

AGROCAMPUS
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



Année universitaire :2016-2017

Spécialité :

Production et technologies du végétal

Spécialisation (et option éventuelle) :

Qualité et valorisation des produits
végétaux

Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Mesures par relaxation et imagerie RMN de paramètres biologiques impliqués dans le contrôle de la croissance en volume du fruit chez différentes espèces horticoles

Par : Kévin Bidault

Stagiaire à l'IRSTEA, 17 avenue de Cucillé, 35000 Rennes

Soutenu à Rennes le 13septembre 2017

Devant le jury composé de :

Président : C Deleau

Maître de stage :M Musse/ N Bertin

Enseignant référent : F Cabello- Hurtado

Rapporteur 1 : M Delaire

Rapporteur 2 : A Bouchereau

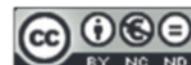
Examineur : A Gravot

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»

disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Confidentialité

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible ⁽¹⁾.

Date et signature du maître de stage ⁽²⁾ :

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur⁽³⁾ **Bidault Kevin**

autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si oui, il autorise

- la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾
- la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif) accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-By-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'auteur :

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

- la diffusion papier du mémoire uniquement(4)
- la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé
- la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

Je tiens à remercier Maja Musse, ma maîtresse de stage pour m'avoir permis de réaliser au sein de l'équipe IRM food à l'IRSTEA. Je la remercie pour toutes les connaissances sur la techniques IRM qu'elle a pu me transmettre et son soutien au cours des manipulations, pour son travail au quotidien dans l'encadrement de mon stage.

Je remercie aussi Nadia Bertin, ma maîtresse de stage à l'INRA d'Avignon pour l'aide qu'elle m'a apporté sur la construction de mon rapport et mes interprétations d'analyses mais aussi pour son organisation lors de mes voyages à Avignon afin que je puisse réaliser une partie des mesures biologiques présenté dans mon rapport.

Merci à Stephane Quellec qui m'a appris à me servir de l'outil principal de mon stage : l'IRM, mais qui m'a aussi épaulé en cas de problèmes lors des manipulations. Je le remercie aussi pour son aide lors des traitements et la programmation pour le traitement des images IRM.

Merci à Béatrice Brunel d'avoir eu la patience de me transmettre ces connaissances sur les mesures de potentiel hydrique et de comptage cellulaire et surtout son aide pour me permettre de réaliser le comptage de l'ensemble des échantillons.

Merci à Doriane Bancel et Patricia Laugier pour m'avoir réalisé les dosages biochimiques sur l'ensemble de mes échantillons en temps et en heures afin de me permettre d'avoir ces résultats à temps pour les intégrer dans mon rapport.

Enfin, je tiens à remercier le GIS fruit pour m'avoir permis de réaliser mon stage de fin d'étude grâce au financement de ce projet et j'espère que les résultats que nous avons récolté permettront d'avancer dans le développement de méthode d'évaluation de la qualité.

Contenu

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	3
Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire	3
Les techniques d'IRM appliquées à l'étude du végétal	4
Mécanismes de relaxation	4
Exemples d'application de la technique sur les végétaux.....	5
Le développement et la qualité des fruits: cas de la pomme et de la pêche.....	6
Matériel et méthodes.....	8
Matériel végétal	8
Plan expérimental.....	9
IRM.....	9
Traitement des images	10
Analyses biologiques	11
Analyse des données	12
Résultat	12
IRM.....	12
Analyses biologiques	14
Evolution des paramètres hydriques au cours de la croissance	14
Evolution de la concentration en sucres et acide au cours de la croissance	15
Croissance cellulaire au cours du développement du fruit	16
Corrélations des données IRM et biologiques	17
Discussion.....	19
Modifications des paramètres biologiques au cours de la croissance.....	19
Evolution des paramètres IRM au cours de la croissance.....	19
Influence des paramètres biologiques sur les temps de relaxation en cours de croissance	20
Conclusion	22

Introduction

La qualité des fruits à la récolte et son maintien au cours du conditionnement post récolte jusqu'à la consommation est un enjeu important pour la filière fruit. La couleur, la taille, la forme, la composition et la texture sont des composantes essentielles de la qualité organoleptique et nutritionnelle. Ces composantes sont évaluées en général via des méthodes physico-chimiques qui nécessitent la destruction de l'échantillon. La recherche s'intéresse aujourd'hui au développement d'outils et méthodes non destructives, telles que les méthodes physiques (Spectroscopie et Imagerie par Résonance Magnétique (RMN, IRM), imagerie en infrarouge (IR)), qui sont complémentaires des méthodes destructives et permettent de mesurer simultanément plusieurs critères de qualités sur un même fruit et de suivre leur évolution au cours du stockage ou d'une transformation.

L'Imagerie par Résonance Magnétique a été développée pour les applications médicales, mais elle s'est révélée prometteuse pour l'étude de la qualité des produits végétaux. En effet, la méthodologie dans le domaine des végétaux développée récemment ouvre de nouvelles perspectives car l'IRM permet en plus de la visualisation de la morphologie interne des fruits et légumes, l'accès à des informations sur la structure des tissus à l'échelle cellulaire. En effet, l'IRM permet d'accéder à l'échelle d'un voxel (élément de volume) à des informations sur l'état et la distribution de l'eau cellulaire, ainsi que d'estimer la microporosité (quantité relative des gaz enfermés dans les espaces intercellulaires des tissus végétaux) via des mesures de cartographies des temps de relaxation RMN (longitudinale (T_1) et transversale (T_2)). Les principaux facteurs impactant le signal IRM sont connus, mais il n'est pas encore possible d'établir un lien direct entre les temps de relaxation mesurés par IRM et la physiologie et biochimie du tissu végétal observé. Afin de pouvoir mieux exploiter les méthodes IRM, il est important de corréliser les mesures IRM avec les observations physiologiques classiquement faites sur le fruit afin d'analyser et hiérarchiser l'influence des différentes caractéristiques (histologique (taille et organisation des cellules), biophysiques (pression de turgescence, perméabilité membranaire) et biochimiques) sur le signal de relaxation RMN/IRM.

Au cours de ce stage, j'ai donc appliqué l'IRM pour la mesure des paramètres physiques des fruits au cours de leur développement. L'objectif est double :

- Corréler ces marqueurs à des observations biologiques obtenues via des méthodes destructives classiques en écophysiologie.
- Identifier des marqueurs IRM des changements structuraux et de la composition du fruit au cours de son développement.

Nous avons choisi de suivre par l'IRM les modifications du temps de relaxation transversal (T_2) et de microporosité apparente, ces deux paramètres ayant été démontrés pertinents pour refléter les caractéristiques tissulaires (Musse et al., 2009a). Nous avons ensuite réalisé sur les mêmes

fruits des analyses destructives (dosages des constituants métaboliques, dénombrement de cellules, analyse des classes de taille cellulaire, mesure de densité du fruit, mesure des potentiels hydriques et osmotiques du péricarpe) afin de caractériser au mieux le fruit au cours de son développement. Ces analyses nous ont permis de mettre en relation les images IRM et les données physico-chimiques des fruits afin de chercher des corrélations entre les deux types de mesure. La variation spatiale des paramètres mesurés par IRM a été analysée et prise en compte dans la réalisation des mesures destructives classiques.

Les fruits étudiés dans cette étude sont la pêche et la pomme. Ces fruits sont parmi les plus cultivés et consommés en France (la pomme tient la première place) et ont donc une grande importance économique. Les deux espèces appartiennent à la famille des Rosaceae mais présentent des caractéristiques différentes de mise en réserve des glucides au cours du développement du fruit (amidon ou sucres solubles) et de développement d'embryon (pépins ou noyau). Pour la pêche, nous avons choisi de suivre 2 charges en fruit différentes, une faible charge en fruit où seul un fruit est gardé par rameaux et une forte charge en fruit où aucun éclaircissement n'a été réalisé. Cela nous a permis de vérifier la généralité de la méthode utilisée pour l'étendre à l'avenir sur d'autres fruits ou légumes pour des utilisations appliquées. Les résultats de ce stage ont pour objectif final d'aider la filière fruit à avancer dans la caractérisation des fruits au cours de croissance via de nouvelles méthodes non destructives.

Mes travaux ont été réalisés en collaboration avec deux organismes : l'Institut national de recherche agronomique (INRA) d'Avignon et d'Angers et l'Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture (IRSTEA) de Rennes. L'unité de recherche PSH (Plantes et Systèmes de culture Horticoles) de l'INRA d'Avignon étudie l'impact de différents facteurs (pratiques agricoles, environnement) sur le développement et la croissance de la plante et la qualité des fruits produits au travers d'approches expérimentales et de modélisation. L'équipe IRM Food de l'IRSTEA cherche à accroître les connaissances sur la structure des produits agricoles et agro-alimentaires, sur produits natifs ou en condition de transformation, tout en développant des méthodes IRM et RMN adaptées à l'étude de ces produits. Cette collaboration permet d'établir un lien entre les connaissances biologiques du développement du fruit et la maîtrise de la technique IRM, permettant ainsi d'optimiser et développer cet outil émergent dans l'étude des végétaux, et en particulier de la croissance et de la qualité des fruits dans le cadre de mon stage.

Cette étude a été soutenue par le groupement d'intérêt scientifique (GIS) fruit, dont l'objectif est d'accroître les connaissances sur l'élaboration de la qualité et développer des outils d'évaluation pour répondre à la demande de la filière. Le GIS fruit regroupe 22

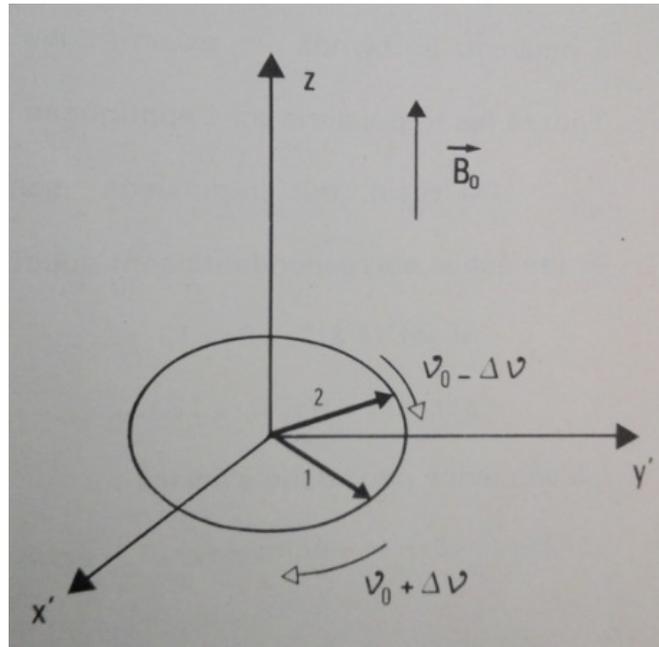


Figure 1 : Schéma du décalage de phase entre les spins au cours du phénomène de relaxation (T2) après avoir appliqué un champ magnétique B1 perpendiculaire au champ B0 (Bernard A.M, De Certaines J.D, Le Jeune J.J , 1988, p47). ν_0 correspond à la fréquence de rotation du proton, $\Delta\nu$ représente la différence de fréquence de rotation entrainant le décalage de phase

partenaires de la filière fruitière et s'efforce de mettre en place une stratégie commune allant de la recherche jusqu'au transfert d'innovation vers les acteurs économiques. Son but est de mettre en relation les performances économiques, sociales et environnementales.

