2019. In vivo pressure gradient heterogeneity increases flow contribution of small diameter vessels in grapevine. *Nature Communications* 10, 5645. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13673-6>
- Brown, R.W., Cheng, Y.-C.N., Haacke, E.M., Thompson, M.R., Venkatesan, R., 2014. *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design*. John Wiley & Sons.
- Bryant, D., Payne, J., Firmin, D.N., Longmore, D.B., 1984. Measurement of flow with NMR imaging using a gradient pulse and phase difference technique. *J Comput Assist Tomogr* 8, 588–593.
- Bussi eres, P., 2002. Water import in the young tomato fruit limited by pedicel resistance and calyx transpiration. *Functional Plant Biol.* 29, 631–641. <https://doi.org/10.1071/pp00144>

- Bussi eres, P., Bertin, N., Morris, C.E., Vigne, C., Orlando, P., Glaux, C., S evenier, V., Floret, H., Bernadac, J., Korownikoff, S., 2011. High external sucrose concentration inhibits the expansion of detached tomato fruits grown in a novel semi-open device. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 47, 743–751. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9378-z>
- Buy, S., Le Floch, S., Tang, N., Sidiboulouar, R., Zanca, M., Canadas, P., Nativel, E., Cardoso, M., Alibert, E., Dupont, G., Ambard, D., Maurel, C., Verdeil, J.-L., Bertin, N., Goze-Bac, C., Coillot, C., 2018. Flip-flop method: A new T1-weighted flow-MRI for plants studies. *PLoS ONE* 13, e0194845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194845>
- Calkin, H.W., Gibson, A.C., Nobel, P.S., 1985. Xylem water potentials and hydraulic conductances in eight species of ferns. *Canadian Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1139/b85-079>
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2003. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Functional Plant Biol.* 30, 239–264. <https://doi.org/10.1071/fp02076>
- Cheng, H.M., Koutsidis, G., Lodge, J.K., Ashor, A., Siervo, M., Lara, J., 2017. Tomato and lycopene supplementation and cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* 257, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.009>
- Choat, B., Sack, L., Holbrook, N.M., 2007. Diversity of hydraulic traits in nine *Cordia* species growing in tropical forests with contrasting precipitation. *New Phytologist* 175, 686–698. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02137.x>
- Cieslak, M., Cheddadi, I., Boudon, F., Baldazzi, V., G enard, M., Godin, C., Bertin, N., 2016. Integrating Physiology and Architecture in Models of Fruit Expansion. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01739>
- Cochard, H., 2006. Cavitation in trees. *Comptes Rendus Physique, Nucleation* 7, 1018–1026. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2006.10.012>
- Constantinescu, D., Memmah, M.-M., Vercambre, G., G enard, M., Baldazzi, V., Causse, M., Albert, E., Brunel, B., Valsesia, P., Bertin, N., 2016. Model-Assisted Estimation of the Genetic Variability in Physiological Parameters Related to Tomato Fruit Growth under Contrasted Water Conditions. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01841>
- Constantinescu, D., Vercambre, G., G enard, M., 2020. Model-assisted analysis of the peach pedicel–fruit system suggests regulation of sugar uptake and a water-saving strategy. *Journal of Experimental Botany* 71, 3463–3474. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa103>
- Cruiziat, P., Am eglio, T., Cochard, H., 2001. La cavitation: un m ecanisme perturbant la circulation de l’eau chez les v eg etaux. *M ecanique & Industries* 2, 289–298.
- Cruiziat, P., Cochard, H., Am eglio, T., 2002. Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Ann. For. Sci.* 59, 723–752. <https://doi.org/10.1051/forest:2002060>
- De Swaef, T., 2011. Measuring, modelling and understanding sap flow and stem diameter variations in tomato (dissertation). Ghent University.
- De Swaef, T., De Schepper, V., Vandegehuchte, M.W., Steppe, K., 2015. Stem diameter variations as a versatile research tool in ecophysiology. *Tree Physiology* 35, 1047–1061. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv080>
- De Swaef, T., Steppe, K., 2010. Linking stem diameter variations to sap flow, turgor and water potential in tomato. *Functional Plant Biol.* 37, 429–438. <https://doi.org/10.1071/FP09233>

- De Swaef, T., Steppe, K., Lemeur, R., 2009. Determining reference values for stem water potential and maximum daily trunk shrinkage in young apple trees based on plant responses to water deficit. *Agricultural Water Management* 96, 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2008.09.013>
- Deb, K., Pratap, A., Agarwal, S., Meyarivan, T., 2002. A fast and elitist multiobjective genetic algorithm: NSGA-II. *IEEE Transactions on Evolutionary Computation* 6, 182–197. <https://doi.org/10.1109/4235.996017>
- DeWitt, N.D., Sussman, M.R., 1995. Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H(+)-ATPase) in phloem companion cells. *The Plant Cell* 7, 2053–2067. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2053>
- Dixon, H.H., Joly, J., 1895. XII. On the ascent of sap. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (B.)* 186, 563–576. <https://doi.org/10.1098/rstb.1895.0012>
- Doussan, C., Pagès, L., Vercambre, G., 1998. Modelling of the Hydraulic Architecture of Root Systems: An Integrated Approach to Water Absorption—Model Description. *Annals of Botany* 81, 213–223. <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0540>
- Ehret, D.L., Ho, L.C., 1986. Translocation of Calcium in Relation to Tomato Fruit Growth. *Annals of Botany* 58, 679–688. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087230>
- Esau, K., 1977. *Anatomy of seed plants - 2. ed.* New York, N.Y. (USA) Wiley.
- Farquhar, G.D., von Caemmerer, S., Berry, J.A., 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* 149, 78–90. <https://doi.org/10.1007/BF00386231>
- Fiscus, E.L., 1975. The Interaction between Osmotic- and Pressure-induced Water Flow in Plant Roots. *Plant Physiology* 55, 917–922. <https://doi.org/10.1104/pp.55.5.917>
- Fishman, S., Génard, M., 1998. A biophysical model of fruit growth: simulation of seasonal and diurnal dynamics of mass. *Plant, Cell & Environment* 21, 739–752. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00322.x>
- Gallardo, M., Thompson, R., Valdez, L., Fernández, M., 2006. Use of stem diameter variations to detect plant water stress in tomato. *Irrigation Science* 24, 241–255. <https://doi.org/10.1007/s00271-005-0025-5>
- Génard, M., Bertin, N., Gautier, H., Lescourret, F., Quilot, B., 2010. Virtual profiling: a new way to analyse phenotypes. *The Plant Journal* 62, 344–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04152.x>
- Gibson, A.C., Calkin, H.W., Nobel, P.S., 1985. Hydraulic Conductance and Xylem Structure in Tracheid-Bearing Plants. *IAWA Journal* 6, 293–302. <https://doi.org/10.1163/22941932-90000957>
- Givnish, T.J., 1988. Adaptation to Sun and Shade: a Whole-Plant Perspective. *Functional Plant Biol.* 15, 63–92. <https://doi.org/10.1071/pp9880063>
- Grange, R.I., Andrews, J., 1995. Respiration and growth of tomato fruit. *Plant, Cell & Environment* 18, 925–930. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00602.x>
- Guichard, S., Bertin, N., Leonardi, C., Gary, C., 2001. Tomato fruit quality in relation to water and carbon fluxes. *Agronomie* 21, 385–392. <https://doi.org/10.1051/agro:2001131>
- Guichard, S., Gary, C., Leonardi, C., Bertin, N., 2005. Analysis of Growth and Water Relations of Tomato Fruits in Relation to Air Vapor Pressure Deficit and Plant Fruit Load. *J Plant Growth Regul* 24, 201–213. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0040-z>

- Hall, A.J., Minchin, P.E.H., Clearwater, M.J., Génard, M., 2013. A biophysical model of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) berry development. *Journal of Experimental Botany* 64, 5473–5483. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert317>
- Hanssens, J., De Swaef, T., Steppe, K., 2015. High light decreases xylem contribution to fruit growth in tomato: Light changes xylem contribution to fruit. *Plant Cell Environ* 38, 487–498. <https://doi.org/10.1111/pce.12411>
- Hargrave, K.R., Kolb, K.J., Ewers, F.W., Davis, S.D., 1994. Conduit diameter and drought-induced embolism in *Salvia mellifera* Greene (Labiatae). *New Phytologist* 126, 695–705. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02964.x>
- Herremans, E., Verboven, P., Hertog, M., Cantre, D., van Dael, M., De Schryver, T., Van Hoorebeke, L., Nicolai, B., 2015. Spatial development of transport structures in apple (*Malus × domestica* Borkh.) fruit. *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00679>
- Heuvelink, E., Buiskool, R.P.M., 1995. Influence of Sink-Source Interaction on Dry Matter Production in Tomato. *Annals of Botany* 75, 381–389. <https://doi.org/10.1006/anbo.1995.1036>
- Hinckley, T.M., Bruckerhoff, D.N., 2011. The effects of drought on water relations and stem shrinkage of *Quercus alba*. *Canadian Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1139/b75-009>
- Ho, L.C., 1996. The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. *Journal of Experimental Botany* 47, 1239–1243.
- Ho, L.C., Grange, R.I., Picken, A.J., 1987. An analysis of the accumulation of water and dry matter in tomato fruit. *Plant, Cell & Environment* 7. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11602110>
- Huang, B., Nobel, P.S., 1994. Root Hydraulic Conductivity and Its Components, with Emphasis on Desert Succulents. *Agronomy Journal* 86, 767–774. <https://doi.org/10.2134/agronj1994.00021962008600050005x>
- Hubeau, M., Steppe, K., 2015. Plant-PET Scans: In Vivo Mapping of Xylem and Phloem Functioning. *Trends in Plant Science* 20, 676–685. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.07.008>
- Huguet, J.G., Jaussely, B., Orlando, P., 1985. Appreciation de l'état hydrique d'une plante à partir des variations micrométriques de la dimension des fruits ou des tiges au cours de la journée. *Agronomie* 5, 733–741.
- Jarvis, P.G., Monteith, J.L., Weatherley, P.E., 1976. The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 273, 593–610. <https://doi.org/10.1098/rstb.1976.0035>
- Johnson, R.W., Dixon, M.A., Lee, D.R., 1992. Water relations of the tomato during fruit growth. *Plant, Cell & Environment* 15, 947–953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1992.tb01027.x>
- Jones, J.W., Dayan, E., Allen, L., Van Keulen, H., Challa, H., 1991. A dynamic tomato growth and yield model (TOMGRO). *Transactions of the ASAE* 34, 663–667. <https://doi.org/10.13031/2013.31715>
- Knipfer, T., Eustis, A., Brodersen, C., Walker, A.M., McElrone, A.J., 2015. Grapevine species from varied native habitats exhibit differences in embolism formation/repair associated with leaf gas exchange and root pressure. *Plant, Cell & Environment* 38, 1503–1513. <https://doi.org/10.1111/pce.12497>
- Koch, G., Rolland, G., Dauszat, M., Bédiée, A., Baldazzi, V., Bertin, N., Guédon, Y., Granier, C., 2019. Leaf Production and Expansion: A Generalized Response to Drought Stresses from Cells to Whole Leaf Biomass — A Case Study in the Tomato Compound Leaf. *Plants* 8, 409. <https://doi.org/10.3390/plants8100409>

- Koch, G., Rolland, G., Dauzat, M., Bédiée, A., Baldazzi, V., Bertin, N., Guédon, Y., Granier, C., 2018. Are compound leaves more complex than simple ones? A multi-scale analysis. *Annals of Botany* 122, 1173–1185. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy116>
- Köckenberger, W., 2001. Functional imaging of plants by magnetic resonance experiments. *Trends in Plant Science* 6, 286–292. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01984-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01984-7)
- Köckenberger, W., Pope, J.M., Xia, Y., Jeffrey, K.R., Komor, E., Callaghan, P.T., 1997. A non-invasive measurement of phloem and xylem water flow in castor bean seedlings by nuclear magnetic resonance microimaging. *Planta* 201, 53–63. <https://doi.org/10.1007/BF01258680>
- Lacointe, A., 2000. Carbon allocation among tree organs: A review of basic processes and representation in functional-structural tree models. *Ann. For. Sci.* 57, 521–533. <https://doi.org/10.1051/forest:2000139>
- Lang, A., Thorpe, M.R., 1989. Xylem, Phloem and Transpiration Flows in a Grape: Application of a Technique for Measuring the Volume of Attached Fruits to High Resolution Using Archimedes' Principle. *Journal of Experimental Botany* 40, 1069–1078. <https://doi.org/10.1093/jxb/40.10.1069>
- Lee, D.R., 1989. Vasculature of the abscission zone of tomato fruit: implications for transport. *Can. J. Bot.* 67, 1898–1902. <https://doi.org/10.1139/b89-241>
- Liu, H.-F., Génard, M., Guichard, S., Bertin, N., 2007. Model-assisted analysis of tomato fruit growth in relation to carbon and water fluxes. *Journal of Experimental Botany* 58, 3567–3580. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm202>
- Liu, J., Kang, S., Davies, W.J., Ding, R., 2019. Elevated [CO₂] alleviates the impacts of water deficit on xylem anatomy and hydraulic properties of maize stems. *Plant, Cell & Environment* 43, 563–578. <https://doi.org/10.1111/pce.13677>
- Lough, T.J., Lucas, W.J., 2006. INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY: Role of Phloem Long-Distance Macromolecular Trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 57, 203–232. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144145>
- Lovisolo, C., Schubert, A., 1998. Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in *Vitis vinifera* L. *Journal of Experimental Botany* 49, 693–700. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.321.693>
- Lucas, W.J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S.-R., Helariutta, Y., He, X.-Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S.M., Patrick, J.W., Sperry, J., Yoshida, A., López-Millán, A.-F., Grusak, M.A., Kachroo, P., 2013. The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions. *Journal of Integrative Plant Biology* 55, 294–388. <https://doi.org/10.1111/jipb.12041>
- MacRobbie, E. a. C., 1971. Facts and Mechanisms: A Comparative Survey. *Biological Reviews* 46, 429–481. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1971.tb01053.x>
- Malone, M., Andrews, J., 2001. The distribution of xylem hydraulic resistance in the fruiting truss of tomato. *Plant, Cell & Environment* 24, 565–570. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00687.x>
- Mao, L., Begum, D., Chuang, H., Budiman, M.A., Szymkowiak, E.J., Irish, E.E., Wing, R.A., 2000. JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscissionzone development. *Nature* 406, 910–913. <https://doi.org/10.1038/35022611>
- Martre, P., Cochard, H., Durand, J.-L., 2001. Hydraulic architecture and water flow in growing grass tillers (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant, Cell & Environment* 24, 65–76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00657.x>