Synthèse bibliographique

Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire

L'IRM est une technique d'imagerie basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire qui repose sur les propriétés quantiques des noyaux atomiques (Bernard A.M, De Certaines J.D, Le Jeune J.J ,1988). Les noyaux sont composés de neutrons et de protons qui, par un mouvement de rotation, peuvent induire un moment cinétique appelé spin, aligné sur leur axe de rotation, et par conséquent un moment magnétique colinéaire au spin. Les noyaux atomiques avec un nombre impair de protons, de neutrons ou des deux possèdent un spin nucléaire non nul (^1H , ^{13}C , ...). Placés dans un champ magnétique statique (B_0), le spin nucléaire peut s'aligner soit dans la même direction soit dans la direction opposée au champ. Ces orientations sont caractérisées par deux niveaux d'énergie, le niveau d'énergie le plus faible contenant plus de protons. Les protons ainsi orientés précessent à une fréquence de résonance (fréquence de Larmor, ω_0) proportionnelle à l'intensité du champ magnétique B_0 , où la constante de proportionnalité est égale au rapport gyromagnétique (γ). L'aimantation résultant d'un ensemble de spins peut être basculée par rapport à B_0 grâce à une impulsion de radiofréquence (RF) B_1 appliquée à la fréquence de Larmor. Ceci correspond au passage des protons du niveau d'énergie faible vers le niveau le plus haut. Le retour à l'équilibre de Boltzmann des protons est appelé le phénomène de relaxation. On distingue 2 types de relaxation : la relaxation spin-réseaux (T_1) dans laquelle l'énergie pour revenir à l'état d'équilibre est dissipée dans le milieu (repousse de l'aimantation sur l'axe Z) et la relaxation spin-spin (T_2) correspondant à la perte de cohérence de phase dans le retour à l'équilibre des spins (disparition de l'aimantation dans le plan XY)(Figure 1). Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresseront à la relaxation T_2 .

Pour réaliser une image IRM, il est nécessaire de coder le signal RMN dans l'espace. On utilise pour cela des gradients de champ magnétique dans les 3 directions qui, en se superposant au champ magnétique principal selon un timing très précis, permettent de faire varier la fréquence de précession et de coder l'ensemble du volume observé. La reconstruction de l'image est possible grâce à la transformée de Fourier inverse.

Lorsqu'on applique une séquence d'acquisition IRM (succession d'applications de gradients de champs magnétique, d'impulsions RF et de lectures du signal à une cadence définie par

le temps de répétition (TR)), nous pouvons contrôler plusieurs facteurs permettant de faire varier le contraste dans l'image résultante. Il est possible ainsi d'obtenir des images dont le contraste est principalement dominé par un des paramètres de relaxation (pondération T_1 ou T_2) ou la densité protonique (quantité des noyaux par voxel).

Des séquences IRM spécifiques permettent d'obtenir des cartographies des paramètres de relaxation des tissus. Pour la mesure des temps de relaxation T_2 , on utilise la séquence écho de spin qui consiste en l'application d'une impulsion RF 90° qui va basculer l'aimantation dans la plan XOY suivie, après un temps $TE/2$, d'une impulsion RF de 180° dont le rôle est de refocaliser la phase des spins due à la dispersion en fréquence provoquée par les inhomogénéités du champ magnétique B_0 . On obtient un écho à un temps TE (temps d'écho) après la première impulsion RF quand les spins des noyaux sont à nouveau en phase. La mesure de l'intensité des échos est ensuite répétée à plusieurs (N) impulsions RF de 180° afin d'échantillonner la courbe de décroissance en une seule excitation. A chaque $N*TE$ on mesure un écho et donc une image. Les signaux de relaxation IRM mesurés dans chaque voxel sont modélisés par des courbes de décroissance mono (pour $i=1$) ou multi-exponentielles :

$$I(t) = \sum_{i=1}^n I_{0i} \times e^{-\frac{t}{T_{2i}}}$$

où T_{2i} et I_{0i} sont le temps de relaxation transversal et l'amplitude de la composante i du signal multi-exponentiel. Les valeurs de paramètres de relaxations pour chaque pixel sont obtenues en ajustant le modèle aux données par la méthode de régression avec les moindres carrés (algorithme de Levenberg-Marquardt). Cette méthode nécessite une connaissance a priori du nombre de composantes du signal de relaxation, ainsi que des valeurs initiales des paramètres.

Il est également possible de mesurer par IRM des cartographies des temps de relaxation T_2^* qui représente la relaxation transversale dans le cas où les inhomogénéités de champ ne sont pas compensées. Cette mesure est réalisée par la séquence en écho de gradient où on refocalise le signal pour produire un écho à l'aide du gradient de lecture et pas d'une impulsion RF de refocalisation. La cartographie T_2^* , combinée à la cartographie T_2 permet d'estimer la microporosité apparente comme décrit dans (Musse et al., 2010).

Les techniques d'IRM appliquées à l'étude du végétal

Mécanismes de relaxation

L'IRM est principalement basée sur le signal de l'eau qui est une molécule que l'on retrouve dans l'ensemble des tissus vivants. Son temps de relaxation T_2 caractérise son état. Le temps de relaxation T_2 dépend de la mobilité de la molécule portant le noyau étudié; T_2

diminue quand la mobilité diminue. Par exemple, dans le cas de l'eau pure, on en déduit que le T_2 diminue avec la diminution de la température. Dans le cas des systèmes hydratés contenant des solutés (comparable à la solution cellulaire), on peut distinguer quatre types de protons ayant des temps de relaxation différents : les protons de l'eau sans interaction avec d'autres molécules, les protons de l'eau d'hydratation ou en interaction avec des macromolécules, les protons échangeables avec des macromolécules (OH, NH₂, SH, ...) et les protons non échangeables des macromolécules (Winisdorffer, 2014). Si l'échange chimique entre les trois premières populations de protons est rapide et l'échange diffusionnel entre les molécules d'eau est aussi rapide, on mesure une seule courbe de relaxation correspondant à la combinaison des trois courbes de relaxation de chacune de ces populations de protons. On considère que cette hypothèse est valable dans les tissus végétaux et qu'on mesure par conséquent un seul paramètre de relaxation par compartiment cellulaire.

La membrane plasmique et le tonoplaste étant des membranes perméables, on retrouve des échanges d'eau et de solutés entre les compartiments cellulaires plus ou moins rapide selon le coefficient de diffusion des molécules. Si la diffusion des molécules au travers de la membrane est plus lente que le temps de relaxation des protons, on va pouvoir dissocier les temps de relaxation des compartiments (Van As 2007).

Exemples d'application de la technique sur les végétaux

On retrouve aujourd'hui un grand nombre d'articles utilisant l'IRM pour des études du fonctionnement des plantes. Dans les cellules végétales, cette technique permet par exemple de différencier distinctement trois compartiments : la vacuole, le cytoplasme et la paroi/matrice extracellulaire (Snaar and Van As, 1992) dû à l'interaction de l'eau avec son environnement au sein de ces compartiments. Comme dit précédemment, la vitesse lente des échanges nous permet de dissocier ces 3 compartiments car chacun a un temps de relaxation caractéristique. On peut aussi réaliser une quantification du pourcentage relatif d'eau que contiennent ces compartiments par rapport au pourcentage total d'eau dans la cellule (intensité relative). L'eau est majoritairement retrouvée dans la vacuole, puis dans le cytoplasme et peu dans la membrane et matrice extracellulaire.

De nombreux paramètres biologiques comme la taille des cellules, leur forme, les espaces intercellulaires, la composition chimique des tissus modifient fortement les résultats de l'analyse IRM comme décrit dans (Musse et al., 2009b). Cette étude a montré que le temps de relaxation pouvait varier en fonction de la taille des cellules, les cellules les plus petites ayant un T_2 plus court. Cette étude montre aussi un impact de la concentration en sucres et de la teneur en eau sur les temps de relaxation. Les méthodes IRM permettent diverses

application tel que la mesure des flux de sève et la caractérisation des vaisseaux conducteurs via la mesure de flux et des temps de relaxation, ce qui est difficile par les méthodes écophysiologiques actuelles (Hochberg et al., 2016; Morandi et al., 2014; Windt et al., 2006). Il est possible via un aimant puissant (4,7T) de réaliser une cartographie 3D du réseaux vasculaire de petits fruits (Moriwaki et al., 2014). Des études ont été faites sur la modification du fruit au cours de sa maturation. (Ishida et al., 1997) ont regardé la modification de la teneur en eau et en composés solubles pendant le murissement de la cerise. Ils ont démontré que la modification de teneur en eau entraîne une modification des temps de relaxation dans le fruit. (Clark and MacFall, 2003) ont réalisé une étude sur le kaki en regardant les paramètres biologiques à différents stades du développement et ont essayé de les mettre en relation avec le temps de relaxation sans pouvoir mettre en évidence de paramètres précis influençant le temps de relaxation. Ils ont cependant remarqué que la concentration en sucre est un des paramètres qui influent sur le temps de relaxation. (Clark et al., 1998) ont mis en évidence qu'on peut relier le temps de relaxation avec la composition chimique des cellules du fruit et notamment les sucres. Le temps de relaxation peut être modifié par de grosses molécules présentes dans la cellule telles que l'amidon (Raffo et al., 2005). Lors de sa dégradation, on va avoir une variation du T_2 due à la dépolymérisation et à une libération importante de groupement hydroxyle qui vont interagir avec les protons de l'eau (Clark et al., 1997).

Cette méthode non invasive permet aujourd'hui d'étudier des plantes en cours de leur développement comme l'on fait (Geya et al., 2013) sur des poires directement au verger. Ils ont mesurés les temps de relaxation des fruits situés en bout de branches tout au long de leur développement. Ils ont comparé ces temps de relaxation à ceux obtenu avec les fruits récoltés le même jour. Cette méthode est peu singulière mais plusieurs équipes tentent de la développer.

Le caractère non invasif de l'IRM est un atout incontestable de la méthode.

Un des paramètres importants qui peut être mesuré par IRM est la porosité des tissus végétaux. La différence de susceptibilité magnétique entre l'eau et l'air conduit à la modification du champ magnétique aux interfaces entre les deux milieux et impacte la mesure du temps de relaxation T_2 et particulièrement T_2^* (Musse et al., 2010). La présence d'ion paramagnétique conduit aussi à la modification des temps de relaxation.

[Le développement et la qualité des fruits: cas de la pomme et de la pêche](#)

La formation du fruit se fait suite à la pollinisation de la fleur et la fécondation des ovules au niveau de l'ovaire. Le schéma de développement qui suit la fécondation diffère selon l'espèce considérée. La pomme présente un développement relativement uniforme (Eccher

et al., 2014) alors que la pêche présente un développement formant une courbe sigmoïde (Lombardo et al., 2011). Le développement de la pomme peut être divisé en quatre étapes que sont : la division cellulaire, l'élongation cellulaire, la maturation et le murissement (Janssen et al., 2008). Dans le cas du développement de la pêche, la courbe sigmoïde s'explique par un développement en deux temps et décrit par cinq étapes : forte division cellulaire et élongation, lignification de l'endocarpe formant le noyau, seconde phase de multiplication cellulaire et élongation, maturation et murissement du fruit (Lombardo et al., 2011).

Au cours du développement, les propriétés des parois cellulaires évoluent, pouvant entraîner des modifications des propriétés physiques de la pomme comme sa fermeté. Au cours du murissement, une lyse des molécules pariétales (hémicellulose) conduit à un ramollissement du fruit (Percy et al., 1997). Ces modifications peuvent être différentes d'une variété à une autre, on peut donc supposer que cela n'est pas transposable à l'ensemble des fruits (Volz et al., 2003).

La présence d'un stress peut conduire à une modification du développement du fruit. En effet, c'est la pression de turgescence qui conduit à l'élongation cellulaire, une quantité trop faible d'eau peut donc conduire à une taille de cellule plus petite et donc des fruits de plus petites tailles. Les potentiels hydrique et osmotique sont contrôlés par l'accumulation de composés compatibles dans la cellule. Cela conduit à une entrée d'eau massive dans la cellule d'où le besoin de mesurer le potentiel osmotique et hydrique dans notre étude (Baldazzi et al., 2013). La modification de la taille de la cellule et sa composition sont deux paramètres importants à prendre en compte.

Chez la poire, on peut voir un effet négatif du stress hydrique par une diminution du flux de sève (xylème et phloème) permettant d'apporter les nutriments nécessaires au développement du fruit (Morandi et al., 2014). (Morandi et al., 2010) ont aussi mis en évidence que lors d'un stress hydrique, la transpiration est un paramètre permettant de maintenir la qualité et le bon développement du fruit par l'augmentation de la concentration en solutés solubles et donc un appel d'eau constant. Certains stress induisent un changement de structure, le stress hydrique peut conduire à une modification de la membrane plasmique ce qui la rend poreuse et modifie donc la compartimentation cellulaire et entraîne un échange d'eau et de soluté non contrôlé.

La charge en fruit des arbres est un paramètre que nous avons voulu suivre et qui conduit à de nombreux changements dans la physiologie du fruit. (Wu et al., 2005) ont mis en évidence que la position du fruit sur la branche a un effet sur la qualité du fruit, un arbre ayant une forte charge en fruit peut présenter des fruits de qualités différentes. Ils ont aussi montré que des arbres à faible charge donnent des fruits plus gros (plus de masse sèche) car le ratio nombre de feuille/nombre de fruit est plus grand, la concentration en métabolite tel que les



Figure 2: Photographie d'un pêcher avec une forte charge en fruits. Aucune action n'a été menée pour diminuer le nombre de fruit.

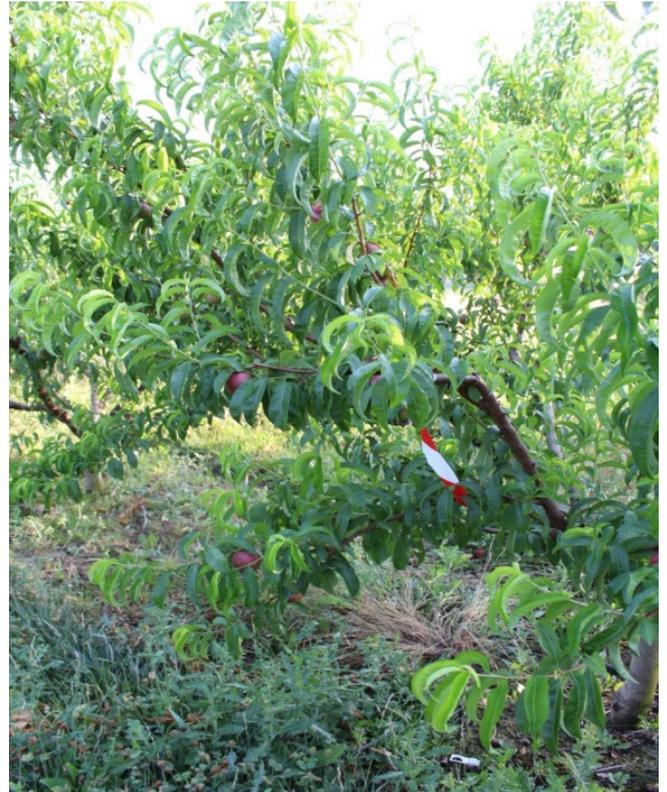


Figure 3: Photographie d'un pêcher avec une faible charge en fruits. Seul un fruit a été conservé par rameau, les autres ont été enlevés manuellement.

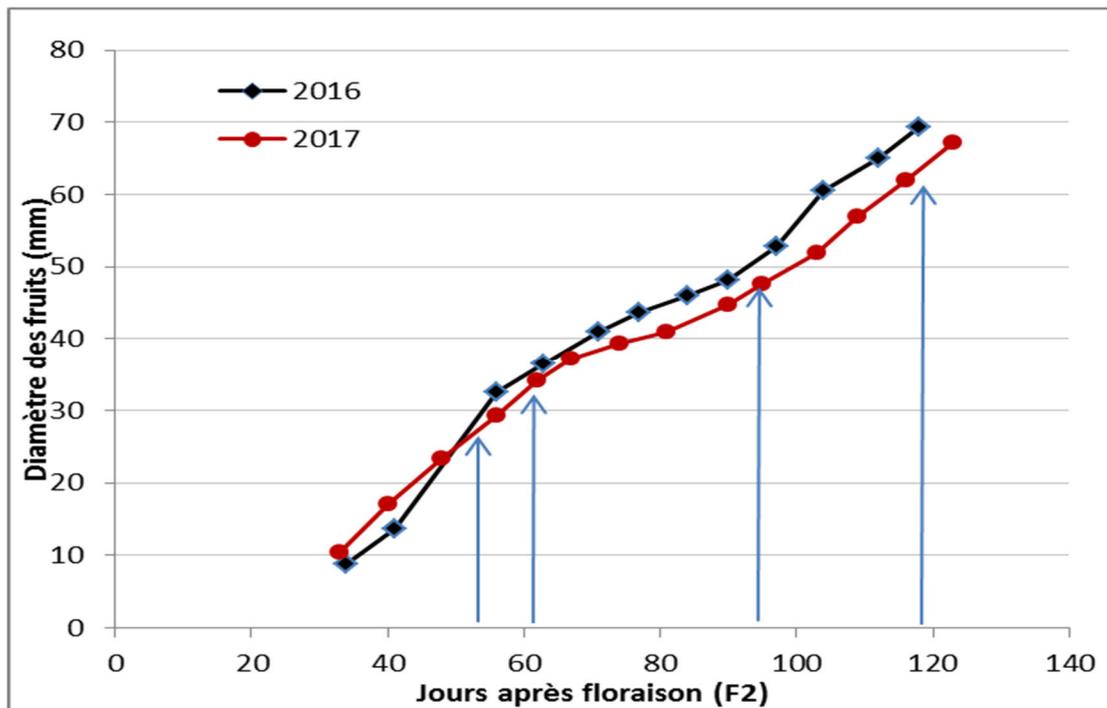


Figure 4: Courbe de croissance de la pêche (forte charge) en fonction du nombre de jours après floraison pour l'année 2017 (comparaison année 2016). Les flèches représentent les dates auxquelles nous avons effectué les prélèvements. F2 correspond au jour où la moitié des arbres

sucre est donc aussi plus grande. L'étude de (Wu et al., 2002) a confirmé que la teneur en citrate augmente au cours de la croissance pour finir par chuter à la fin du développement.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Nous avons travaillé sur 2 espèces fruitières. Les pêches (*Prunus persica* sp Nectarlove) proviennent du verger expérimental de l'INRA d'Avignon. La parcelle a été conduite comme en production. Les fruits étudiés ont été récoltés sur des arbres à deux charges en fruits, une charge forte sans éclaircissage des arbres (Figure 2) et une charge faible avec un fruit par rameau (Figure 3). Avec l'éclaircissage, on attend une taille supérieure des fruits, ainsi qu'une composition biochimique différente. Quatre prélèvements ont été effectués au cours de la croissance du fruit pour la première condition (charge forte) afin d'avoir un suivi représentatif du développement. En considérant les données de croissance de la pêche pour l'année 2016 et étant donné que le 9 mars 2017, 50% de la parcelle était au stade floraison, les prélèvements ont été faits les 2 mai, 9 mai, 12 juin et 6 juillet (Figure 4). Lors du premier prélèvement, le noyau est en croissance, puis au deuxième sa croissance est presque terminée. Le troisième prélèvement intervient au début de croissance du péricarpe du fruit, enfin le dernier prélèvement est réalisé proche de la maturité, lorsque le développement du fruit est terminé. Pour la deuxième condition (arbres à charge en fruits faible), les fruits ont été prélevés au moment des deux derniers prélèvements correspondants à la première condition.

Les pommes (*Malus domestica* sp Reine des reinettes) proviennent du verger expérimental de l'INRA d'Angers. La culture des pommiers a été réalisée selon l'itinéraire technique utilisé dans les vergers chez les producteurs de la filière. Le stade de pleine floraison a eu lieu le 10 avril 2017 sur la parcelle de récolte. Les arbres ont été éclaircis pour ne garder qu'un fruit par inflorescence. Des gelées au printemps ont modifié la dynamique de croissance des fruits (Figure 5) par rapport à l'année précédente (données non disponibles) et par conséquent le planning des mesures établi au début de l'étude. Quatre prélèvements ont donc été effectués aux dates suivantes : 6 juin, 3 juillet, le 7 août et le 28 août.

Les pêches prélevées à Avignon ont été acheminées à Rennes par transporteur (24h de délai). Les pommes ont été transportées par voiture, directement après leur récolte au verger. Les fruits ont été conditionnés individuellement dans des pots hermétiques ou bien par lot dans des sacs plastiques fermés afin de limiter les pertes en eau puis conservés au réfrigérateur entre le moment de leur réception et les analyses.

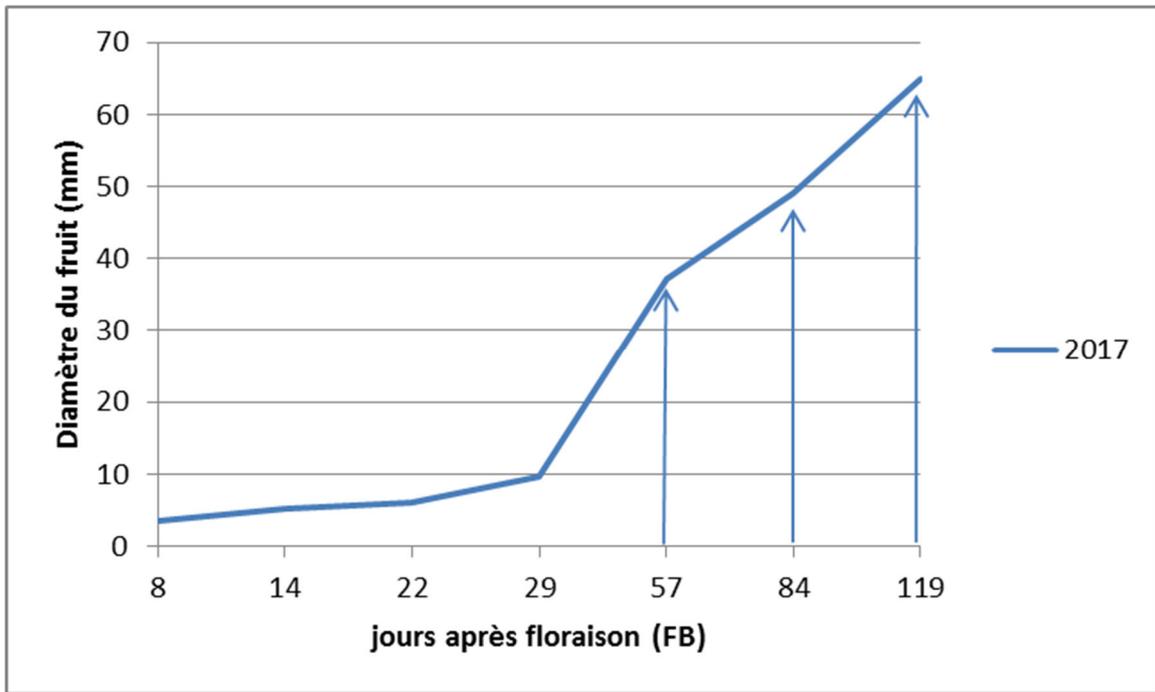


Figure 5: Courbe de croissance de la pomme variété Reine des reinettes en fonction de degrés jour après floraison. FB est le jour où l'ensemble des arbres du verger sont à pleines floraison. La croissance de la pomme est plutôt linéaire, La courbe est en 2 temps avec une première partie de croissance faible puis une croissance plus importante à partir de 29 jours après floraison. Les flèches représentent les dates auxquelles nous avons réalisé les prélèvements