- Martre, P., Durand, J.-L., Cochard, H., 2000. Changes in axial hydraulic conductivity along elongating leaf blades in relation to xylem maturation in tall fescue. *New Phytologist* 146, 235–247. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00641.x>
- Minchin, P.E.H., Thorpe, M.R., 2003. Using the short-lived isotope ¹¹C in mechanistic studies of photosynthate transport. *Functional Plant Biol.* 30, 831–841. <https://doi.org/10.1071/fp03008>
- Mispelster, J., Lupu, M., Briguet, A., 2015. *Nmr Probeheads For Biophysical And Biomedical Experiments: Theoretical Principles And Practical Guidelines (2nd Edition)*. World Scientific Publishing Company.
- Mitchell, J.P., Shennan, C., Grattan, S.R., 1991a. Developmental changes in tomato fruit composition in response to water deficit and salinity. *Physiologia Plantarum* 83, 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb01299.x>
- Mitchell, J.P., Shennan, C., Grattan, S.R., May, D.M., 1991b. Tomato Fruit Yields and Quality under Water Deficit and Salinity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116, 215–221. <https://doi.org/10.21273/JASHS.116.2.215>
- Molz, F.J., Klepper, B., 1972. Radial Propagation of Water Potential in Stems1. *Agronomy Journal* 64, 469–473. <https://doi.org/10.2134/agronj1972.00021962006400040018x>
- Moriwaki, S., Terada, Y., Kose, K., Haishi, T., Sekozawa, Y., 2014. Visualization and Quantification of Vascular Structure of Fruit Using Magnetic Resonance Microimaging. *Appl Magn Reson* 45, 517–525. <https://doi.org/10.1007/s00723-014-0537-3>
- Muench, E., 1930. *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Jena: Gustav Fischer.
- Mullendore, D.L., Windt, C.W., As, H.V., Knoblauch, M., 2010. Sieve Tube Geometry in Relation to Phloem Flow. *The Plant Cell* 22, 579–593. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070094>
- Musse, M., Quéllec, S., Devaux, M.-F., Cambert, M., Lahaye, M., Mariette, F., 2009. An investigation of the structural aspects of the tomato fruit by means of quantitative nuclear magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance Imaging* 27, 709–719. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2008.11.005>
- Musse, M., Bidault, K., Quéllec, S., Brunel, B., Collewet, G., Cambert, M., Bertin, N., 2021. 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, 62–78. <https://doi.org/10.1111/tpj.15039>
- Najla, S.N., Vercambre, G.V., Pagès, L.P., Grasselly, D.G., Gautier, H.G., Génard, M.G., 2009. Tomato plant architecture as affected by salinity: Descriptive analysis and integration in a 3-D simulation model. *Botany*. <https://doi.org/10.1139/B09-061>
- Nobel, P.S., Nobel, P. of B. and A.D. of the U.-D.L.P.S., 1999. *Physicochemical & Environmental Plant Physiology*. Academic Press.
- Pascual, L., Desplat, N., Huang, B.E., Desgroux, A., Bruguier, L., Bouchet, J.-P., Le, Q.H., Chauchard, B., Verschave, P., Causse, M., 2015. Potential of a tomato MAGIC population to decipher the genetic control of quantitative traits and detect causal variants in the resequencing era. *Plant Biotechnology Journal* 13, 565–577. <https://doi.org/10.1111/pbi.12282>
- Pate, J.S., Jeschke, W.D., Aylward, M.J., 1995. Hydraulic architecture and xylem structure of the dimorphic root systems of South-West Australian species of Proteaceae. *Journal of Experimental Botany* 46, 907–915. <https://doi.org/10.1093/jxb/46.8.907>

- Patrick, J.W., Zhang, W., Tyerman, S.D., Offler, C.E., Walker, N.A., 2001. Role of membrane transport in phloem translocation of assimilates and water. *Functional Plant Biol.* 28, 697–709. <https://doi.org/10.1071/pp01023>
- Peuke, A.D., Rokitta, M., Zimmermann, U., Schreiber, L., Haase, A., 2001. Simultaneous measurement of water flow velocity and solute transport in xylem and phloem of adult plants of *Ricinus communis* over a daily time course by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Plant, Cell & Environment* 24, 491–503. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00704.x>
- Plaut, Z., Grava, A., Yehezkel, C., Matan, E., 2004. How do salinity and water stress affect transport of water, assimilates and ions to tomato fruits? *Physiologia Plantarum* 122, 429–442. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00416.x>
- Prusova, A., 2016. Light on phloem transport (an MRI approach) (phd). Wageningen University, Wageningen.
- Qi, X., Takahashi, H., Kawasaki, Y., Ohta, Y., Isozaki, M., Kojima, M., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Imanishi, S., Chen, X., Nakazono, M., 2020. Differences in xylem development between Dutch and Japanese tomato (*Solanum lycopersicum*) correlate with cytokinin levels in hypocotyls. *Annals of Botany* 126, 315–322. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa094>
- R Core Team, 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rančić, D., Quarrie, S.P., Radošević, R., Terzić, M., Pećinar, I., Stikić, R., Jansen, S., 2010. The application of various anatomical techniques for studying the hydraulic network in tomato fruit pedicels. *Protoplasma* 246, 25–31. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0115-y>
- Rančić, D., Quarrie, S.P., Terzić, M., Savić, S., Stikić, R., 2008. Comparison of light and fluorescence microscopy for xylem analysis in tomato pedicels during fruit development. *Journal of Microscopy* 232, 618–622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02127.x>
- Renaudin, J.-P., Deluche, C., Cheniclet, C., Chevalier, C., Frangne, N., 2017. Cell layer-specific patterns of cell division and cell expansion during fruit set and fruit growth in tomato pericarp. *Journal of Experimental Botany* 68, 1613–1623. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx058>
- Ripoll, J., Urban, L., Brunel, B., Bertin, N., 2016. Water deficit effects on tomato quality depend on fruit developmental stage and genotype. *Journal of Plant Physiology* 190, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.10.006>
- Ripoll, J., Urban, L., Staudt, M., Lopez-Lauri, F., Bidet, L.P.R., Bertin, N., 2014. Water shortage and quality of fleshy fruits—making the most of the unavoidable. *Journal of Experimental Botany* 65, 4097–4117. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru197>
- Rokitta, M., Zimmermann, U., Haase, A., 1999. Fast NMR Flow Measurements in Plants Using FLASH Imaging. *Journal of Magnetic Resonance* 137, 29–32. <https://doi.org/10.1006/jmre.1998.1611>
- Salon, C., Avice, J.-C., Colombié, S., Dieuaide-Noubhani, M., Gallardo, K., Jeudy, C., Ourry, A., Prudent, M., Voisin, A.-S., Rolin, D., 2017. Fluxomics links cellular functional analyses to whole-plant phenotyping. *Journal of Experimental Botany* 68, 2083–2098. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx126>
- Santiago, L.S., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Fisher, J.B., Machado, K., Woodruff, D., Jones, T., 2004. Leaf photosynthetic traits scale with hydraulic conductivity and wood density in Panamanian forest canopy trees. *Oecologia* 140, 543–550. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1624-1>

- Sarlikioti, V., de Visser, P.H.B., Marcelis, L.F.M., 2011. Exploring the spatial distribution of light interception and photosynthesis of canopies by means of a functional–structural plant model. *Annals of Botany* 107, 875–883. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr006>
- Savage, J.A., Clearwater, M.J., Haines, D.F., Klein, T., Mencuccini, M., Sevanto, S., Turgeon, R., Zhang, C., 2016. Allocation, stress tolerance and carbon transport in plants: how does phloem physiology affect plant ecology? *Plant, Cell & Environment* 39, 709–725. <https://doi.org/10.1111/pce.12602>
- Scheenen, T., Heemskerk, A., de Jager, A., Vergeldt, F., Van As, H., 2002. Functional Imaging of Plants: A Nuclear Magnetic Resonance Study of a Cucumber Plant. *Biophysical Journal* 82, 481–492. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75413-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75413-1)
- Scheenen, T. W. J., van Dusschoten, D., de Jager, P.A., Van As, H., 2000. Microscopic Displacement Imaging with Pulsed Field Gradient Turbo Spin–Echo NMR. *Journal of Magnetic Resonance* 142, 207–215. <https://doi.org/10.1006/jmre.1999.1916>
- Scheenen, T.W.J., van Dusschoten, D., de Jager, P.A., Van As, H., 2000. Quantification of water transport in plants with NMR imaging. *Journal of Experimental Botany* 51, 1751–1759. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.351.1751>
- Scheenen, T.W.J., Vergeldt, F.J., Heemskerk, A.M., As, H.V., 2007. Intact Plant Magnetic Resonance Imaging to Study Dynamics in Long-Distance Sap Flow and Flow-Conducting Surface Area. *Plant Physiology* 144, 1157–1165. <https://doi.org/10.1104/pp.106.089250>
- Scheenen, T.W.J., Vergeldt, F.J., Windt, C.W., de Jager, P.A., Van As, H., 2001. Microscopic Imaging of Slow Flow and Diffusion: A Pulsed Field Gradient Stimulated Echo Sequence Combined with Turbo Spin Echo Imaging. *Journal of Magnetic Resonance* 151, 94–100. <https://doi.org/10.1006/jmre.2001.2362>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schulte, P.J., GIBSON, A.C., NOBEL, P.S., 1989. Water Flow in Vessels with Simple or Compound Perforation Plates. *Annals of Botany* 64, 171–178. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087822>
- Sharkey, T.D., 2019. Is triose phosphate utilization important for understanding photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* 70, 5521–5525. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz393>
- Sharma, A.K., 1956. Fixation of plant chromosomes. *Bot. Rev* 22, 665–695. <https://doi.org/10.1007/BF02872457>
- Simon, Jeanne, Cardoso, M., Alibert, E., Valsesia, P., Vercambre, G., Verdeil, J.-L., Goze-Bac, C., Bertin, N., 2019. Combining flow-MRI method and modeling approach to assess the impact of conducting tissues on water fluxes in tomato fruit, in: *International Symposium on Advanced Technologies and Management for Innovative Greenhouses: GreenSys2019* 1296. pp. 371–380.
- Simon, J, Cardoso, M., Alibert, E., Verdeil, J.-L., Vercambre, G., Goze-Bac, C., Bertin, N., 2019. Investigation and integration of methods to better understand sap fluxes in tomato plant architecture, in: *XI International Workshop on Sap Flow* 1300. pp. 55–62.
- Sinoquet, H., Roux, X.L., Adam, B., Ameglio, T., Daudet, F.A., 2001. RATP: a model for simulating the spatial distribution of radiation absorption, transpiration and photosynthesis within canopies: application to an isolated tree crown. *Plant, Cell & Environment* 24, 395–406. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00694.x>

- Slack, G., Calvert, A., 1977. The Effect of Truss Removal on the Yield of Early Sown Tomatoes. *Journal of Horticultural Science* 52, 309–315. <https://doi.org/10.1080/00221589.1977.11514759>
- Smith, D.M., Allen, S.J., 1996. Measurement of sap flow in plant stems. *Journal of Experimental Botany* 47, 1833–1844. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.12.1833>
- Snaar, J.E.M., Van As, H., 1992. Probing water compartments and membrane permeability in plant cells by ¹H NMR relaxation measurements. *Biophysical Journal* 63, 1654–1658. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81741-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81741-1)
- Soriano, D., Echeverría, A., Anfodillo, T., Rosell, J.A., Olson, M.E., 2020. Hydraulic traits vary as the result of tip-to-base conduit widening in vascular plants. *Journal of Experimental Botany* 71, 4232–4242. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa157>
- Sperry, J.S., Hacke, U.G., Oren, R., Comstock, J.P., 2002. Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant, Cell & Environment* 25, 251–263. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00799.x>
- Stejskal, E.O., Tanner, J.E., 1965. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J. Chem. Phys.* 42, 288–292. <https://doi.org/10.1063/1.1695690>
- Stedle, E., 2001. The Cohesion-Tension Mechanism and the Acquisition of Water by Plant Roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 847–875. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.847>
- Szymkowiak, E.J., Irish, E.E., 1999. Interactions between jointless and Wild-Type Tomato Tissues during Development of the Pedicel Abscission Zone and the Inflorescence Meristem. *The Plant Cell* 11, 159–175. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.2.159>
- Taiz, L., Zeiger, E., 2006. *Plant Physiology*. Universitat Jaume I.
- Tardieu, F., Cruziat, P., Durand, J., Triboï, E., Zivy, M., 2006. Perception de la sécheresse par la plante, conséquences sur la productivité et sur la qualité des produits récoltés. sécheresse et agriculture, Ed., Unité ESCo. INRA, Paris 49–67.
- Tardieu, F., Granier, C., Muller, B., 2011. Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? *Current Opinion in Plant Biology* 14, 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.002>
- Thompson, M.V., Holbrook, N.M., 2003a. Application of a Single-solute Non-steady-state Phloem Model to the Study of Long-distance Assimilate Transport. *Journal of Theoretical Biology* 220, 419–455. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2003.3115>
- Thompson, M.V., Holbrook, N.M., 2003b. Scaling phloem transport: water potential equilibrium and osmoregulatory flow. *Plant, Cell & Environment* 26, 1561–1577. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01080.x>
- Tixier, A., 2013. *Physique et biologie moléculaire de la vulnérabilité du xylème à la cavitation* (phdthesis). Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2).
- Tolivia, D., Tolivia, J., 1987. Fasga: A new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. *Journal of Microscopy* 148, 113–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb02859.x>
- Tyree, M.T., 1988. A dynamic model for water flow in a single tree: evidence that models must account for hydraulic architecture. *Tree Physiology* 4, 195–217. <https://doi.org/10.1093/treephys/4.3.195>
- Tyree, M.T., Ewers, F.W., 1991. The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist* 119, 345–360. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00035.x>