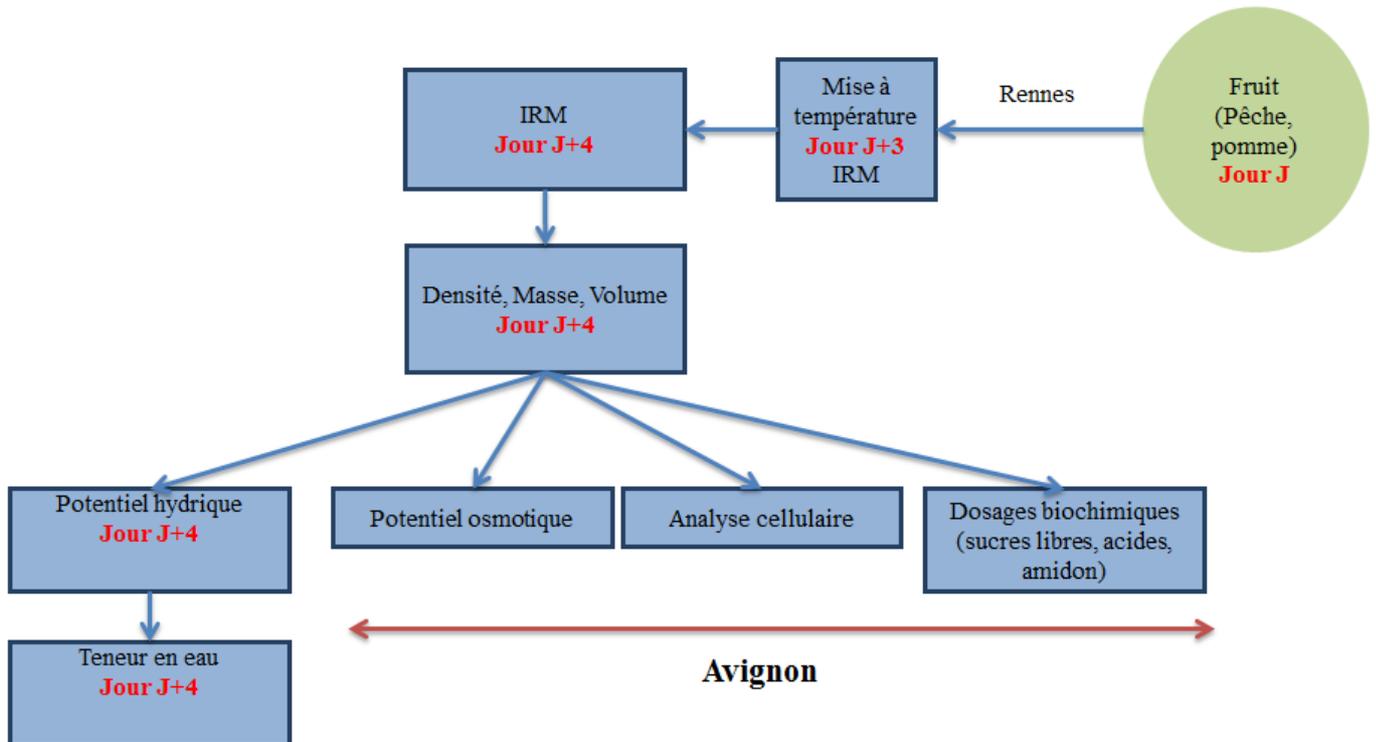


Figure 6: Présentation schématique du plan expérimental suivi lors de nos analyses, de la récolte des fruits jusqu'au traitement des échantillons. Les indications en rouge renseignent le nombre de jours après récolte des différentes opérations. Les analyses réalisés à Avignon ont été faites sur les échantillons congelés (potentiel osmotique/ dosages biochimiques) ou fixé et maintenus au froid (analyses cellulaires). Nous avons envoyé ces échantillons dans de la carboglace ou dans des glacières pour permettre leur conservation.

Plan expérimental

Les mesures IRM ont été réalisées en premier sur les fruits analysés. Le jour avant la mesure IRM, les fruits ont été emballés dans du cellophane afin d'éviter la transpiration lors de la mesure IRM et placés dans la cage de Faraday (19°C) environ 13 heures avant la première acquisition afin de les stabiliser en température. Le centre de la coupe analysée a été préalablement tracé sur chaque fruit, afin de permettre le prélèvement des échantillons pour les méthodes destructives à l'endroit exact de la mesure IRM. Le nombre de fruits analysés par IRM varie en fonction de la taille des fruits (dépendant du stade). Une fois l'analyse IRM terminée, la densité, la masse et le volume ont été mesurés sur chacun des fruits, puis les échantillons ont été préparés pour les mesures biologiques destructives (Figure 6). Le potentiel hydrique étant le paramètre le plus sensible à la transpiration, il est mesuré en premier. Les échantillons utilisés pour les mesures de potentiel osmotique et les dosages biochimiques ont été congelés à l'azote liquide puis stockés au congélateur (-21°C) et les échantillons pour l'analyses cellulaires ont été conservés au réfrigérateur. Ces analyses ont été réalisées a posteriori à l'INRA d'Avignon. Les différentes analyses biologiques nécessitant des quantités de tissus variables, le nombre de fruits utilisés pour chaque analyse varie en fonction du stade de développement donné. Dans les cas où cela était possible, les péricarpes interne et externe, sélectionnés sur la base des images IRM, ont été dissociés pour les analyses biologiques. Lors du premier stade, nous avons utilisé le péricarpe de deux fruits pour la mesure du potentiel hydrique et trois fruits pour les dosages biochimiques (3 grammes de matière fraîche minimum). Pour les autres analyses, un seul fruit suffisait. Pour le stade 2, un fruit était utilisé par analyse sauf pour le dosage biochimique (2 fruits). Pour le stade 3, le péricarpe entier d'un seul fruit est utilisé pour le dosage biochimique et il est dissocié (interne et externe) pour les autres analyses. Au dernier stade, le péricarpe est dissocié pour toutes les analyses. Le temps d'analyse complet hors mesures IRM a toujours été inférieur à 3h.

IRM

Les images IRM ont été acquises avec un aimant supraconducteur de 1.5T (Avanto, Siemens, Erlangen, Allemagne) équipé de l'antenne tête fermée. Les fruits sont installés sur un dispositif permettant de les disposer à deux niveaux dans l'antenne (pour les 3 premiers stades). Les paramètres de relaxation étant sensibles à la température, la température des fruits a été contrôlée au cours des analyses par les fibres optiques. De plus, deux tubes de références ont été utilisés pour suivre la stabilité des mesures IRM au cours d'une mesure et entre les différentes campagnes de mesures.

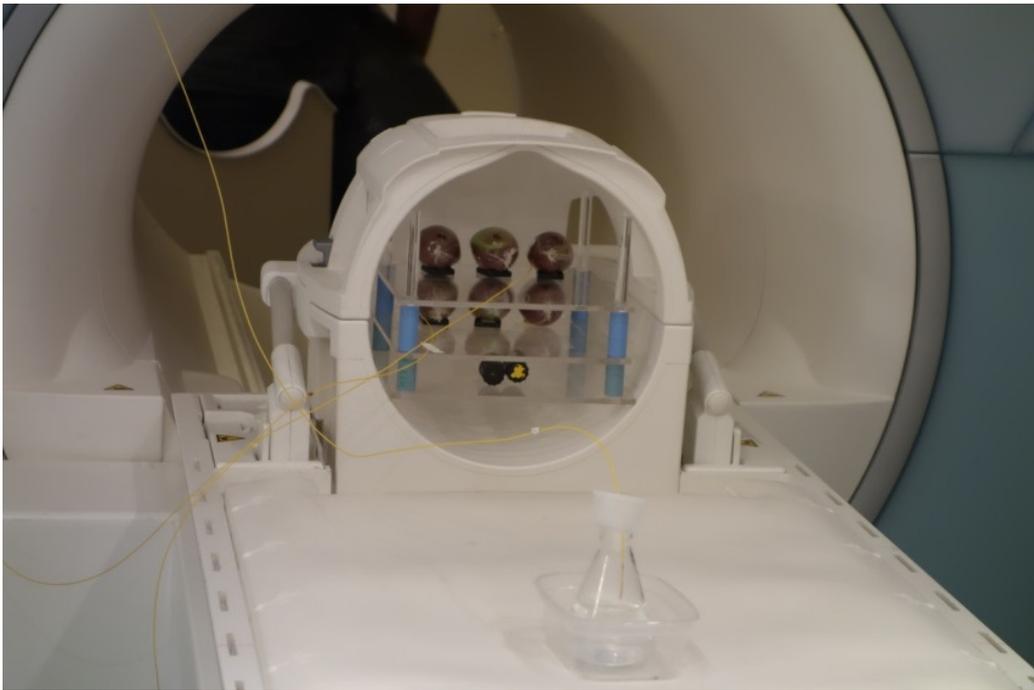


Figure 7: Dispositif expérimental permettant l'analyse des fruits au cours de croissance. On peut voir le dispositif permettant de placer les fruits à deux niveaux dans l'antenne tête fermée ainsi que les fibres optiques permettant le suivi de température au cours des analyses. Les 2 bouchons noirs en bas du dispositif sont ceux des tubes témoins (huile minérale et eau) servant de témoins pour vérifier la répétabilité de la mesure IRM. Cette image correspond à une acquisition des pêches du stade 3 (6 fruits).

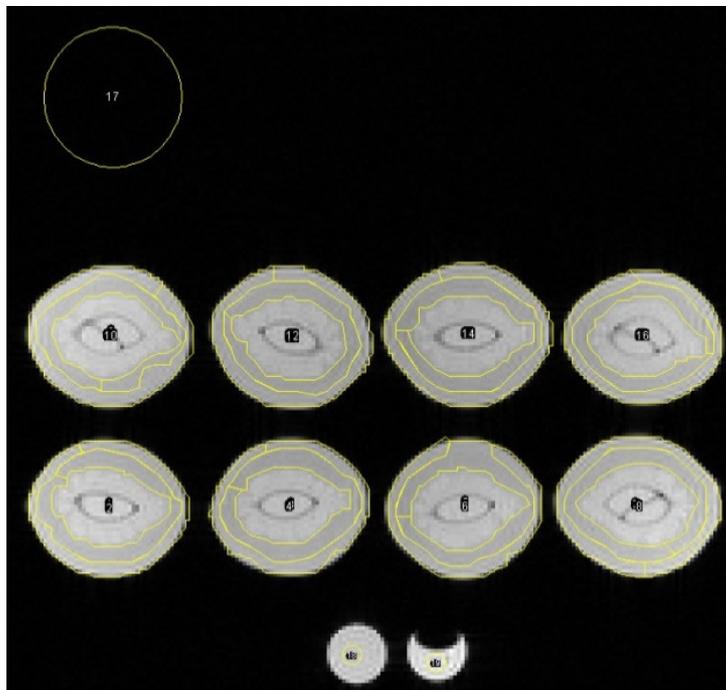


Figure 8: Représentation des ROI permettant le découpage du péricarpe en 2 parties (intérieur et extérieur). Ces ROIs sont tracés manuellement grâce au logiciel Image J. Le cercle dans le fond permet de calculer le rapport signal sur bruit (SNR). Des ROIs sont tracés dans les tubes témoins pour connaître leur temps de relaxation (mono exponentiel).