- Tyree, M.T., Sperry, J.S., 1989. Vulnerability of Xylem to Cavitation and Embolism 20.
- Tyree, M.T., Sperry, J.S., 1988. Do Woody Plants Operate Near the Point of Catastrophic Xylem Dysfunction Caused by Dynamic Water Stress?: Answers from a Model. *Plant Physiology* 88, 574–580. <https://doi.org/10.1104/pp.88.3.574>
- Tyree, M.T., Zimmermann, M.H., 2013. *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. Springer Science & Business Media.
- Van As, H., 2007. 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, 743–756. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl157>
- Van Bel, A.J.E., 1990. Xylem-Phloem Exchange Via the Rays: The Undervalued Route of Transport. *Journal of Experimental Botany* 41, 631–644. <https://doi.org/10.1093/jxb/41.6.631>
- Van Ieperen, W., Volkov, V.S., Van Meeteren, U., 2003. Distribution of xylem hydraulic resistance in fruiting truss of tomato influenced by water stress. *Journal of Experimental Botany* 54, 317–324. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg010>
- Vandegheuchte, M.W., Steppe, K., 2013. Corrigendum to: Sap-flux density measurement methods: working principles and applicability. *Functional Plant Biol.* 40, 1088–1088. https://doi.org/10.1071/fp12233_co
- Vandusschoten, D., DeJager, P.A., Vanas, H., 1995. Extracting Diffusion Constants from Echo-Time-Dependent PFG NMR Data Using Relaxation-Time Information. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 116, 22–28. <https://doi.org/10.1006/jmra.1995.1185>
- Vercambre, G., Doussan, C., Pages, L., Habib, R., Pierret, A., 2002. Influence of xylem development on axial hydraulic conductance within *Prunus* root systems. *Trees* 16, 479–487. <https://doi.org/10.1007/s00468-002-0190-6>
- Wal, B.A.E.V. de, Windt, C.W., Leroux, O., Steppe, K., 2017. Heat girdling does not affect xylem integrity: an in vivo magnetic resonance imaging study in the tomato peduncle. *New Phytologist* 215, 558–568. <https://doi.org/10.1111/nph.14610>
- Wang, W.-M., Li, Z.-L., Su, H.-B., 2007. Comparison of leaf angle distribution functions: Effects on extinction coefficient and fraction of sunlit foliage. *Agricultural and Forest Meteorology* 143, 106–122. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2006.12.003>
- Wenzel, C.L., McCully, M.E., Canny, M.J., 1989. Development of Water Conducting Capacity in the Root Systems of Young Plants of Corn and Some Other C4 Grasses. *Plant Physiology* 89, 1094–1101. <https://doi.org/10.1104/pp.89.4.1094>
- Windt, C.W., Gerkema, E., Van As, H., 2009. Most Water in the Tomato Truss Is Imported through the Xylem, Not the Phloem: A Nuclear Magnetic Resonance Flow Imaging Study. *Plant Physiol.* 151, 830–842. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141044>
- Windt, C.W., Vergeldt, F.J., De Jager, P.A., Van As, H., 2006. MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant Cell Environ* 29, 1715–1729. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01544.x>
- Winisdorffer, G., Musse, M., Quéllec, S., Devaux, M.-F., Lahaye, M., Mariette, F., 2015. MRI investigation of subcellular water compartmentalization and gas distribution in apples. *Magn Reson Imaging* 33, 671–680. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2015.02.014>

Wolterbeek, H.Th., 1987. Cation exchange in isolated xylem cell walls of tomato. I. Cd²⁺ and Rb⁺ exchange in adsorption experiments. *Plant, Cell & Environment* 10, 39–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1987.tb02077.x>

Zimmermann, M.H., 1983. *Xylem Structure and the Ascent of Sap.*, Springer-Verlag, Berlin. ed.

Zimmermann, U., Schneider, H., Wegner, L.H., Haase, A., 2004. Water ascent in tall trees: does evolution of land plants rely on a highly metastable state? *New Phytologist* 162, 575–615. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01083.x>

ANNEXES

Annexe 1 : Distribution des diamètres de vaisseaux du xylème (Figures supplémentaires du Chapitre III).

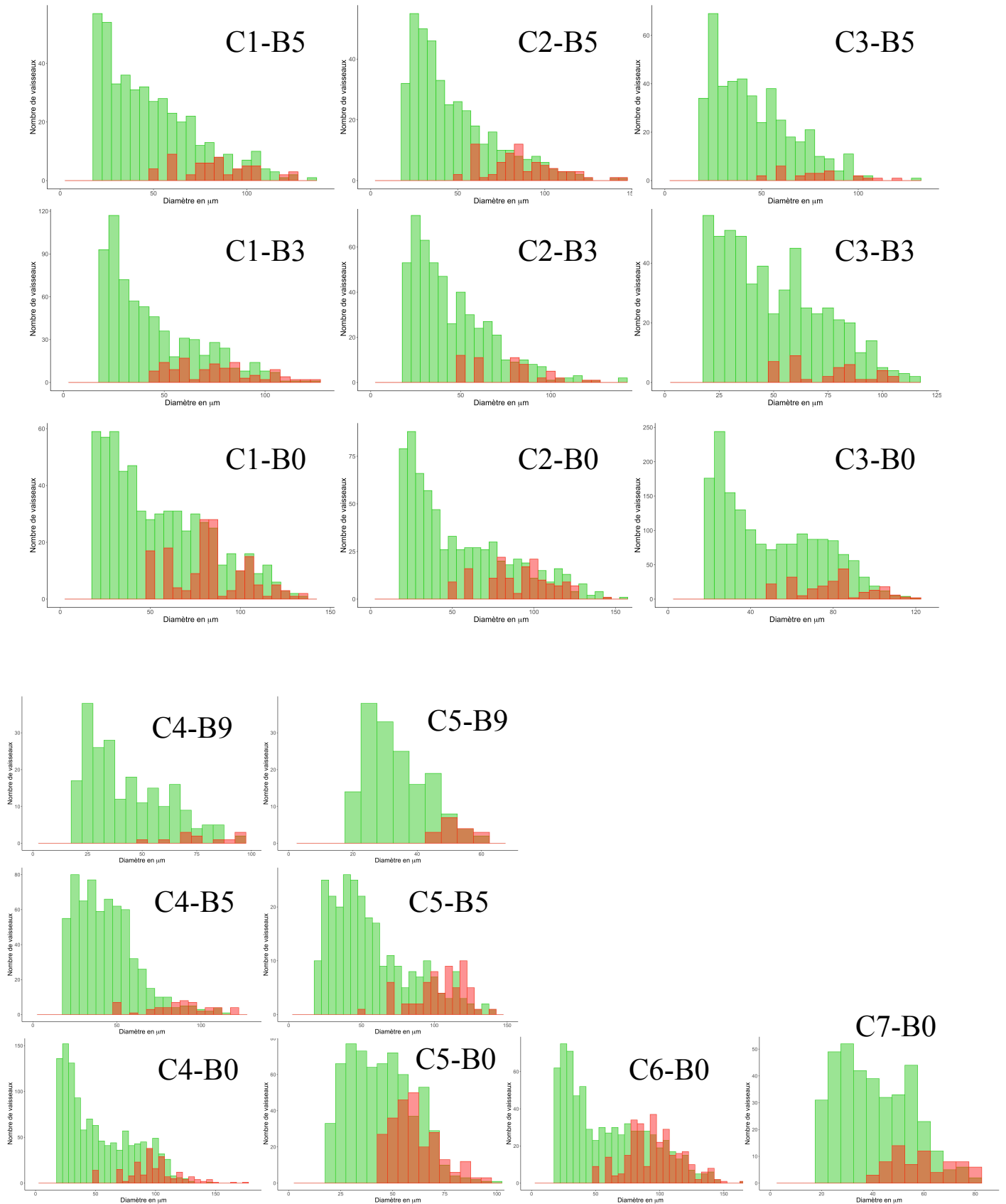
Annexe 2 : Signal « flip-flop » en fonction du temps de répétition en ms (Figures supplémentaires du Chapitre III).

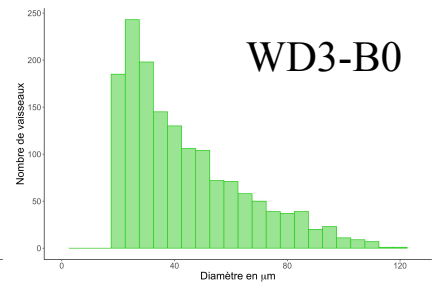
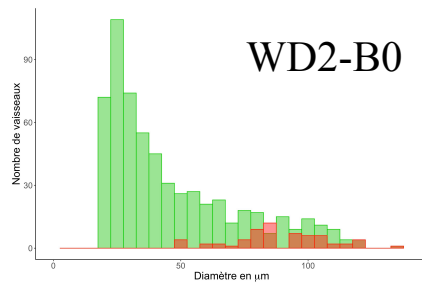
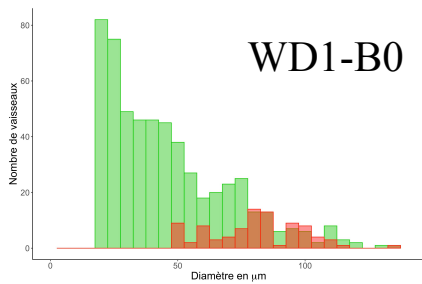
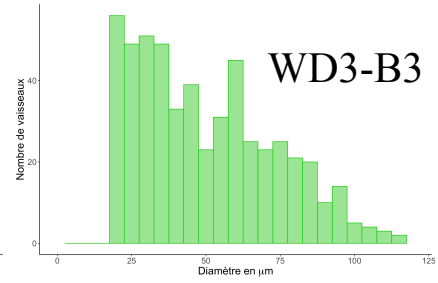
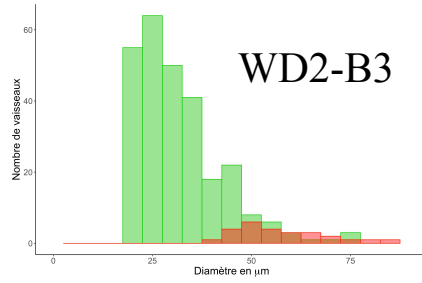
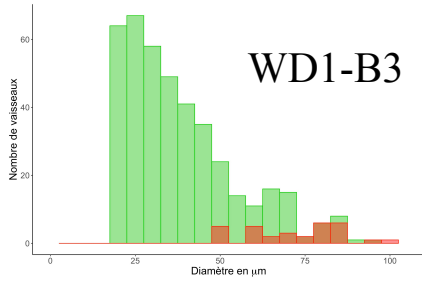
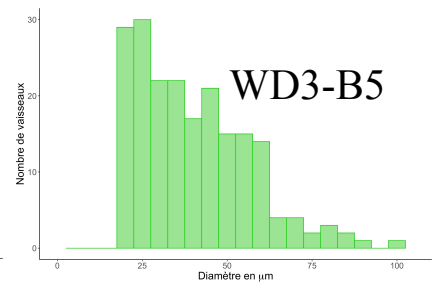
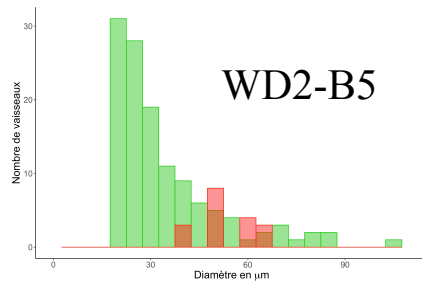
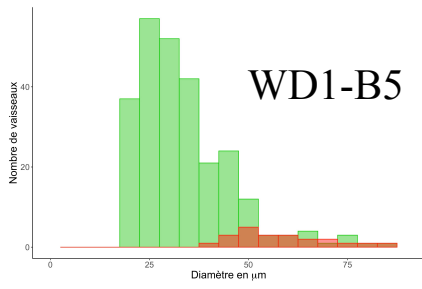
Annexe 3 : Simon J, Cardoso M., Alibert E., Valsesia P., Vercambre G., Verdeil J.L., Goze-Bac C., Bertin N. (2019). Combining flow-MRI method and modeling approach to assess the impact of conducting tissues on water fluxes in tomato fruit. *Acta Horticulturae*.

Annexe 4 : Simon J, Cardoso M., Alibert E., Verdeil J.L., Vercambre G., Goze-Bac C., Bertin N. (2019). Investigation and integration of methods to better understand sap fluxes in tomato plant architecture. *Acta Horticulturae*.

ANNEXE 1 :

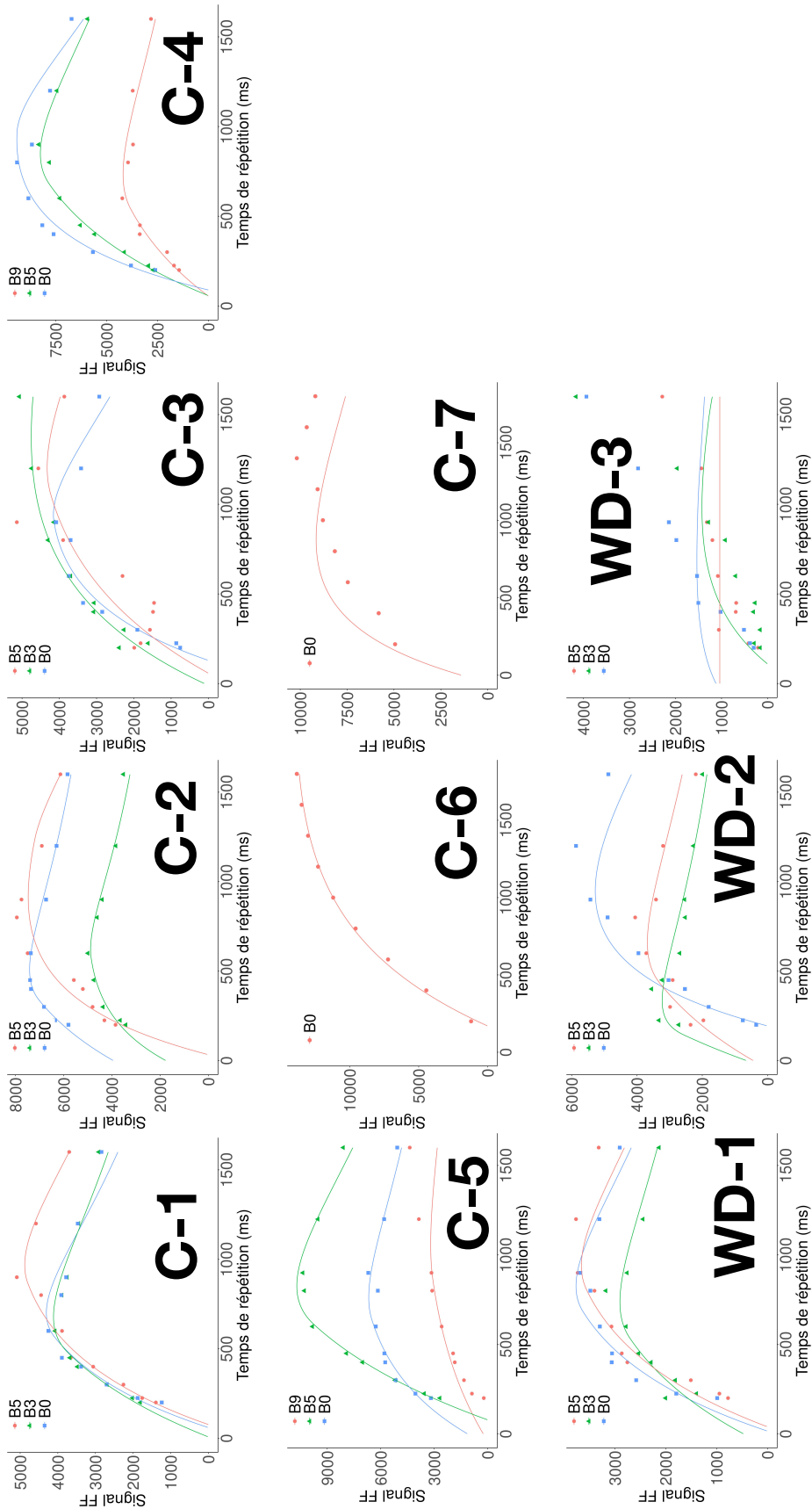
Distribution des diamètres de vaisseaux du xylème en μm aux trois positions (B0, B3 et B5) pour toutes les plantes présentées dans le chapitre III. Les vaisseaux actifs, mesurés sur les coupes IRM sont en rouge, et les vaisseaux du xylème mesurés sur la coupe histologique (diamètre $> 19,5 \mu\text{m}$) sont en vert. La taille des vaisseaux xylémiens est probablement légèrement surestimée en IRM à cause de la plus faible résolution des images.





ANNEXE 2 :

Signal FF (unité arbitraire) mesuré à la position B0 (carrés bleus), B3 (triangles verts) et B5 (ronds rouges) pour toute les plantes présentées dans le chapitre III en fonction du T_R en ms. Les meilleurs ajustements pour les trois positions sont représentés par les courbes, de la même couleur que les points.



ANNEXE 3

Combining flow-MRI method and modeling approach to assess the impact of conducting tissues on water fluxes in tomato fruit

J. Simon^{1,2,a}, M. Cardoso², E. Alibert², P. Valsesia¹, G. Vercambre¹, J.-L. Verdeil³, C. Goze-Bac² and N. Bertin¹

¹UR PSH, INRA, Avignon, France; ²Université Montpellier-CNRS, Laboratoire Charles Coulomb UMR 5221, F-34095, Montpellier, France; ³UMR AGAP, CIRAD, Montpellier, France.

Abstract

Water and carbon status throughout growth and development are tightly controlled by the plants and are key components of their response to environmental stresses. In order to predict the plant behavior under contrasting environments, many functional-structural plant models have been developed, describing the network of source and sink organs as well the transport of resources within this network. However, some parameters related to the regulation of local endogenous resource availability and transport are difficult to measure in planta. Only a limited number of the existing techniques are non-invasive and feasible. Yet nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, relaxometry and imaging (MRI) methods are available to study cell water balance and phloem and xylem transports in large potted plants. The objective of this study is to gain a better understanding of the impact of conducting tissues on water fluxes in tomato fruit by combining modeling, MRI and histological observations. In order to measure water flux, we implemented a novel flow-MRI method taking advantage of inflow slice sensitivity. We applied these methods to estimate water fluxes at the truss peduncle and fruit pedicel. The experiments have been performed on an Agilent MRI scanner working at 9.4T using inflow and outflow sensitive spin echo pulse sequences. We compared MRI measurements to the predictions of a biophysical model that simulates fruit growth. Our study shows that MRI is a useful and non-destructive technique to measure water fluxes at different locations within the plant. Combined to histological measurements, we can obtain quantitative data at the vessel level to improve model formalisms and parameterization and go beyond the limits of current approaches in plant ecophysiology.

Keyword: flip-flop, virtual fruit model, xylem, phloem, histology

INTRODUCTION

Spatial and temporal variabilities of fruit size, water composition and dry matter accumulation make the prediction of fruit quality and production rather complex. In case of environmental stresses, these variabilities are exacerbated due to changes in local resource availabilities. During the previous decades, many process-based predictive models have been developed to predict crop yield or quality under these fluctuating environments or to design ideotypes (Bertin et al., 2010). Such integrated models aim at describing the network of source and sink organs in the plant as well the transport of resources within this network (Baldazzi et al., 2013). At the fruit level, growth has been modeled in a biophysical virtual fruit model (Fishman and Génard, 1998), simulating water and dry material transport through xylem and phloem tissues as well as cell wall extension stimulated by turgor pressure. This model has been further extended (Hall et al., 2013) by adding a pedicel, which contributes to the major hydraulic resistance of the pathway to the fruit (Mazzeo, 2008).

In our study, we focus on the water fluxes involved in the growth of tomato fruit and more specifically on the contribution of both xylem and phloem fluxes in the pedicel and in

^aE-mail: jeanne.simon@inra.fr



the fruit. In the virtual fruit model, several parameters and variables related to the transport of water and carbon in the fruit are more or less empirically described and more input information is needed, in particular regarding xylem and phloem conductance and their variations with fruit age.

Many studies (Ho et al., 1987; Plaut et al., 2004; Guichard et al., 2005) investigating the water entry at the fruit pedicel level, in controlled conditions and in response to different types of abiotic stresses, found that most of the total water transport to the tomato was transported via the phloem. These studies applied different destructive or indirect techniques to estimate the respective contribution of xylem and phloem fluxes to fruit water supply. Some used displacement sensors and compared fruit growth between normal and heat girdled plants (Guichard et al., 2005); others used the amount of calcium accumulated in the fruit in order to estimate the amount of water transported through the xylem, assuming that the calcium content of the phloem sap is negligible (Ho et al., 1987). It has been shown that the cell expansion involved in fruit growth can be supported by water import via the xylem in the cases where phloem is destroyed by heat girdling (Grange and Andrews, 1994).

Xylem and phloem tissues transport, respectively, water and elaborated sap. In the tomato stem two types of phloem exist that have different physiological roles: the primary phloem (internal or adaxial) is mainly involved in assimilate transport from leaves to aerial sinks, while the secondary one (external or abaxial) is almost exclusively involved in the long-distance transport of assimilates to the root system (Bonnemain, 1968).

Dedicated nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, relaxometry and imaging (MRI) equipment and methods are now available to study cell water balance and phloem and xylem transports in large potted plants. It has been shown that functional MRI offers exciting possibilities for the physiological mapping of whole plants at high spatial and temporal resolutions (Van As, 2007; Buy et al., 2018). Moreover, a flow-MRI study (Windt et al., 2009) focusing on water moving to tomato truss found that 75% of the influx at the peduncle level goes through the xylem, and that 25% would be transported in the perimedullary region, where there is both phloem and xylem transports. These findings are contradictory to most results of other ecophysiological studies cited earlier, but the measurements in Windt et al. (2009) have been done before the abscission zone and not directly at the fruit entry.

Therefore, many issues remain with respect to understanding the regulation of water and carbon transport at the vascular level, and the way it affects the plant and fruit responses to abiotic stresses. In the present study, we investigated water transport in relation to xylem and phloem tissues in the tomato fruit pedicel, by combining modeling, histology and flow-MRI measurements. We applied a novel flow-MRI method involving the slice selectivity in the context of a multi spin echo sequence (Buy et al., 2018). Two pulse sequences measuring inflow and outflow weighted images of the same slice are performed, allowing slow flow sensitive imaging. This innovative approach allowed us to quantify and map in situ the water fluxes at the truss level, in a direct way. The virtual tomato fruit model linked to the pedicel model (Liu et al., 2007; Constantinescu et al., 2016) was applied to analyze the sensitivity of phloem and xylem fluxes to different parameters that control fruit growth. In addition, an histological pipeline was developed to quantify the surface of conducting tissues in the pedicel and evaluate the relationships with fruit mass and size as described in the fruit model. On the whole, our results provide new perspectives and tools to better predict fruit growth and quality in response to environmental stresses.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The study focuses on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Two cultivars were studied: 'West Virginia 106' (WVA106), a cherry tomato, was the reference cultivar for modeling whereas histological measurements were made on the wild type of the 'Heinz' genotype and a mutant of Heinz with no abscission zone called 'Jointless' (Mao et al., 2000). All plants were grown in a glasshouses in Avignon and transferred to an indoor growth chamber one week before MRI measurements in order to adapt to constant light (PPFD~300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and

temperature (22°C) conditions.

Virtual fruit model

The virtual fruit model simulates the water and dry matter accumulation rates during fruit growth considering the fruit as being one big cell (Fishman and Génard, 1998). The input of this model are two climatic variables: air temperature and humidity, plus two variables describing the plant status: stem water potential and phloem sap concentration in sugars, which is assumed constant in the plant. The resulting change in fruit water content over time is calculated as the sum of xylem and phloem influx minus the water outflow due to fruit transpiration. Water and sugar move from the stem through the pedicel vasculature, and then to the fruit through composite membranes. In the fruit, the xylem and phloem fluxes are calculated from non-equilibrium thermodynamic equations involving the surface of exchange, which is assumed proportional to the fruit surface area. It also involves hydraulic conductivity, solute reflection coefficients of the membrane separating the fruit from the conducting tissues and hydrostatic and osmotic pressures, calculated from the molar concentrations of osmotically active compounds (Liu et al., 2007).

The virtual fruit model parameters for the studied genotype, WVA106, were optimized based on data of dry and fresh masses collected on plants grown in a glasshouse. Then, we used the NSGA-II algorithm (Deb et al., 2002) to find the best combination of parameters to predict dry and fresh masses. The outputs of this algorithm depend on the random initial values chosen, so the optimization was repeated 10 times. The output variables we are focusing on in our study are the xylemic and phloemic fluxes, which are simulated by the model.

Sensitivity analysis of the virtual fruit model

For the sensitivity analysis of the model, we chose the Sobol's method (Saltelli et al., 2008). The first order index of sensitivity quantifies the sensitivity of the output due only to the input parameters or variables that we are looking at. The total index of sensitivity for a parameter is the sum of its first order sensitivity index with all its second order sensitivity indices, that represent the impact on outputs potentially caused by interactions between the focal input parameter and other parameters of the model. The higher the index, the higher is the sensitivity of the output variable to this parameter.

Flow-MRI: the flip-flop method

Magnetic resonance imaging (MRI) is a technique able to produce parametric images of the interior of the studied organism in a non-invasive manner. It relies on nuclear magnetic resonance (NMR) principles, based on the electromagnetic properties of the nuclear spins. Here we are working with Hydrogen (^1H), the most commonly used atom in MRI experiments, which gives direct information on the tissue water content and its dynamic (Van As, 2007). In this study, the experiments were performed on a Agilent MRI scanner working at 9.4 T corresponding to 400 MHz for the ^1H nuclei. The experimental set-up on living systems is based on a horizontal MRI scanner forcing the plant to be placed horizontally in a cradle, moving inside a 10 cm in diameter clear bore magnet. The environmental conditions within the MRI scanner are partially controllable; the experiment is located in a climatized room (20°C), and the heater is able to regulate the temperature at 25°C only at the center of the magnetic field. In order to measure the fluxes at the fruit entry, a ^1H MRI probe has been designed to fit the fruit pedicel. To pick up the magnetization recovery of the ^1H nuclei the resonance frequency of the coil is tuned at 400 MHz.

A novel flow-MRI method involving the slice selectivity in the context of a multi-spin echo sequence called flip-flop (Buy et al., 2018; Simon et al., 2018) was applied to measure water fluxes. Two pulse sequences measuring inflow and outflow weighted images of the same slice are performed, allowing slow flow sensitive imaging. With this method we are able to measure xylem fluxes in the main stem of the plant, at different heights and possibly at the fruit entry. The mean flux velocity by fitting the experimental data with the following expression:

$$FF_{signal} = r \cdot M_0 \cdot \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \quad (1)$$

M_0 represents the total magnetization, TR the repetition time, T1 longitudinal relaxation time and r the inflow factor which depends on the model used to depict the velocity gradient (Buy et al., 2018). MRI measurements give access to a map of the fluxes velocities and of the active surface areas of the conductive vessels. Matlab routines were developed to process the images and to estimate the active surfaces, velocities as well as fluxes. A particular attention was paid to registered inflow and outflow images before computing the various maps. The MRI experiment presented here has been done on a truss detached from the plant and immersed in a solution of 6% of sucrose (Bussi eres et al., 2011). The coil was placed at the level of the pedicel, between 2 fruits among the 11 growing fruits (expanding phase) present on the truss.