Les paramètres d'acquisition ont été fixés au début de l'étude et gardés constants pour les analyses réalisées à différents stades de croissance des fruits. La mesure IRM est faite sur une coupe centrale considérée comme représentative du fruit. Les paramètres géométriques utilisés sont: épaisseur de coupe=5 mm , matrice = 192 x 192 pixels, champ de vue (FOV)= 152 x 152 mm² pour les pêches et 162 x 162 mm² pour les pommes. Par conséquent, pour le premier stade de croissance des fruits, nous avons mesuré 10 pêches en superposant 2 rangs de 5 fruits et 8 pommes avec 2 rangs de 4 fruits. Pour les stades plus tardifs, nous avons dû diminuer le nombre de fruits par analyse (8 pour le stade 2, 6 pour le stade 3 et 4 pour le stade 4) (Figure 7).

Le T₂ est mesuré par la séquence multi échos de spin avec les paramètres suivants: 256 échos, TE= 6.5ms, TR= 10s, 4 excitations, résultant en une durée d'acquisition de 2h08min. Le T₂* est mesuré par la séquence multi échos de gradient avec les paramètres suivants : TE= 2.27ms pour le premier écho puis, temps inter écho= 1.58ms, TR=5s, 17 excitations, résultats en une durée d'acquisition de 4h32min.

Traitement des images

Les paramètres de relaxation ont été estimés avec la méthode Levenberg-Marquardt selon deux approches. Dans le premier cas, les paramètres de relaxation sont calculés pour chaque pixel afin d'obtenir une cartographie des T₂ mono-exponentiels, permettant ainsi la visualisation de la distribution spatiale des paramètres de relaxation. Dans le deuxième cas, le signal des pixels correspondant à un tissu donné est moyenné sur une région d'intérêt (ROI) permettant d'optimiser le rapport signal sur bruit (RSB) des données. Dans ce cas, on trace grâce au logiciel Image J des régions d'intérêt (figure 8) dans les zones des péricarpes interne et externe des fruits, ainsi qu'une large ROI dans une zone vide (air) afin de calculer le RSB selon la formule :

$RSB = I_{\text{moy-per}} / (I_{\text{moy-bruit}} / \sqrt{(\pi/2)})$, avec $I_{\text{moy-per}}$ la moyenne des niveaux de gris dans le péricarpe sélectionné et $I_{\text{moy-bruit}}$ la moyenne de niveau de gris dans le fond (bruit).

Les paramètres de relaxation sont estimés à partir des données ayant RSB > 7 (méthode permettant d'optimiser l'ajustement) avec le logiciel TableCurve 2D. Les données ont été ajustées selon les modèles bi- et tri-exponentiel et le meilleur des deux ajustements (par rapport aux erreurs sur les paramètres ajustés et le r²) a été retenu pour l'analyse. T₂* a été extrait de l'ajustement mono-exponentiel.

Les valeurs de microporosité apparente sont calculées à partir des valeurs des T₂ et T₂* selon la formule issues de (Musse et al., 2010) :

$$\varepsilon = \frac{9\sqrt{3}R_2^\#}{2\pi\gamma\Delta\chi B_0}$$

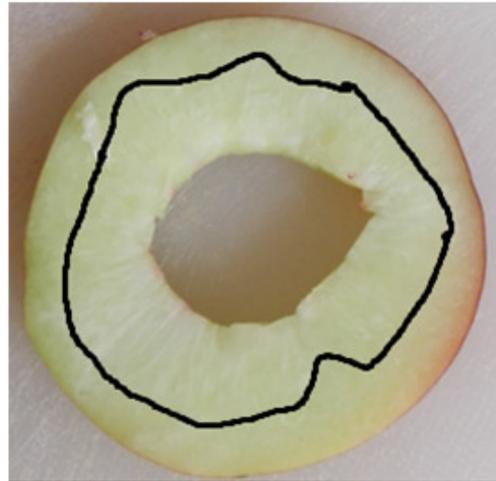
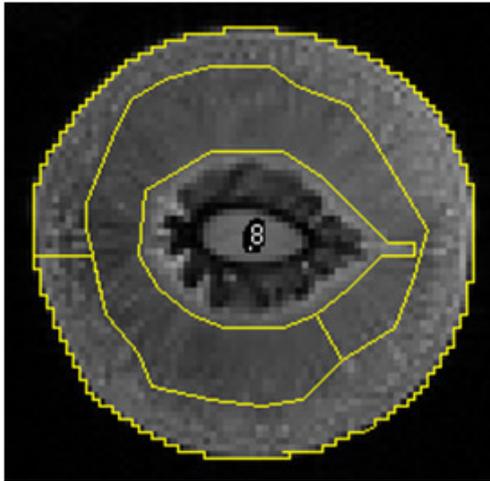


Figure 9: Représentation schématique de la dissociation des péricarpes interne et externe dans le fruit pour les analyses biologiques à partir des images IRM.

où ε est la porosité, γ est le rapport gyromagnétique du proton et $\Delta\chi$ la différence de susceptibilité entre l'eau et l'air et $R_2^\# = \frac{1}{T_2^*} - \frac{1}{T_2}$.

Le temps de relaxation est accompagné d'une intensité relative qui est le pourcentage de l'intensité d'une composante du signal par rapport à l'intensité totale du signal. Cette intensité varie en fonction du modèle d'ajustement que l'on choisit.

Analyses biologiques

La densité du fruit est mesurée par déplacement d'eau lors de l'immersion du fruit dans une éprouvette, par rapport à la densité de l'eau connue (1g/cm³ à 20°C).

Les mesures suivantes sont réalisées sur le tissu du péricarpe (mésocarpe) prélevé sur la coupe (de 5mm d'épaisseur) analysée en IRM ([Figure 9](#)).

La mesure du potentiel hydrique est réalisée avec le potentiomètre WP4-T (Decagon devices, Pullman, USA), étalonné préalablement (solution de KCl à 0,5M), sur le mésocarpe le plus homogène possible. On tapisse le fond d'une coupelle en acier avec le tissu qu'on a préalablement poolé (pour les petits fruits) ou dissocié (interne/externe) pour les fruits dont la taille le permet. Les échantillons sont mis à 21°C sur une plaque chauffante environ 15 minutes avant la réalisation de la mesure.

Le potentiel osmotique est mesuré avec l'osmomètre (Vapro, Wescor, Belgique) étalonné préalablement avec 3 solutions d'osmolarité connue (100/200 et 900mmol/Kg). La mesure est réalisée sur 10µL de jus obtenu après décongélation grâce à une pipette d'insuline 1mL.

Les dosages d'amidon, de sucres solubles, d'acides organiques et de composés insolubles dans l'éthanol ont été réalisés sur les échantillons décongelés puis lyophilisés selon le protocole mis au point par l'INRA avec un dosage enzymatique via le NADH (Annexes I). La teneur en eau des échantillons est déterminée par la différence de masse avant et après lyophilisation.

Pour l'analyse cellulaire, nous avons utilisé une méthode de dissociation enzymatique (Bertin et al. 2002). Pour cela nous pesons le fruit, sa masse totale de péricarpe, la masse de péricarpe de l'échantillon et le volume de pectinases ajouté. Le péricarpe est découpé en morceaux et mis à macérer dans la solution de pectinases puis conservé au réfrigérateur jusqu'à l'analyse. Les échantillons sont placés à 30°C 72 heures avant l'analyse pour déclencher l'activation des enzymes. On ajoute de la glycérine (à 58%) pour homogénéiser la suspension de cellules. On réalise ensuite un dénombrement de cellules en microscopie (minimum 8 grilles de dénombrement par fruit) sur une cellule de comptage de 0,9µL ou 3,2µL selon la taille des cellules. La surface des cellules est estimée via le logiciel ImageJ à partir des images en microscopie, en traçant manuellement leurs contours. Pour chaque échantillon (péricarpe intérieur ou extérieur), nous avons utilisé entre 3 et 8 images.

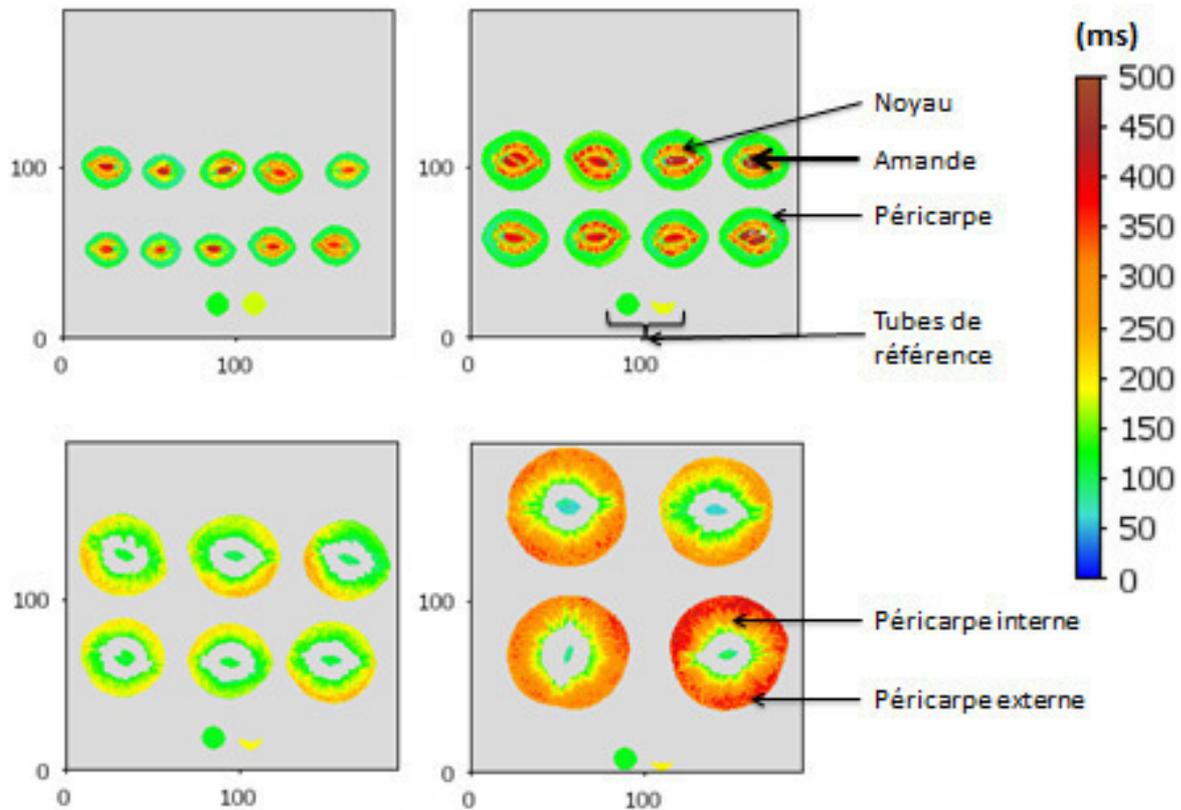


Figure 10: Cartographie T2 mono-exponentiels de pêches à différents stade de croissance (respectivement du haut à gauche jusqu'en bas à droite, les stades 1, 2, 3 et 4). L'échelle de fausse couleur nous indique la valeur de T2 pour chaque pixel de l'image. Le tube de droite contient de l'eau alors que le tube de gauche contient de l'huile minérale. Les légendes indiquent les différentes parties du fruit.