Histology

We performed histological measurements in order to characterize the conductive elements and study the anatomy of the tomato pedicel. This was done on the three genotypes. For WVA106, the pedicel part that was investigated by MRI was sampled immediately after measurements. In addition, several fruits of ‘Heinz’ wild type (WT, 5 fruits) and ‘Jointless’ mutant (6 fruits) were analyzed to evaluate the relationships between fruit size and surface of conducting tissues. For the WT 2 zones were sampled: one between the abscission zone and the fruit (AZfruit) and the second between the main stem and the abscission zone (AZstem). For WT AZfruit, the slices of only two different pedicels were analyzed, since it was difficult to find an area after the abscission zone where the circular form of secondary xylem is complete, before the fruit.

Samples were fixed in a solution 9/1 (9 volumes of absolute ethanol in 1 volume of acetic acid) (Sharma, 1956). Then they were included in a 5% agarose gel (Ref. LE-8200-B) and 60 to 100 μm thick transversal slices were obtained using a vibratome (Microm HM 650 V).

Pedicel sections were treated with bleach at 36° chlorogenic concentration to empty the parenchyma cells and increase the contrast between the phloem (primary and secondary) and the parenchyma and then stained with FASGA according to the method described in Tolivia and Tolivia (1987). After staining, the red/pink zones indicate the cells with lignified walls (secondary xylem and support fibers) and the blue zones indicated the cells with cellulosic walls non-lignified (phloem and parenchyma). We used a NanoZoomer RS slide scanner (NanoZoomer Digital Pathology System, Hamamatsu, Japan) to convert our glass slides into high-resolution digital data.

An histological pipeline and plugin were developed on Fiji (Schindelin et al., 2012) to calculate the surface and number of xylem and phloem vessels.

RESULTS AND DISCUSSION

Simulation of fruit growth and water fluxes into the fruit

Following the genetic algorithm used and the estimated parameters, Figure 1A presents the measured and simulated fresh and dry weight. The simulation covers the period of rapid fruit growth after cell division, so it starts at 10 days after anthesis (daa) and lasts 28 days, thus ending at 38 daa.

At the fruit level, the simulated xylem flux is lower than the phloem one (Figure 1B) in agreement with previous ecophysiological studies (Ho et al., 1987; Plaut et al., 2004; Guichard et al., 2005). The phloem flux in the fruit is decreasing as the fruit grows (from 0.012 to 0.007 g h^{-1}). The xylem flux slightly increases until around 25 daa, before stabilizing around 0.006 g h^{-1} (Figure 1B). Both types of fluxes are higher at night than during the day.

At the pedicel level, the xylem flux (U_{x1}) exhibits large diurnal variations, with higher values at night. For young fruits, the xylem flux at the fruit entry is lower than at the pedicel, indicating a radial flow from the xylem to the pedicel. For older fruit, the flow is opposite with

a positive radial flow from the phloem to the xylem (Figure 1B). The amplitude of the variation of the phloem flow decreases until being null when the flux reaches its maximum, between 20 and 25 daa. After that, the phloem flux decreases and the diurnal variations exhibit an opposite pattern: higher during the day than at night.

Fruit transpiration almost matched the xylem flux at the pedicel level at midday (Figure 1B).

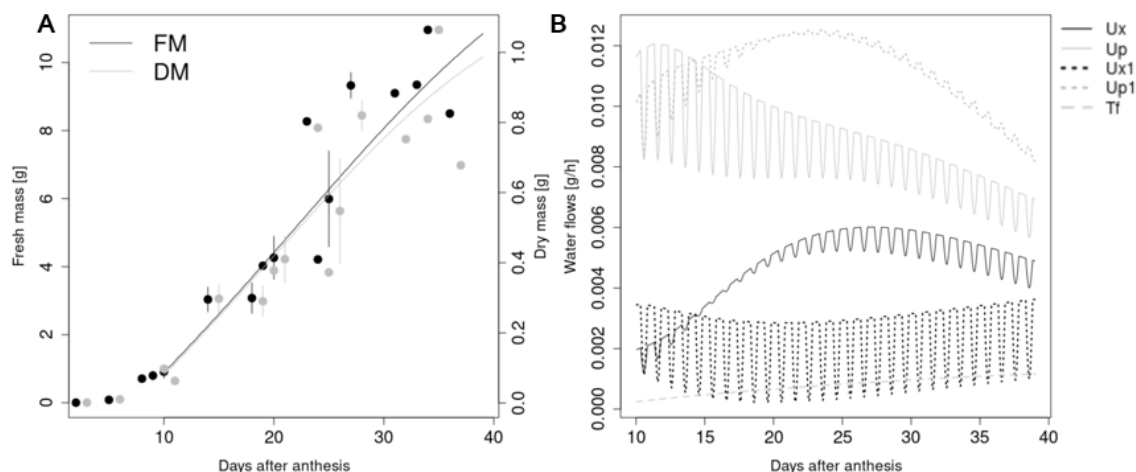


Figure 1. (A) Evolution of fruit dry mass (grey), and fresh mass (black). The symbols are measurements and the lines the simulated dry and fresh masses after optimization. (B) Evolution of the simulated water fluxes during fruit growth. Ux (black solid curve) and Up (grey solid curve) are respectively the xylem and phloem water fluxes in the fruit and Ux1 (black dotted curve) and Up1 (grey dotted curve) are respectively the xylem and phloem water fluxes in the pedicel. Tf (grey dashed line) is the fruit transpiration. These simulations are done with the parameters estimated by optimization on the measured masses from WVA106.

Sensitivity analysis of the model

We performed a sensitivity analysis of the virtual fruit model to 10 parameters (cf. Figure 2 legend) linked to transport pathway to the fruit and growth regulation in order to assess their impact on the simulated fluxes and masses, and to understand their respective contribution.

For phloem water flux in the pedicel, the parameters with the highest index of sensitivity are active sugar uptake (ν_M) and the phloem conductivity in the pedicel (lp_1) (Figure 2B). Both of them have a higher total index of sensitivity, which suggests interactions among parameters implicated in the output variability. The simulated xylem flux at the pedicel level (Figure 2A) is highly sensitive to the xylem conductivity of the pedicel (lx_1) and to the fruit elasticity (el), and is also somewhat sensitive to fruit sink strength related to active sugar transport (ν_M). The fruit elasticity is directly involved in its expansion rate.

Investigating the surface of conductive tissues

The surface of the conductive tissues (primary phloem, secondary phloem, secondary xylem) were quantified in the pedicel of two genotypes (Heinz WT and Jointless mutant) to evaluate the relationships between fruit fresh and dry masses and these surfaces (Figure 3).

Before the abscission zone, the tissue surfaces of 'Jointless' and WT were quite similar except for the pith, which is larger in the WT genotype, making the cortex smaller. The proportion of primary phloem is similar for 'Jointless' and WT whatever the position. For the WT, there was a marked decrease in the proportion of secondary xylem after the abscission zone (Figure 4A). The proportion of the secondary phloem is quite similar, except in WT after the abscission zone where it seems to be a bit smaller (Figure 4A).

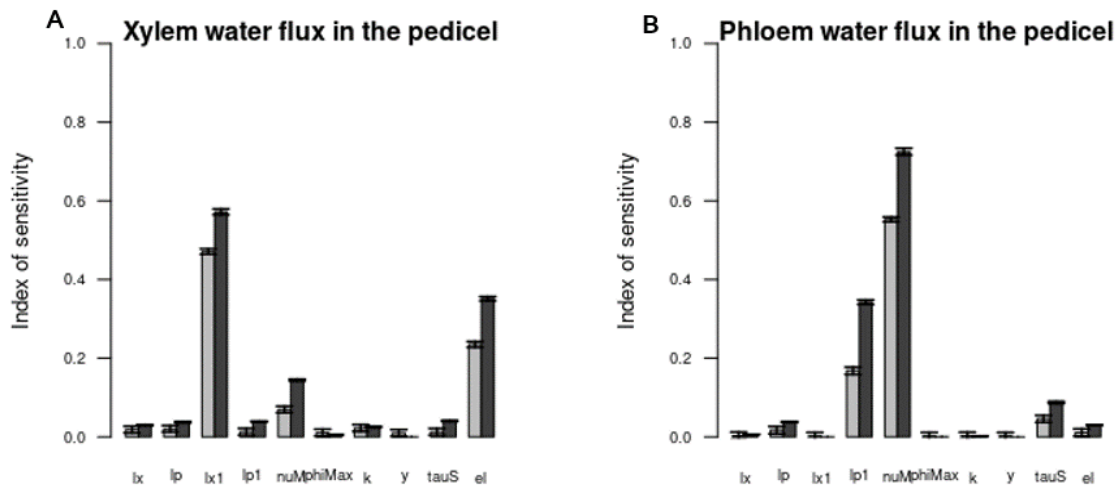


Figure 2. Sensitivity analysis of two output variables of the virtual fruit model: (A) xylem water flux in the pedicel and (B) phloem water flux in the pedicel, to 10 parameters: lx and lp are respectively xylem and phloem conductance for water transport at the fruit entry ($\text{g cm}^{-2} \text{ bar}^{-1} \text{ h}^{-1}$), lx1 and lp1, xylem and phloem conductivity for water transport at the pedicel level ($\text{g bar}^{-1} \text{ h}^{-1}$), nuM, the maximum transport velocity per units of dry mass, which represents the fruit strength ($\text{g sucrose g}^{-1} \text{ dry mass h}^{-1}$), phiMax and k, parameters needed for the calculation of phi, the extensibility of the cell wall ($\text{bar}^{-1} \text{ h}^{-1}$), y, the threshold of hydrostatic pressure needed for growth (bar), tauS, parameter involved in the fruit age variation of the reflexion coefficient of the composite membrane, and el, the elasticity (bar). The first order sensitivity indices are represented in light grey, and the total sensitivity indices are represented in darker grey. This sensitivity analysis was run for 50.000 samplings and with the parameter bounds being plus and minus 99% of their initial value, corresponding to the values optimized for the WVA106 genotype.

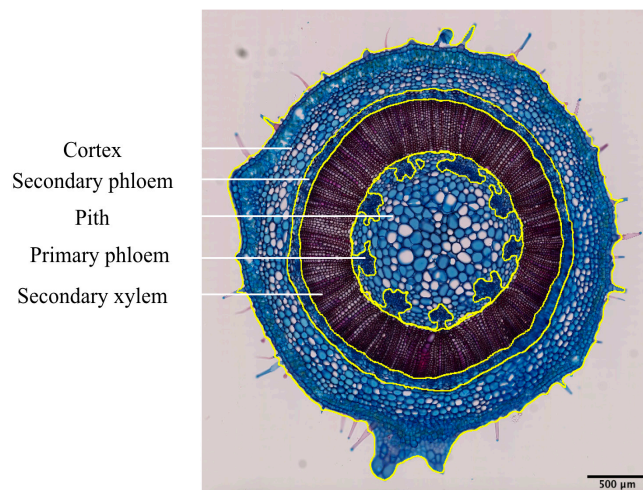


Figure 3. Histological slice of the pedicel of a Jointless tomato. FASGA stained. Thickness: 60 μm . The yellow lines correspond to the segmentation of the different tissue types. This segmentation is done using a histological pipeline and plugin developed with Fiji; the area of each zone is measured.

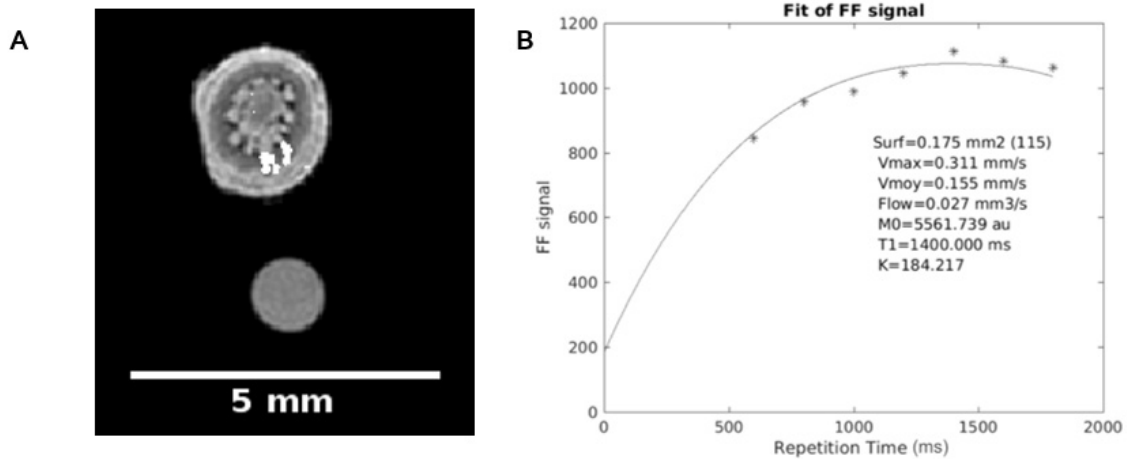


Figure 4. (A) Inflow MRI image of the pedicel between 2 fruits, with a reference H₂O tube. Repetition time: 1200 ms, slice thickness: 0.5 mm and echo time: 12 ms. The white area represents the active vessels evidenced by flow-MRI measurements. (B) Flip-flop signal as a function of the repetition time in milli-second. The stars represent the measured flip-flop intensities at different repetition times and the curve its best fit, according to the inflow expression showed on the graph. Short repetition times below 500 ms are difficult to measure experimentally because of motion artifacts from the entire plants.

Apart from correlation among pedicel tissues (Figure 5), the fruit fresh and dry masses were positively correlated to primary phloem surface and pedicel diameter and negatively correlated to cortex surface. There was also a significant positive correlation between the percentage of dry mass and secondary xylem and secondary phloem surfaces. So, primary phloem and primary and secondary xylem surfaces are well correlated to fruit masses which supports the model hypothesis (Fishman and Génard, 1998).

Flip-flop method application to measure water fluxes at the level of a pedicel

The flip-flop method (Buy et al., 2018) was applied to a detached truss. Multiple experiments have been performed to measure the flip-flop (FF) signal at different repetition times in order to determine the mean flux velocity. For short repetition times below 100 ms, the FF signal is obviously null since no inflow or outflow is present. In our raw data images a Rice noise level of about 200 is observed with a typical signal to noise ratio of about 40. This noise level is naturally observed in the FF signal when TR tends to 0 ms. The flow in mm³ s⁻¹ can be deduced from the flux velocity and the active surface, or the area where we measured high FF signal changes corresponding to moving water. In our experiment, the mean velocity was equal to 0.155 mm s⁻¹, the active surface to 0.0175 mm² and so the flow to 0.027 mm³ s⁻¹, which is approximately equal to 0.1 g h⁻¹. We repeated these experiments the following day and found a mean velocity of 0.132 mm s⁻¹ and an active surface of 0.168 mm², so a flow of 0.022 mm³ s⁻¹, approximately equal to 0.08 g h⁻¹.

Compared to the simulated values, these fluxes are higher, but the measurements were done at the truss peduncle level, on a truss composed of 11 fruits, between fruit 3 and 4, so there were eight sinks after the zone of measurement. If we assume that the flux is similar for the next 8 fruits, we then obtain a mean flow per fruit of about 0.0125 g h⁻¹ for the first experiment, and 0.01 g h⁻¹ for the second experiment. These values are of the same order of magnitude as the phloem fluxes at the pedicel level simulated by the virtual fruit model. However, in Figure 4A the fluxes seem to be mainly located in the secondary xylem zone. Indeed, during the MRI experiment, the truss peduncle was immersed in a solution only made of distilled water and sugar, so the sieve elements of the phloem might have been blocked (Evert, 1982). So we cannot conclude that the fruit water entry occurred mainly in the xylem,

like in Windt et al. (2009) study. Further experiments have to be done with a solution preventing the sieve elements from blocking.

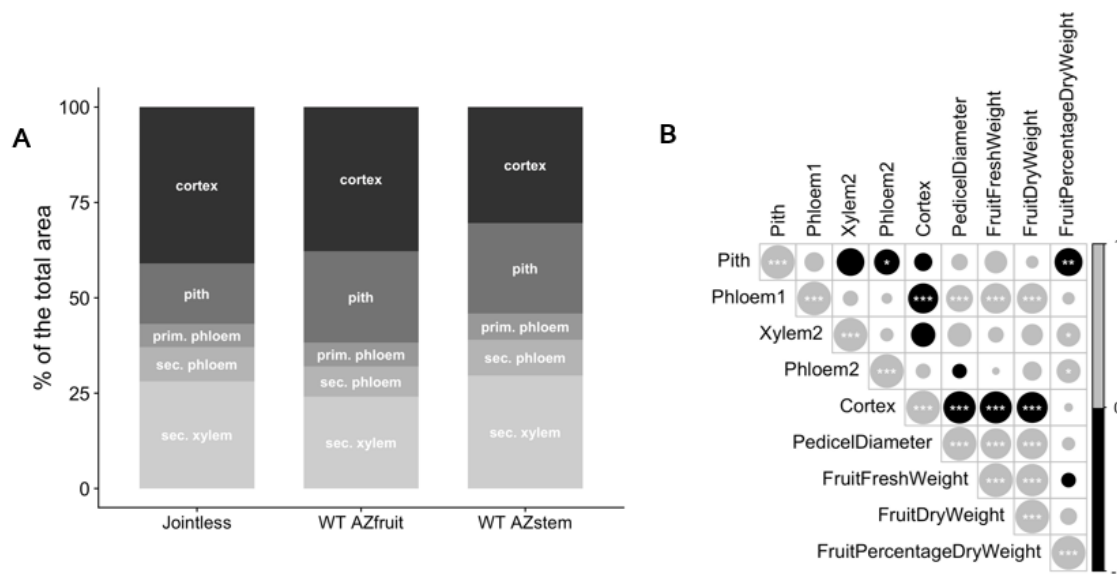


Figure 5. (A) Comparison of the mean surface proportion of the tissues in the pedicel section. WT AZfruit (mean of 6 fruits) stands for the pedicel of the wild-type genotype on the fruit side after the abscission zone. WT AZstem (mean of 5 fruits) stands for the pedicel of the wild-type genotype on the stem side, thus before the abscission zone. (B) Correlation matrix between the mean surfaces of the different tissues, expressed in percentage of the total slice surface, pedicel diameter, fruit fresh and dry weights, and the percentage of dry weight. The data used here are the 'Jointless' and the WT AZfruit ones. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. In grey: positive correlation, in black: negative correlation. Dot diameters are proportional to the correlation strength.

Moreover, the difference between the model simulation and the measured values may be explained by an underestimation of the xylem fluxes by the model. Also, the measurements were not done at the fruit entry, but before the abscission zone, where there may be a change in the water pathway to the fruit. Work is under progress in order to better determine exactly the active vessels at the fruit entry.

CONCLUSIONS

Our study shows that MRI is a useful and non-destructive technique to measure water fluxes at different locations within the plant. Combined to histological measurements, we can obtain quantitative data at the vessel level to improve model formalisms and parameterization and go beyond the limits of current approaches in plant ecophysiology. The investigations made on the model showed that flux simulations are sensitive to some parameters such as the conductivity of xylem and phloem. These parameters are estimated empirically, and flow-MRI is a very useful tool to distinguish the importance of xylem and phloem flows and the relative conductance of these pathways. Histological measurements showed that phloem and xylem surfaces were well correlated to fruit masses and that they play a pivotal role for water and sugar entry into the fruit. More experiments should be done in order to improve our understanding of how these conductances are affected by abiotic stresses such as water deficit.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been carried out thanks to the support of the “Investissements d’avenir” programme (Labex Agro: ANR-10-LABX-0001-01), under the frame of I-SITE MUSE (ANR-16-IDEX-0006).

Literature cited

- Baldazzi, V., Pinet, A., Vercambre, G., Bénard, C., Biais, B., and Génard, M. (2013). In-silico analysis of water and carbon relations under stress conditions. A multi-scale perspective centered on fruit. *Front Plant Sci* 4, 495 <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00495>. PubMed
- Bertin, N., Martre, P., Génard, M., Quilot, B., and Salon, C. (2010). Under what circumstances can process-based simulation models link genotype to phenotype for complex traits? Case-study of fruit and grain quality traits. *J. Exp. Bot.* 61 (4), 955–967 <https://doi.org/10.1093/jxb/erp377>. PubMed
- Bonnemain, J.L. (1968). Transport du 14C assimilé chez les solanacées. Ph.D. dissertation (Librairie Générale de l’Enseignement).
- Bussièrès, P., Bertin, N., Morris, C.E., Vigne, C., Orlando, P., Glaux, C., Sévenier, V., Floret, H., Bernadac, J., and Korownikoff, S. (2011). High external sucrose concentration inhibits the expansion of detached tomato fruits grown in a novel semi-open device. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47 (6), 743–751 <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9378-z>.
- Buy, S., Le Floch, S., Tang, N., Sidiboulouar, R., Zanca, M., Canadas, P., Nativel, E., Cardoso, M., Alibert, E., Dupont, G., et al. (2018). Flip-flop method: a new T1-weighted flow-MRI for plants studies. *PLoS ONE* 13 (3), e0194845 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194845>. PubMed
- Constantinescu, D., Memmah, M.M., Vercambre, G., Génard, M., Baldazzi, V., Causse, M., Albert, E., Brunel, B., Valsesia, P., and Bertin, N. (2016). Model-assisted estimation of the genetic variability in physiological parameters related to tomato fruit growth under contrasted water conditions. *Front Plant Sci* 7, 1841 <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01841>. PubMed
- Deb, K., Pratap, A., Agarwal, S., and Meyarivan, T.A.M.T. (2002). A fast and elitist multiobjective genetic algorithm: NSGA-II. *IEEE Trans. Evol. Comput.* 6 (2), 182–197 <https://doi.org/10.1109/4235.996017>.
- Evert, R.F. (1982). Sieve tube structure in relation to function. *Bioscience* 32 (10), 789–795 <https://doi.org/10.2307/1308972>.
- Fishman, S., and Génard, M. (1998). A biophysical model of fruit growth: simulation of seasonal and diurnal dynamics of mass. *Plant Cell Environ.* 21 (8), 739–752 <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00322.x>.
- Grange, R.I., and Andrews, J. (1994). Expansion rate of young tomato fruit growing on plants at positive water potential. *Plant Cell Environ.* 17 (2), 181–187 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb00281.x>.
- Guichard, S., Gary, C., Leonardi, C., and Bertin, N. (2005). Analysis of growth and water relations of tomato fruits in relation to air vapor pressure deficit and plant fruit load. *J. Plant Growth Regul.* 24 (3), 201–213 <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0040-z>.
- Hall, A.J., Minchin, P.E.H., Clearwater, M.J., and Génard, M. (2013). A biophysical model of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) berry development. *J. Exp. Bot.* 64 (18), 5473–5483 <https://doi.org/10.1093/jxb/ert317>. PubMed
- Ho, L.C., Grange, R.I., and Picken, A.J. (1987). An analysis of the accumulation of water and dry matter in tomato fruit. *Plant Cell Environ.* 10 (2), 157–162 <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11602110>.
- Liu, H.F., Génard, M., Guichard, S., and Bertin, N. (2007). Model-assisted analysis of tomato fruit growth in relation to carbon and water fluxes. *J. Exp. Bot.* 58 (13), 3567–3580 <https://doi.org/10.1093/jxb/erm202>. PubMed
- Mao, L., Begum, D., Chuang, H.W., Budiman, M.A., Szymkowiak, E.J., Irish, E.E., and Wing, R.A. (2000). JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 406 (6798), 910–913 <https://doi.org/10.1038/35022611>. PubMed
- Mazzeo, M. (2008). Xylem transport efficiency and calcium accumulation in fruit of *Actinidia deliciosa*: implications for fruit quality. Ph.D. thesis (Potenza: University of Basilicata).
- Plaut, Z., Grava, A., Yehezkel, C., and Matan, E. (2004). How do salinity and water stress affect transport of water, assimilates and ions to tomato fruits? *Physiol. Plant.* 122 (4), 429–442 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00416.x>.
- Saltelli, A., Ratto, M., Andres, T., Campolongo, F., Cariboni, J., Gattelli, D., et al (2008). Global Sensitivity Analysis: the Primer (Chichester: John Wiley and sons), <https://doi.org/10.1002/9780470725184>.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9 (7), 676–682

<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>. PubMed

Sharma, A.K. (1956). Fixation of plant chromosomes. *Bot. Rev.* *22* (10), 665–695 <https://doi.org/10.1007/BF02872457>.

Simon, J., Cardoso, M., Alibert, E., Valsesia, P., Vercambre, G., Verdeil, J.-L., Coillot, C., Goze-Bac, C., and Bertin, N. (2018). Combining flow-MRI method and modeling approach to assess water fluxes in tomato plant architecture. Poster presented at: 14th International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science (Rennes, France).

Tolivia, D., and Tolivia, J. (1987). Fasga: a new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. *J. Microsc.* *148* (1), 113–117 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb02859.x>.

Van As, H. (2007). Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long distance water transport. *J. Exp. Bot.* *58* (4), 743–756 <https://doi.org/10.1093/jxb/erl157>. PubMed

Windt, C.W., Gerkema, E., and Van As, H. (2009). Most water in the tomato truss is imported through the xylem, not the phloem: a nuclear magnetic resonance flow imaging study. *Plant Physiol.* *151* (2), 830–842 <https://doi.org/10.1104/pp.109.141044>. PubMed

ANNEXE 4

Investigation and integration of methods to better understand sap fluxes in tomato plant architecture

J. Simon^{1,2}, M. Cardoso², E. Alibert², J.-L. Verdeil³, G. Vercambre¹, C. Goze-Bac² and N. Bertin¹

¹INRAE UR1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles, Site Agroparc, 84914, Avignon, France; ²Université Montpellier-CNRS, Laboratoire Charles Coulomb UMR 5221, F-34095, Montpellier; ³UMR AGAP, CIRAD, Montpellier, France.

Abstract

Responses of plants to environmental stresses throughout growth and development are highly sensitive to their water and carbon status. Fruit growth and composition depend on availability of resources and their distribution within the network of source and sink organs. Because sap flow provides mineral nutrients and water to sink organs, there is a need to quantify it spatially and temporally in order to better understand fruit growth regulation under fluctuating environment. Nuclear Magnetic Resonance Imaging (MRI) is a direct and noninvasive method allowing the study of cell water balance and phloem and xylem transports in large plants. The objective of this study was to understand and quantify sap flow in the tomato plant architecture in response to water deficit, by combining MRI, histological observations and modeling. Histological measurements were done at the pedicel level to quantify the cross-sectional area of the conductive tissues in response to water deficit. Our measurements were compared to the predictions of a biophysical model that simulates fruit growth. Measurements of sap flow were done by implementing a novel flow-MRI method. MRI experiments were conducted at 9.4T, using inflow and outflow sensitive spin echo pulse sequences. These methods were applied to estimate sap fluxes in the main stem. The integration of these three techniques allowed us to obtain quantitative data at the vessel level to improve model parameterization and to go beyond the limits of current approaches in plant ecophysiology.

Keyword: *Solanum lycopersicum*, flow-MRI, xylem, phloem, histology, virtual fruit model

INTRODUCTION

In order to predict fruit production and quality, it is necessary to take into account the spatial and temporal variabilities of their mass and water contents. Both endogenous and external factors, such as abiotic stresses, impact local resource availabilities, and make the prediction of fruit quality and production complex. Process-based predictive models and functional-structural models have been developed in order to integrate knowledge on plant functioning and anticipate effects of stresses or irrigation strategies on fruit yield and quality (Fishman and Génard, 1998; Baldazzi et al., 2013). However, in order to evaluate and validate such models, there is a need for data on the movements of resources that are notoriously hard to measure.