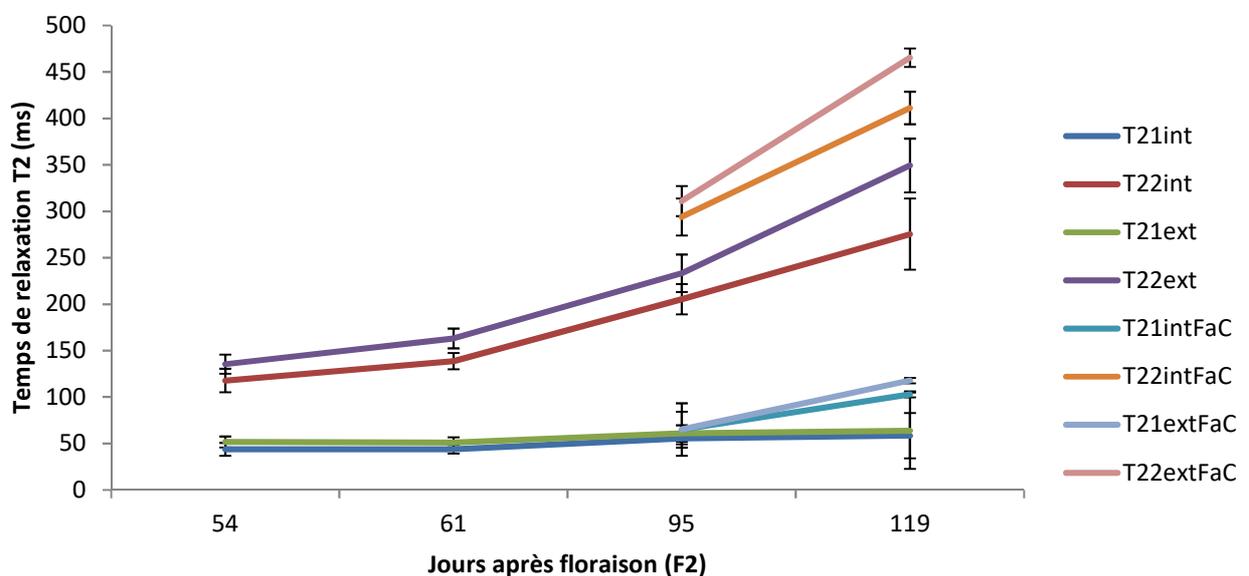


Figure 11: Evolution des temps de relaxation T2 dans la pêche au cours du développement du fruit. Les péricarpes intérieur (int) et extérieur (ext) ont été dissociés dans l'analyse IRM dès le premier stade, nous pouvons ainsi voir séparément l'évolution des 2 péricarpes au cours de la croissance du fruit. Pour un ajustement bi-exponentiel, les T21 correspondent au temps de relaxation courts alors que les T22 sont les temps de relaxation longs. FaC indique une charge en fruit différente (faible charge en fruit). F2 correspond au jour où la moitié des arbres du verger étaient en fleur.

Analyse des données

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel R. Des tests ANOVA suivies de test de Tukey HSD ont été réalisés afin de déterminer les différences significatives ($p < 0.05$) entre les mesures. La corrélation entre les différents paramètres a été déterminée selon 2 méthodes. L'ACP a été utilisée en prenant comme variables explicatives les paramètres IRM et comme variables illustratives les paramètres biologiques. La matrice de corrélation a été calculée afin de déterminer les paramètres avec les plus grandes corrélations et pouvant être considérés comme des marqueurs IRM.

Résultat

Ce rapport a principalement été construit sur les résultats obtenus sur les pêches. A cause du retard dans la croissance des pommes provoquée par les conditions météorologiques, toutes les données concernant les pommes n'ont pas pu être mesurées et/ou analysées. Cependant, les données disponibles pour la pomme sont présentées dans l'Annexe II et ne seront pas discutées dans la suite du rapport. Pour les pêches issues d'arbres à faible charge, seules les données IRM et d'analyse cellulaires sont interprétées dans la suite du rapport.

IRM

La [Figure 10](#) montre un exemple des cartographies T_2 de pêches à quatre stades de croissance. Durant les 2 premiers stades, le péricarpe apparaît relativement homogène, avec le T_2 de l'ordre de 100ms. On peut très facilement distinguer 2 autres structures : le noyau et l'amande avec les T_2 plus long que dans le péricarpe. Le T_2 du noyau diminue entre les deux premiers stades, alors que celui de l'amande reste constant. Les cartographies des fruits aux stades 3 et 4 apparaissent très différentes de celles mesurées aux deux premiers stades, avec une nette dissociation des 2 zones du péricarpe. On peut voir que le temps de relaxation est plus long aux stades 3 et 4 que lors des 2 premiers stades. La partie intérieure du péricarpe a un temps de relaxation plus faible que la partie extérieure. Le noyau n'émet plus de signal (en gris sur les cartographies). Cela peut s'expliquer par la lignification du noyau, observée lors de la découpe. En effet, la lignification conduit à une forte baisse de la teneur en eau du noyau, ce qui résulte en une baisse des valeurs des T_2 . La dissociation des péricarpes peut être expliquée par le développement intensif du péricarpe qui intervient avant le 3ème prélèvement des fruits. Pour le stade 4, on observe des lignes plus foncées dans le péricarpe interne, ces dernières sont aussi visibles lors de la découpe du fruit et elles

Tableau 1: Moyenne des paramètres IRM au cours des différents stades (forte charge en fruit) pour le péricarpe intérieur et extérieur. Les moyennes sont présentées avec leur écart-type. Pour le quatrième stade de la forte charge, nous avons présenté l'ajustement bi et tri exponentiel, l'ajustement bi exponentiel a été choisi pour maintenir un traitement identique au cours des différents stades. Les lettres indiquent les différences significatives entre les stades, l'étoile (*) indique les différences significatives entre les péricarpes.

PERICARPE EXTERIEUR								
STADE	I ₀₁ [%]	T ₂₁ [ms]	I ₀₂ [%]	T ₂₂ [ms]	I ₀₃ [%]	T ₂₃ [ms]	T ₂ -moy [ms]	Microporosité apparente [%]
1	35±3a	52±6a*	65±3a	135±1a*			106±8a*	3±0a
2	40±2b	51±6a*	60±2b	163±1b*			119±7b*	4±0b*
3	37±4b	61±9b*	63±4b	233±2c*			169±2c*	5±0c*
4 (2exp)	41±2ab	87±1b*	59±2ab	366±4d*			251±3d*	5±0c*
4 (3exp)	17±4	41±6	44±1	165±2	39±4	441±4	250±3	5±0
PERICARPE INTERIEUR								
STADE	I ₀₁ [%]	T ₂₁ [ms]	I ₀₂ [%]	T ₂₂ [ms]	I ₀₃ [%]	T ₂₃ [ms]	T ₂ -moy [ms]	Microporosité apparente [%]
1	31±6a	44±7a*	69±6a	118±1a*			95±8a*	3±1a
2	36±4b	44±5a*	64±4b	139±9b*			105±6b*	5±0b*
3	39±4b	55±6b*	61±4b	205±2c*			147±2c*	6±1c*
4 (2exp)	44±2ab	73±12b*	56±2ab	292±4d*			195±3d*	7±0d*
4 (3exp)	20±7	39±8	48±4	143±3	32±1	377±5	196±3	7±0

Tableau 2: Moyenne des paramètres IRM au cours des différents stades (faible charge en fruit) pour le péricarpe intérieur et extérieur. Les moyennes sont présentées avec leur écart-type. Nous avons présenté l'ajustement bi et tri exponentiel pour les 2 stades étudiés. L'ajustement bi exponentiel a été choisi pour maintenir un traitement identique à celui des fruits à forte charge. Les lettres indiquent les différences significatives entre les stades, l'étoile (*) indique les différences significatives entre les péricarpes.

PERICARPE EXTERIEUR								
STADE	I ₀₁ [%]	T ₂₁ [ms]	I ₀₂ [%]	T ₂₂ [ms]	I ₀₃ [%]	T ₂₃ [ms]	T ₂ -moy [ms]	Microporosité apparente [%]
3 (2exp)	36±10a	65±28a	64±10a	311±16a*			223±15a*	5±0a*
3 (3exp)	16 ±9	36±7	44±2	142±18	41±7	385±26	224±15	5±0
4 (2exp)	37±1a	118±3b	63±1a	465±10b*			337±6b*	5±0a*
4 (3exp)	15±3	39±26	37±9	229±46	48±5	522±30	337±6	5±0
PERICARPE INTERIEUR								
STADE	I ₀₁ [%]	T ₂₁ [ms]	I ₀₂ [%]	T ₂₂ [ms]	I ₀₃ [%]	T ₂₃ [ms]	T ₂ -moy [ms]	Microporosité apparente [%]
3 (2exp)	41±4a	71±10a	59±4a	300±12a*			207±13a*	6±0a*
3 (3exp)	14±9	28±18	45±6	133±27	41±9	362±34	211±15	6±0
4 (2exp)	40±1a	103±3b	60±1a	411±18b*			287±11b*	6±0a*
4 (3exp)	15±2	49±3	43±1	183±8	42±3	488±28	293±8	6±0

correspondent à des faisceaux du tissu conducteur permettant une bonne alimentation en eau et nutriments.

Les amandes sont caractérisées par des T2 longs lors des premiers stades car elles sont constituées principalement d'eau, puis au cours de la maturation du noyau, la teneur en eau diminue, l'eau est remplacée par de l'huile, c'est pourquoi le temps de relaxation diminue.

Afin d'accéder à des informations sur la distribution et l'état de l'eau intracellulaire, nous avons réalisé les ajustements des courbes de relaxation par le modèle bi-exponentiel qui était le mieux adapté aux données pour l'ensemble des résultats. Cependant, pour le stade 4, il a été possible de modéliser la courbe de relaxation par le modèle tri-exponentiel avec des erreurs sur les paramètres de l'ajustement légèrement plus élevées que dans le cas de l'ajustement bi-exponentiel. Ceci signifie qu'un compartiment hydrique supplémentaire peut être identifié par IRM à partir de ce stade. Le résultat de l'ensemble des traitements sont présentés dans le Tableau 1. A noter que seulement les résultats des ajustements bi-exponentiels seront pris en compte dans les analyses statistiques.

Comme nous avons pu le constater sur les cartographies T2, les temps de relaxation sont modifiés au cours de la croissance du fruit (figure 11). Le tableau 1 nous permet de constater qu'il est possible de différencier les péricarpes dès le premier stade de développement par rapport aux temps de relaxation T21 et T22 ce qui n'était pas possible sur les cartographies T2 (ajustement mono exponentiel). Les intensités relatives ne varient pas entre les 2 péricarpes. Les temps de relaxations courts (T21) (Tableau1) évoluent peu au cours du temps, seule une augmentation entre les stades 2 et 3 est observée. Les temps de relaxation longs (T22) augmentent constamment au cours de la croissance de manière de plus en plus marquée. L'évolution des intensités relatives montre que la répartition de l'eau entre les deux pools reste assez stable au cours du temps (30-40% / 70-60% pour les composantes I01 et I02, respectivement).

Pour la faible charge (Tableau 2, Figure 11), on constate que la distinction des péricarpes est possible par rapport aux temps de relaxation aux deux derniers stades et que les temps de relaxation sont en moyenne plus élevés que pour la forte charge en fruit. Cependant, au stade 3, le temps de relaxation court n'est pas différent de celui de la forte charge en fruits. Pour le stade 4, on observe une différence avec une augmentation significative du temps de relaxation pour les fruits de la faible charge. Les temps de relaxation longs (T₂₂) sont plus élevés que pour la forte charge en fruit (311±16ms au stade 3 contre 233±2ms pour la forte charge en fruit). L'augmentation du temps de relaxation se calque sur celle de la forte charge en fruits, on retrouve donc un temps de relaxation final qui est plus important pour les fruits issus des arbres à faible charge en fruits.

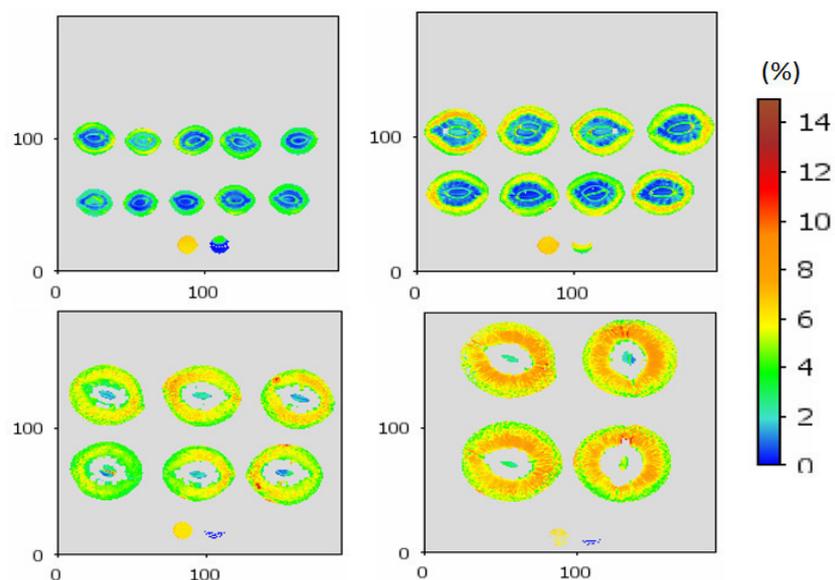


Figure 12: Cartographie de microporosité apparente des pêches à différents stade de croissance (1, 2, 3 et 4). On retrouve une échelle de fausse nous donnant le pourcentage de microporosité dans chaque voxel de l'image. La microporosité est exprimé en %, elle correspond au pourcentage d'air retrouvé dans le péricarpe.

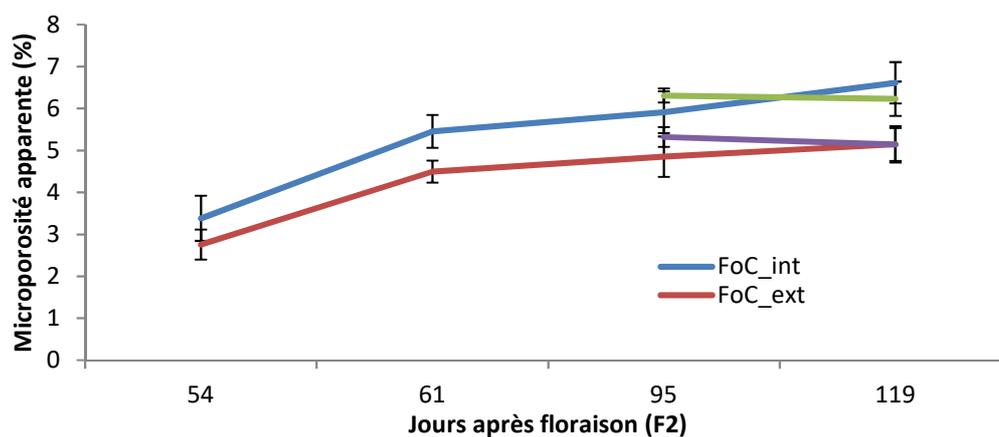


Figure 13: Evolution de la microporosité apparente (% d'air) dans le péricarpe interne (int) et du péricarpe externe (ext) au cours du développement de la pêche. F2 correspond au jour où la moitié des arbres du verger étaient en fleur. FoC indique la forte charge en fruit et FaC la faible charge

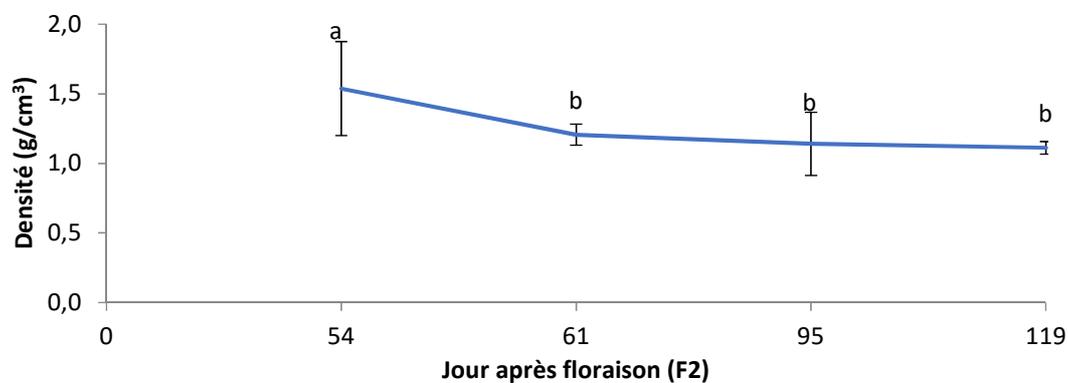


Figure 14: Evolution de la densité de la pêche au cours de la croissance. F2 correspond au jour où la moitié des arbres du verger étaient en fleur.

On peut donc mettre en évidence un effet de la charge en fruits sur les temps de relaxation probablement lié à des modifications des paramètres biologiques du fruit en plus de la différence entre les péricarpes interne et externe. L'augmentation de temps de relaxation moyen au cours du développement du fruit est uniquement due à l'augmentation du temps de relaxation le plus long (T_{22}) au vu des faibles variations d'intensité relative.

La [Figure 12](#) montre un exemple de cartographies de microporosité apparente au cours du développement de la pêche. Les valeurs de la microporosité apparente calculées pour les péricarpes interne et externe sont rapportées dans le [Tableau 1 et 2](#). Lors du premier stade, la microporosité apparente est la même pour les deux péricarpes (environ 3%). A partir du second stade, la microporosité apparente est plus importante dans le péricarpe interne que dans le péricarpe externe ([Figure 13](#)). Ce paramètre augmente tout au long de la croissance du fruit. La plus forte hausse de la microporosité apparente se fait entre le stade 1 et 2 puis cette hausse est plus modérée jusqu'au dernier stade.

La porosité du noyau est très faible aux 2 premiers stades puis le noyau n'apparaît plus sur l'image ([Figure 12](#)) dans les 2 derniers stades pour des raisons que l'on a évoquées précédemment (section Distribution spatiale des paramètres de relaxation).

Pour les pêches issues des arbres à faible charge en fruit, la microporosité n'évolue pas entre les deux stades observés.

Analyses biologiques

La [Figure 14](#) montre l'évolution de la densité des pêches au cours de leur développement. On peut observer une diminution de la densité entre les stades 1 et 2, alors qu'elle reste stable entre les stades 2 et 4.

Evolution des paramètres hydriques au cours de la croissance

Le potentiel hydrique varie peu au cours du développement du fruit ([figure 15](#)). Dans la première partie de croissance, il augmente légèrement ($-1.18 \pm 0.05\text{MPa}$ au second stade contre $-1.28 \pm 0.05\text{MPa}$ au premier stade). Lors de la seconde partie de croissance (développement de la partie charnue : stade 3 et 4), il y a une baisse de ce potentiel jusqu'au stade final du fruit ($-1.39 \pm 0.05\text{MPa}$ et $-1.48 \pm 0.04\text{MPa}$ respectivement pour le stade 3 et 4). Cela peut s'expliquer par la croissance des cellules ou bien le stockage de composés solubles et insolubles. En fin de croissance (stade 3 et 4), nous avons pu dissocier le péricarpe interne et externe. Les analyses statistiques nous montrent une différence significative du potentiel hydrique entre les deux péricarpes. Le potentiel hydrique n'est donc pas homogène dans l'ensemble du fruit et varie en fonction de modifications structurelles du

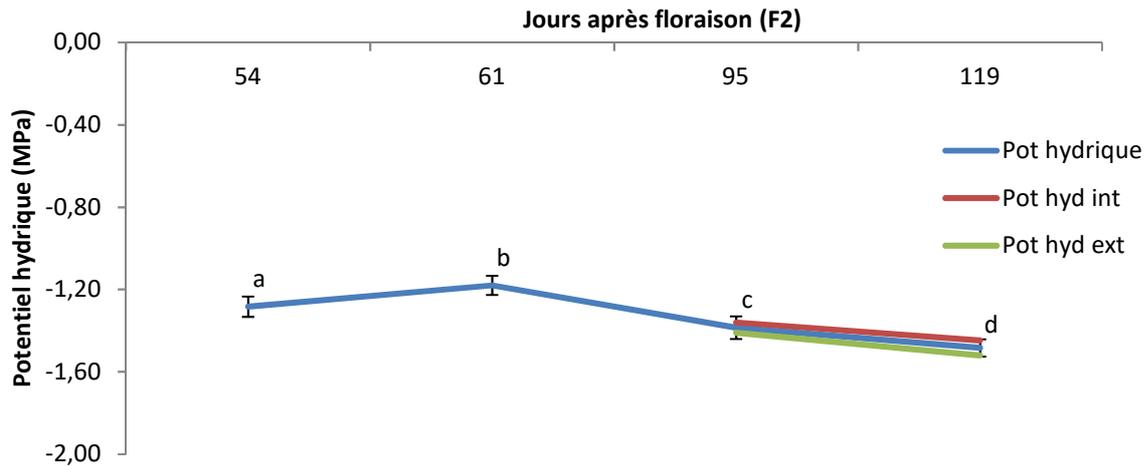


Figure 15: Evolution du potentiel hydrique de la pêche au cours de sa croissance. Le potentiel a été mesuré sur le péricarpe total (3 répétitions) lors des 2 premiers stades puis le péricarpe intérieur (int) et extérieur (ext) ont été différenciés lors des stades 3 et 4. Nous avons moyenné les valeurs du péricarpe intérieur et extérieur lors des 2 derniers stades pour obtenir la valeur du péricarpe total. F2 correspond au jour où la moitié des arbres du verger étaient en fleur.

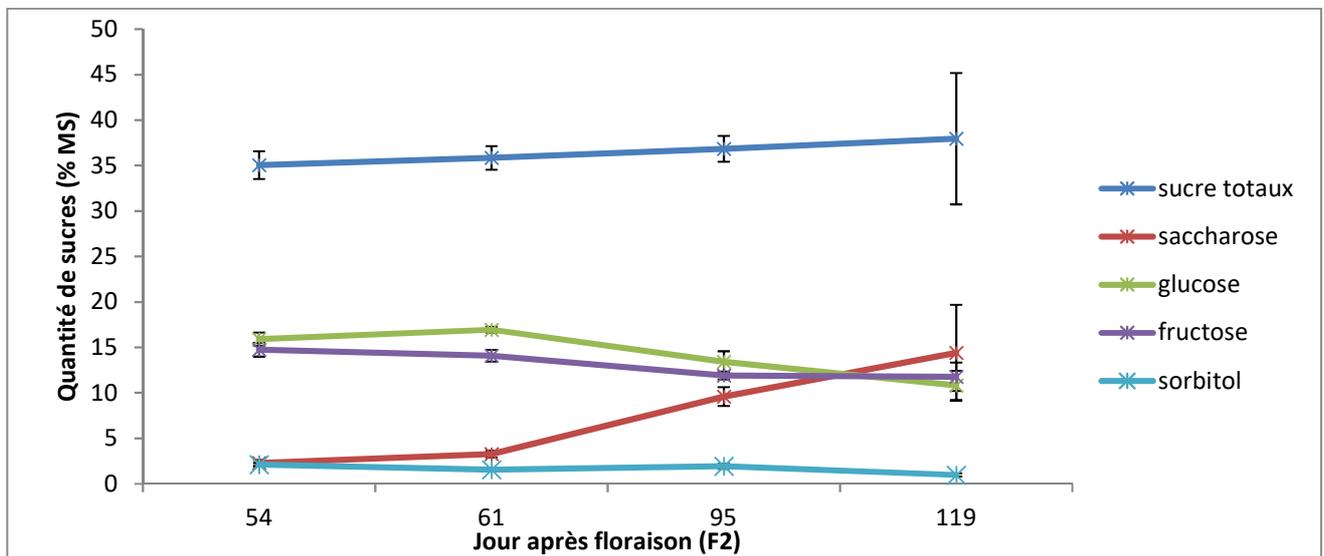


Figure 16: Evolution des teneurs des différents sucres (glucose, fructose, saccharose et sorbitol) au cours du développement de la pêche. Nous avons représenté l'évolution des sucres totaux afin de voir l'évolution globale de la teneur en sucre. Seulement au dernier stade, nous avons dissocié les péricarpes intérieur et extérieur, nous avons représenté ici la moyenne des 2 par soucie de lisibilité. F2 correspond au jour où la moitié des arbres du verger étaient en fleur.