In this study, we focus on water and carbon, two major resources that are critical for growth and development of fleshy fruits. These resources are transported through the conductive tissues network of the plant, the xylem and the phloem. The sap transported through the xylem vessels is mainly composed of water and minerals, and goes from the roots to the aerial organs. In photosynthetic organs, mainly leaves, sugar is produced and then transported with water and other compounds to the sink organs, such as fruits, through the phloem sieve elements. Xylem and phloem fluxes have been mainly investigated by means of destructive or indirect techniques. For example, heat girdling is a destructive method to destroy the phloem without affecting xylem conductivity (Van de Wal et al., 2017), which has been used to evaluate the relative contribution of xylem and phloem fluxes to tomato fruit growth (Guichard et al., 2005). Some nondestructive methods exist, such as measurements of stem diameter variations or measuring sap flow rate or sap flux density based on heat



dissipation (Vandegehuchte and Steppe, 2013 ; De Swaef et al., 2015). These methods are indirect since they give information at the level of the stem and not at the conductive vessel level. Here we report an in vivo measurement of fluxes at the conductive vessel level. For this purpose, we applied a technique commonly used in biomedical studies, called magnetic resonance imaging (MRI). This technique has been successfully applied to study plant water status (Van As, 2007). Using MRI, Windt et al. (2009) even showed novel results concerning the water entry in tomato fruit, suggesting that the xylem contribution would be much more important than commonly found with indirect methods. Indeed, classic ecophysiological studies had found that the majority of water going in the fruit was through phloem (Guichard et al., 2005). However, it is important to notice that Windt et al. (2009) study was done at the truss entry and not directly at the fruit pedicel.

Here we investigated and integrated new methods to quantify and better predict sap fluxes in tomato plant architecture in response to water deficit. We applied a flow-MRI method to measure the sap flux velocity and the active cross-sectional area at the main stem level. In addition, histological measurements gave us complementary information on the cross-sectional area and identify the conductive tissues, at the pedicel and at the main stem level. Our histological findings were then combined with a modeling approach able to estimate water and carbon fluxes at the fruit entry.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The study focuses on tomato (*Solanum lycopersicum* L.), and we used West Virginia 106 (WVA106), a cherry tomato cultivar. Plants were grown in a heated glasshouse in Avignon. As soon as the first truss appeared on the plants, two irrigation regimes were set up: A control consisting of full irrigation (based on ETP measurements), and a water deficit (WD) treatment consisting of a two-fold reduction of water supply. Trusses were pollinated with a vibrator and automatically watered with nutritive solution (Liquoplant Rose, Plantin, Courthézon, France).

Histology

We performed histological measurements to study the anatomy of the tomato stem and pedicel and to quantify the cross-sectional area of conductive tissues and their variations in response to WD. Six pedicels were sampled on different plants for the control and five for the WD treatment. Pedicels were sampled when the fruit was mature at identical positions in the plant for treatment comparison. Stem parts were sampled after the MRI experiments. In order to compare the image acquired by MRI and the scan of the histological slice, we sampled the stem parts that had been located in the MRI coil. We fixed the samples in a solution made of 9 volumes of absolute ethanol and 1 volume of acetic acid (Sharma, 1956). Then we embedded the samples in a 5% agarose gel (Ref. LE-8200-B, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and transversal slices were obtained using a vibratome (Microm HM650V, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Slices were 100 μm thick for the stem and 60 μm thick for the pedicel.

We treated the pedicel sections with bleach at 36° chlorogenic concentration to empty the parenchyma cells and increase the contrast between phloem and parenchyma and then stained them with FASGA according to the method described in Tolivia and Tolivia (1987). After staining, the red/pink zones indicate the cells with lignified walls (secondary xylem and support fibers) and the blue zones indicated the cells with non-lignified cellulosic walls (phloem and parenchyma). A digital slide scanner (NanoZoomer, Hamamatsu Photonics K. K., Hamamatsu City, Shizuoka, Japan) was used to convert our glass slides into high-resolution digital data. A histological pipeline was developed on Fiji (Schindelin et al., 2012) to calculate the cross-sectional area of xylem vessels and phloem sieve tubes.

Virtual fruit model

The Virtual Fruit is a process-based predictive model that simulates water and dry

matter accumulation and partitioning during fruit growth, considering the fruit as one big cell connected to the stem or pedicel conducting tissues (Fishman and Génard 1998; Hall et al., 2013). The inputs of this model are two climatic variables: Air temperature and humidity, and two plant variables: Stem water potential and phloem sugar concentration. Changes in fruit water content over time are calculated as the sum of xylem and phloem influx, minus the water outflow due to fruit transpiration. Water and sucrose move from the stem through the pedicel vasculature, and then to the fruit through composite membranes. In the fruit, xylem and phloem fluxes are calculated from non-equilibrium thermodynamic equations involving the surface of exchange, which is assumed to be proportional to the fruit surface area. The calculation also involves hydraulic conductivity, solute reflection coefficients of the membrane separating the fruit from the conducting tissues of the stem, and hydrostatic and osmotic pressures, calculated from the molar concentrations of osmotically active compounds (Liu et al., 2007). According to Hall et al. (2013), phloem flow in the pedicel depends on the pedicel phloem axial conductance (L_{p1}) and on the turgor pressure and osmotic potential difference between the stem and the fruit. Xylem flow is driven by the hydrostatic pressure difference between the stem xylem and the fruit xylem and depends on the pedicel xylem axial conductance (L_{x1}). It is assumed that during pedicel growth, L_{p1} evolves proportionally to L_{x1} , but later in the season, L_{p1} is assumed to stay constant, whereas L_{x1} drops.

The virtual fruit was calibrated for the genotype WVA106 based on data of fruit dry and fresh masses collected on control plants grown in a glasshouse. We used the NSGA-II algorithm (Deb et al., 2002) to find the best combination of parameters to predict the experimental dry and fresh masses. The outputs of this algorithm depend on the random initial values chosen, so the optimization was repeated 10 times. The output variables we are focusing on in our study, are the xylem and phloem fluxes in the pedicel, which are simulated by the model.

Flow-MRI: the flip-flop method

Magnetic resonance imaging (MRI) is used to produce parametric images of the interior of biological organisms in a noninvasive manner. It relies on nuclear magnetic resonance (NMR) principles, based on the electromagnetic properties of the spin of atomic nuclei. Hydrogen (^1H) is the most commonly used atom in MRI experiments, which gives direct information on the tissue water content and its dynamic (Van As, 2007). In the present study, the experiments were performed on an Agilent MRI scanner working at 9.4T, corresponding to 400 MHz for the ^1H nuclei. The experimental set-up on living systems is based on a horizontal MRI scanner, forcing the plant to be placed horizontally in a cradle, moving inside a 10cm diameter clear bore magnet. The environmental conditions within the MRI scanner are partially controllable; the experiment is located in a climatized room (20°C), and a heater regulates the temperature at 25°C at the center of the magnetic field. To pick up the magnetization recovery of the ^1H nuclei, the resonance frequency of the coil is tuned at 400 MHz. To perform experiments on tomato stem, we used an openable saddle-coil designed for measuring samples up to 14 mm in diameter.

A novel flow-MRI method called flip-flop (Buy et al., 2018) was applied to measure water fluxes, both in upward and downward directions. Two pulse sequences measuring inflow and outflow weighted images of the same slice were performed, allowing slow flow-sensitive imaging. With this method, we were able to measure xylem fluxes in the main stem of the plant, at different heights: At the bottom of the plant (right below the first truss), at the middle (right below the fifth truss), and at the top (between the two last trusses, number 8 and 9). The mean flux velocity was assessed by fitting the experimental data with the following expression: $FF = r.M_0.exp(-TR/T1)$, where M_0 is for the total magnetization, TR the repetition time (s), $T1$ longitudinal relaxation time (s) and r the inflow factor which depends on the velocity (Buy et al., 2018). MRI measurements produce a map of fluxes velocities and emphasize the active conductive vessels. Matlab routines were developed to process the images and to estimate the active cross-sectional areas, velocities as well as fluxes.

The MRI experiment presented here was performed on a plant that was about 2 m tall and having 9 trusses. The plant was transferred to an indoor growth chamber three weeks

before the MRI measurements in order to adapt to constant light (PPFD~300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and temperature (20 to 22°C) conditions.

Data processing and statistical analysis

Histological data were analyzed with the R software (R Core Team, 2017). Kruskal-Wallis tests were used to compare the relative cross-sectional area of the conductive tissues, the pedicel diameter and the fruit fresh mass, between control and WD treatments. The flip-flop data were processed with MATLAB (MATLAB, 2016).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of water deficit at the pedicel level

We quantified the cross-sectional area of the internal and external phloem and secondary xylem at the pedicel level to evaluate their relationship with the pedicel diameter and the fruit fresh and dry masses and to investigate the effect of water deficit on these traits.

Water deficit significantly decreased the pedicel diameter (Figure 1A) and the fruit fresh mass (Figure 1B) by about 20% ($p < 0.01$).

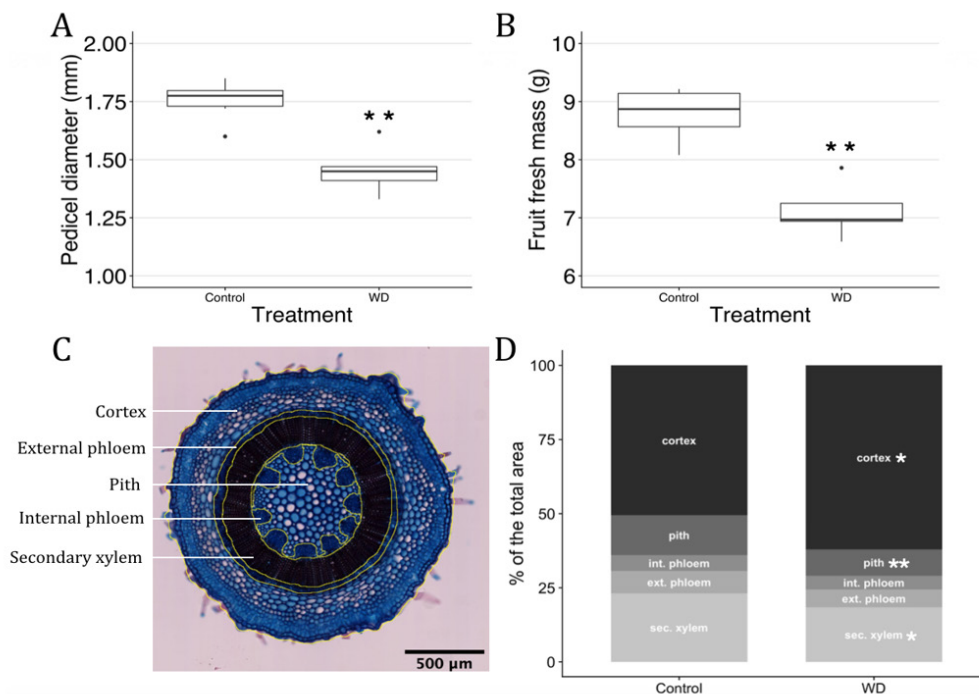


Figure 1. Pedicel and fruit traits measured on WVA106 at the ripe stage under control and water deficit conditions. (A) Pedicel diameter in mm. (B) Fruit fresh mass in g. (C) Histological slice of a WVA106 pedicel (control). FASGA stained. Thickness: 60 μm . The yellow lines correspond to the segmentation of the different tissue types. This segmentation is done using a histological plugin developed on Fiji and the area of each zone is measured. (D) Comparison of the mean cross-sectional area proportion of the tissues in the pedicel section in response to water deficit. Control: 6 pedicels. WD: 5 pedicels. Stars indicate significance differences between the two treatments: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Concerning the tissue cross-sectional areas, we observed a significant increase in the relative cross-sectional area of the cortex, and a significant decrease of both the relative pith cross-sectional area and relative secondary xylem cross-sectional area (Figure 1D).

Therefore, the relative cross-sectional areas of the tissues were affected by WD.

Although not measured here the vessel diameter might also have been affected as well as reported in grapevine, in which it has been shown that WD decreased the diameter of xylem vessels (Lovisolo and Schubert, 1998). It would be interesting to investigate the diameter of phloem sieve tubes and xylem vessels further in order to supply information on the conductive network response to the environment, and be able to evaluate the parameterization of the Virtual Fruit model.

Simulation of fruit growth in response to water deficit

The aim here was to confirm the links between fruit mass reduction and surface area of conducting tissues under water deficit, using the virtual fruit model.

For the phloem conductance, as pedicel diameter was reduced by 20% under water deficit (Figure 1A), but with no reduction in the phloem proportion of the pedicel section, the phloem conductance was reduced by 20% during the whole fruit growth. For the xylem conductance, in addition to the pedicel diameter reduction, the xylem proportion was decreased also by 20% (Figure 1D). Therefore, the xylem conductance was decreased by 36% compared to the control. All other parameters were unchanged and were similar under both treatments.

The simulation covers the period of rapid fruit growth after cell division; it starts at 10 day after anthesis and lasts 28 days. The final fruit fresh weight in the control simulation was 9.86 g fruit⁻¹, whereas in the water deficit simulation the final weight was equal to 8.80 g. So, the reduction of the xylem and phloem conductance at the pedicel level led to a 12% decrease of the simulated fruit fresh mass. In our experiment, we measured a 20% decrease of the fruits fresh mass in response to WD (Figure 1B). Thus, the modification of only two parameters allowed to explain more than 50% of the fruit fresh mass decrease under water deficit. Other parameters, such as the initial mass of the fruit, the stem water potential or the sap viscosity may have also an important role on the final fresh mass of the fruit under water deficit (Bussi eres 2002; Constantinescu et al., 2016). Also, besides effects of pedicel diameter and the relative cross-sectional area of the conductive tissues on Lx1 and Lp1, these conductances are also highly sensitive to the diameters of the vessels and sieve elements, according to Poiseuille's law. Effects of the WD on network traits (cross-sectional area, number, diameter) should be further investigated to better simulate their effect on fruit growth.

Flip-flop method application to measure water fluxes at the main stem level

The flip-flop method (Buy et al., 2018) was applied at different heights of the main stem of a tomato plant. We performed multiple flip-flop (FF) experiments at different repetition times in order to determine the mean flux velocity. The time length of the experiments depended on the repetition time and lasted from 4 min to 40 min, so the total FF experiments lasted 3 h. From the flux velocity and the area of active cross-sectional areas it is possible to deduce the water flux in mm³ s⁻¹.

At the bottom of the main stem we measured a mean velocity of 0.145 mm s⁻¹ and an active cross-sectional area of 3.584 mm² (Figure 2E). So, the water flow is equal to 0.518 mm³ s⁻¹, which is approximately equal to 2 g h⁻¹. If we compare the FF image (Figure 2A) to the histological slice (Figure 2B), we see that the active tissues are xylem vessels. At this level we measured only upward fluxes, which is coherent with the fact that all the fruits and almost all the leaves are located higher in the plant and so downward fluxes are supposed to be almost null.

At the middle of the stem, we measured a mean velocity of 0.261 mm s⁻¹ and an active cross-sectional area of 0.852 mm² (Figure 2F). So, the flow is equal to 0.222 mm³ s⁻¹, which is approximately equal to 0.8 g h⁻¹. At this level of the plant, we were expecting to measure both upward and downward fluxes since growing fruits and many leaves were located both higher and lower in the plant, but we measured only upward fluxes. Also, we did not measure any phloem flux. More investigations is needed to understand if the absence of phloem fluxes is linked to the plant environmental conditions (especially low radiation) or to the sensitivity of the method.

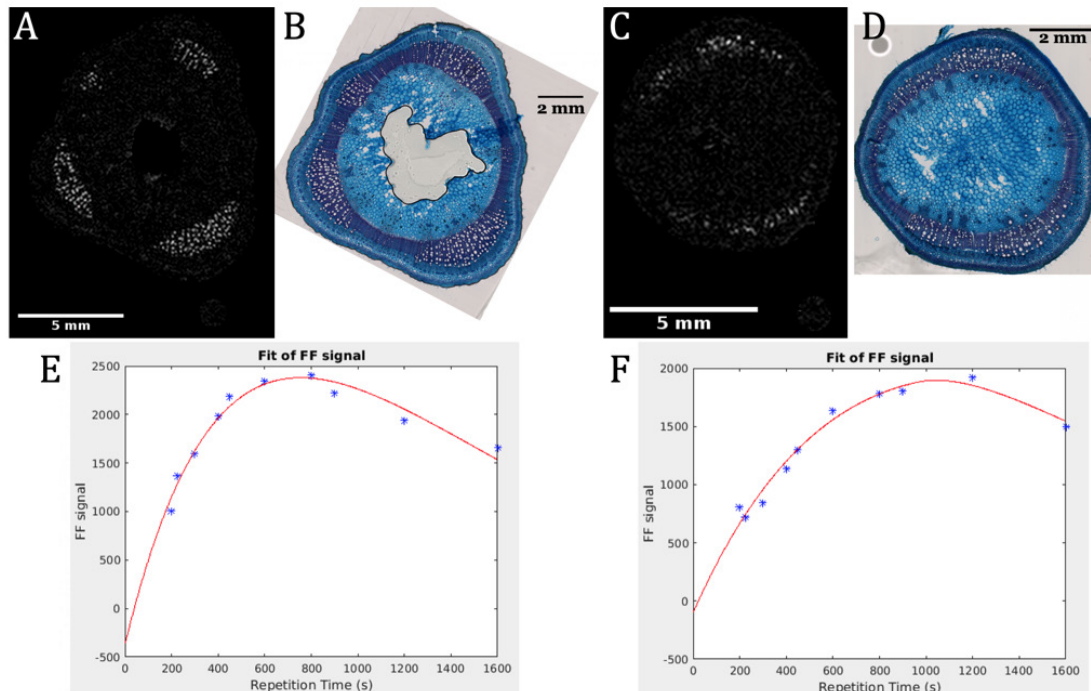


Figure 2. (A) and (C) Inflow MRI images of the main tomato stem at different heights. Repetition time: 1200 ms, slice thickness: 0.5 mm and echo time: 12 ms. The white area represents a high flip-flop signal, corresponding to the active vessels evidenced by flow-MRI measurements. (A) Bottom of the main stem, under the first truss. (C) Middle of the main stem, under the fifth truss, the plant having 9 trusses. (B) and (D) Histological FASGA stained slices of the same parts of the plant. Thickness: 100 μm . (E) and (F) Flip-flop signal as a function of the repetition time in second. The stars represent the measured flip-flop intensities at different repetition times and the red curve its best fit. (E) Flip-flop signal at the bottom of the plant. Parameters of the best fit: $T_1=755$ ms, active area of 3.584 mm^2 and mean velocity of 0.145 mm s^{-1} . (F) Flip-flop signal at the middle of the plant. Parameters of the best fit: $T_1=1230$ ms, active area of 0.852 mm^2 and mean velocity of 0.522 mm s^{-1} .

Again, looking at the FF image (Figure 2C) and at the histological slice (Figure 2D), we identify the active tissues as being xylem like. Then, at the top of the plant, between the two last trusses, the FF signal that we measured was too low for quantifying and determining flow velocity. Comparing the values of upward fluxes measured at the bottom of the plant to the one measured at the middle of the plant, we can see that active cross-sectional areas decreased toward the top of the plant, but the mean velocity increased.

Compared to other MRI studies on tomato (Windt et al., 2006), the sap flux values measured in this study are ten times lower than the ones reported previously. This could be related to the different environmental conditions in both studies. Indeed, with our horizontal MRI, we can light only 10% of the leaves, and we measured the flux as soon as the plant was installed, without pre-adaptation to the magnet environment.

CONCLUSIONS

This study combined several techniques in order to quantify water fluxes at different levels of the plant. At the pedicel level, histological measurements can give useful information to evaluate the Virtual Fruit model parameterization. At the stem level, a direct and nondestructive MRI technique gives us information on the flux velocity, but also on the vessel functionality. The combination of MRI with histological measurements informs us on the

nature of the conductive tissues. A promising follow-up to this work would be to perform MRI experiment at the pedicel level and to use a vertical MRI, in which we would be able to keep the plant inside the magnet for several weeks and thereby reduce plant stress due to manipulation. Another possibility would be to use a functional structural plant model to go further in the comprehension of flux variations within the plant architecture.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out thanks to the support of the (Investissements d'avenir) programme (Labex Agro:ANR-10-LABX-0001-01), under the frame of I-SITE MUSE (ANR-16-IDEX-0006). The work was realized with the technical support of Béatrice Brunel (INRA PSH) and Christelle Baptiste (CIRAD AGAP).

Literature cited

- Baldazzi, V., Pinet, A., Vercambre, G., Bénard, C., Biais, B., and Génard, M. (2013). *In-silico* analysis of water and carbon relations under stress conditions. A multi-scale perspective centered on fruit. *Front. Plant Sci.* 4, 495 <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00495>. PubMed
- Bussièrès, P. (2002). Water import in the young tomato fruit limited by pedicel resistance and calyx transpiration. *Funct. Plant Biol.* 29 (5), 631–641 <https://doi.org/10.1071/PP00144>. PubMed
- Buy, S., Le Floch, S., Tang, N., Sidiboulouar, R., Zanca, M., Canadas, P., Nativel, E., Cardoso, M., Alibert, E., Dupont, G., et al. (2018). Flip-flop method: A new T1-weighted flow-MRI for plants studies. *PLoS One* 13 (3), e0194845 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194845>. PubMed
- Constantinescu, D., Memmah, M.M., Vercambre, G., Génard, M., Baldazzi, V., Causse, M., Albert, E., Brunel, B., Valsesia, P., and Bertin, N. (2016). Model-assisted estimation of the genetic variability in physiological parameters related to tomato fruit growth under contrasted water conditions. *Front. Plant Sci.* 7 (18), 1841 <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01841>. PubMed
- De Swaef, T., De Schepper, V., Vandegheuchte, M.W., and Steppe, K. (2015). Stem diameter variations as a versatile research tool in ecophysiology. *Tree Physiol.* 35 (10), 1047–1061 <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv080>. PubMed
- Deb, K., Pratap, A., Agarwal, S., and Meyarivan, T.A.M.T. (2002). A fast and elitist multiobjective genetic algorithm: NSGA-II. *IEEE Trans. Evol. Comput.* 6 (2), 182–197 <https://doi.org/10.1109/4235.996017>.
- Fishman, S., and Génard, M. (1998). A biophysical model of fruit growth: simulation of seasonal and diurnal dynamics of mass. *Plant Cell Environ.* 21 (8), 739–752 <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00322.x>.
- Guichard, S., Gary, C., Leonardi, C., and Bertin, N. (2005). Analysis of growth and water relations of tomato fruits in relation to air vapor pressure deficit and plant fruit load. *J. Plant Growth Regul.* 24 (3), 201–213 <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0040-z>.
- Hall, A.J., Minchin, P.E.H., Clearwater, M.J., and Génard, M. (2013). A biophysical model of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) berry development. *J. Exp. Bot.* 64 (18), 5473–5483 <https://doi.org/10.1093/jxb/ert317>. PubMed
- Liu, H.F., Génard, M., Guichard, S., and Bertin, N. (2007). Model-assisted analysis of tomato fruit growth in relation to carbon and water fluxes. *J. Exp. Bot.* 58 (13), 3567–3580 <https://doi.org/10.1093/jxb/erm202>. PubMed
- Lovisolò, C., and Schubert, A. (1998). Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in *Vitis vinifera* L. *J. Exp. Bot.* 49 (321), 693–700.
- MATLAB (2016). Version 9.0.0 (R2016a). Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing).
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9 (7), 676–682 <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>. PubMed
- Sharma, A.K. (1956). Fixation of plant chromosomes. *Bot. Rev.* 22 (10), 665–695 <https://doi.org/10.1007/BF02872457>.
- Tolivia, D., and Tolivia, J. (1987). Fasga: a new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. *J. Microsc.* 148 (1), 113–117 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb02859.x>.
- Van As, H. (2007). Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long distance water transport. *J. Exp. Bot.* 58 (4), 743–756 <https://doi.org/10.1093/jxb/erl157>. PubMed

Van de Wal, B.A.E., Windt, C.W., Leroux, O., and Steppe, K. (2017). Heat girdling does not affect xylem integrity: an *in vivo* magnetic resonance imaging study in the tomato peduncle. *New Phytol.* 215 (2), 558–568 <https://doi.org/10.1111/nph.14610>. PubMed

Vandegheuchte, M.W., and Steppe, K. (2013). Corrigendum to: Sap-flux density measurement methods: working principles and applicability. *Funct. Plant Biol.* 40 (10), 1088–1088 https://doi.org/10.1071/FP12233_CO. PubMed

Windt, C.W., Vergeldt, F.J., de Jager, P.A., and van As, H. (2006). MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant Cell Environ.* 29 (9), 1715–1729 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01544.x>. PubMed

Windt, C.W., Gerkema, E., and Van As, H. (2009). Most water in the tomato truss is imported through the xylem, not the phloem: a nuclear magnetic resonance flow imaging study. *Plant Physiol.* 151 (2), 830–842 <https://doi.org/10.1104/pp.109.141044>. PubMed

RÉSUMÉ

Face à l'évolution du climat et à la raréfaction d'un certain nombre de ressources, les stress biotiques et abiotiques sont de plus en plus fréquents et de nouvelles stratégies doivent être mises en place dans l'étude du développement et du fonctionnement de la plante. Les ressources en eau et carbone sont des déterminants majeurs de la croissance des fruits, dont la quantification à des échelles temporelles et spatiales variables est un enjeu majeur. Parmi les nombreuses méthodes permettant de quantifier leurs flux, la plupart sont destructives ou indirectes. La démocratisation d'une technologie non invasive basée sur l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) donnant accès à des mesures précises de qualité et quantité des flux dans la plante, permettrait de dépasser les limites des approches actuelles en écophysiologie végétale. Ce travail de thèse porte sur la tomate, une plante modèle et le second fruit le plus consommé dans le monde. Le principal objectif était de développer et d'appliquer des méthodes IRM pour mesurer les flux d'eau dans la plante de tomate. Le second objectif était de coupler ces investigations IRM à des approches histologiques afin d'évaluer les liens structure-fonction des tissus conducteurs. Le troisième enjeu était d'utiliser la modélisation comme outil d'intégration des connaissances acquises afin d'identifier des traits anatomiques et fonctionnels potentiellement impliqués dans la plasticité génétique et environnementale des déterminants des flux. Pour répondre à ces questionnements, nous avons combiné mesures histologiques à différentes échelles de la plante (pédicelle et tige), expérimentations IRM réalisées sur un scanner IRM de 9,4T et modélisation écophysiologique de la tomate pour intégrer les résultats. Nous avons mis en évidence une forte variabilité génétique de la surface des tissus conducteurs à l'entrée des fruits ainsi qu'une réduction en réponse au déficit hydrique. Ces variations contribuaient à expliquer en partie la variabilité de masse fraîche et de matière sèche des fruits. Une méthode IRM basée sur le principe d'entrée de coupe a été développée puis appliquée à différents niveaux de la tige principale en condition témoin et en conditions de déficit hydrique. Nous avons mis en évidence une réduction des flux xylémiens le long de la tige principale qui s'explique par une diminution de la surface active du bas vers le haut de la tige, alors que la vitesse du flux est relativement stable. Enfin, nous avons utilisé un modèle structure fonction afin d'intégrer les principaux résultats obtenus, notamment concernant la conductivité théorique déduite des mesures IRM. Cette intégration a clairement montré l'importance de mesurer *in situ* les flux et les potentiels hydriques pour mieux estimer les conductances dans le xylème. Cette exploration a permis de développer un cadre conceptuel dans le but d'étudier de manière non destructive les flux d'eau chez la tomate et chez d'autres espèces. Ce travail ouvre également des perspectives afin de mesurer des flux phloémiens ainsi que des flux au niveau du pédicelle du fruit, qui sont des données importantes pour améliorer les modèles d'allocation des ressources dans la plante.