Tableau 3: Valeurs des teneurs en sucres (% de la matière sèche) au cours du développement de la pêche. Ces valeurs ont permis de tracer le graphique présent ci-dessus. On peut voir ici la différence de teneur pour chaque sucre en dernier stade. Le péricarpe intérieur est à gauche et le péricarpe extérieur à droite. Les valeurs sont données avec leur écart-type. JAF signifie jour après floraison. Les lettres indiquent les différences significatives entre les stades, les étoiles(*) les différences significatives entre les péricarpes.

jaf	saccharose		glucose		fructose		sorbitol		sucre totaux	
54	2,29±0,35a		15,92±0,72a		14,745±0,77a		2,11±0,18a		35,06±1,53a	
61	3,27±0,35b		16,94±0,3b		14,08±0,65b		1,55±0,12b		35,84±1,3b	
95	9,59±1,02c		13,42±1,15c		11,90±0,42c		1,92±0,28c		36,84±1,43bc	
11	10,04±	18,75±	9,82±	11,80±	11,18±	12,37±	0,83±	1,11±	31,86±	44,03±
9	3,45d*	1,61d*	1,28d*	1,51d*	1,51c*	1,56c*	0,14d*	0,09d*	4,53c*	1,52c*

fruit (développement et lignification du noyau, développement de la partie charnue) car on retrouve une différence significative entre chaque stade.

La teneur en eau n'a pas été représentée puisqu'elle est constante au cours du temps ($89 \pm 1\%$ de la matière fraîche du fruit). On retrouve simplement au stade 2, une légère augmentation ($90 \pm 0\%$), qui est probablement expliquée par le nombre relativement faible d'échantillons utilisés pour cette analyse.

Evolution de la concentration en sucres et acide au cours de la croissance

Les résultats des dosages biochimiques sont présentés sur la Figure 16 et dans le tableau 3. Les dosages ont pu être réalisés sur les péricarpes externe et interne séparément uniquement pour le dernier stade où la quantité de matière fraîche était suffisante.

Le teneur en sucre totale moyenne varie faiblement au cours du développement du fruit ($35 \pm 2\%$ MS au premier stade contre $38 \pm 7\%$ MS au dernier stade), ce qui présente un résultat surprenant. On observe au dernier stade une différence entre les deux péricarpes ($32 \pm 5\%$ MS pour l'intérieur contre $44 \pm 2\%$ MS pour le péricarpe extérieur). On constate donc que les sucres sont majoritairement accumulés dans le péricarpe extérieur.

Parmi les sucres analysés, le sorbitol est le sucre présent en moindre pourcentage. Sa teneur diminue au cours du temps ($2.1 \pm 0.2\%$ MS au premier stade contre $1 \pm 0.2\%$ MS au dernier stade). Au stade 4, la teneur en sorbitol est plus importante dans le péricarpe extérieur que dans le péricarpe intérieur.

Le glucose et le fructose ont un profil de variations similaire. Leur teneur est relativement haute et constante au cours des 2 premiers stades (environ 15% MS et 14% MS pour le glucose et le fructose, respectivement) puis leur teneur diminue ($11 \pm 2\%$ MS et $12 \pm 2\%$ MS pour le glucose et le fructose au dernier stade, respectivement). Les péricarpes intérieur et extérieur ne présentent pas les mêmes teneurs puisque pour le fructose on a une teneur de $11 \pm 2\%$ MS pour le péricarpe intérieur contre $12 \pm 2\%$ MS pour le péricarpe extérieur. La même conclusion est valable pour le glucose car on a une teneur de $10 \pm 1\%$ MS pour le péricarpe intérieur et $12 \pm 2\%$ MS pour le péricarpe extérieur. On peut voir que pour la première fois depuis le début du développement, la teneur en fructose est supérieure à la teneur en glucose.

Le saccharose a une teneur assez faible au début du développement du fruit ($2.3 \pm 0.4\%$ MS) qui équivaut environ à la teneur du sorbitol. Au cours du développement la teneur ne cesse d'augmenter surtout après le stade 2. L'augmentation de la teneur en saccharose semble linéaire à partir de ce deuxième stade. Au dernier stade, la teneur en saccharose ($14 \pm 5\%$ MS) est supérieure à celle en glucose ou en fructose. Comme pour les autres sucres, on note une différence entre le péricarpe intérieur et extérieur (10 ± 3 pour l'intérieur et 19

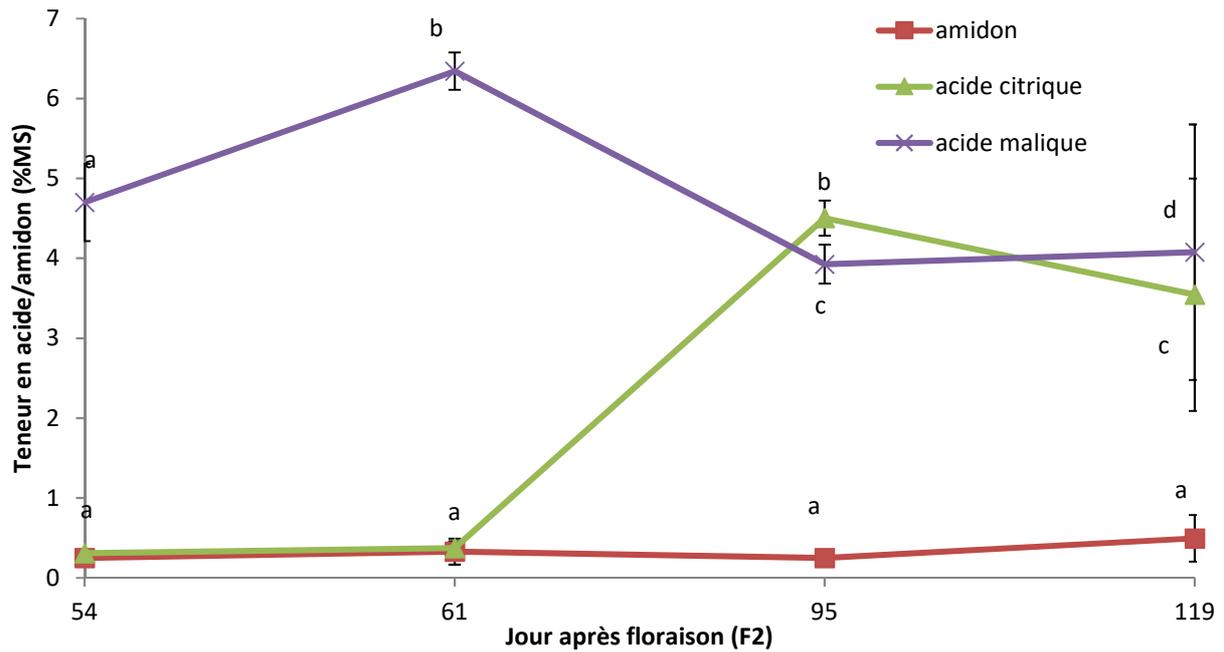


Figure 17: Evolution de la teneur en acides citrique et malique ainsi que de l'amidon au cours du développement de la pêche (forte charge). Les données sont projetées avec leur écart-type. F2 correspond au jour où la moitié des arbres du verger étaient en fleur.

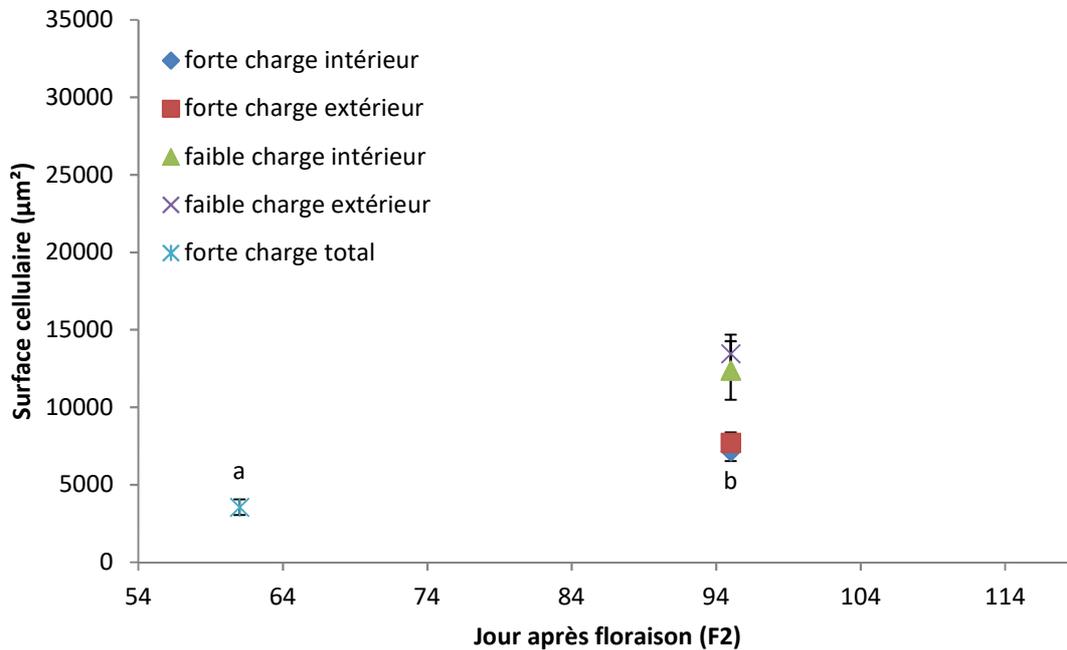


Figure 18: Evolution de la surface cellulaire au cours de la croissance de la pêche. Le stade 1 n'est pas représenté car les cellules étaient trop agglomérées pour pouvoir traiter les images. Au stade 2, nous n'avons pas fait de différenciation entre péricarpe intérieur et extérieur. Lors des 2 derniers stades, les péricarpes intérieur et extérieur ont été dissociés. La variable faible charge en fruit a été ajoutée lors de ces 2 derniers stades. F2 correspond au jour où la moitié des arbres du verger étaient en fleur.

+/- 2 %MS pour l'extérieur). C'est pour ce sucre qu'on retrouve le plus grand écart entre les 2 péricarpes même si l'on a toujours observé une concentration plus importante dans le péricarpe extérieur quelques sois le sucre.

La teneur en amidon est très faible dans la pêche (entre 0.2 et 0.3 %MS) ([figure 17](#)). Cette teneur en amidon est constante au cours du temps sauf au dernier stade où la teneur augmente (0.5 +/- 0.3 %MS). On observe également au stade 4 une différence de teneur en amidon entre les 2 péricarpes (0.4 +/- 0.1 %MS et 0.6 +/- 0.4 %MS pour le péricarpe interne et externe, respectivement). La pêche est un fruit qui n'utilise pas l'amidon comme forme de mise en réserve des sucres ce qui explique que cette variation est très faible au cours du temps, les modifications sont probablement dues aux besoins des cellules durant la nuit.

La [figure 17](#) montre l'évolution de la concentration en acide citrique et l'acide malique au cours du temps. L'acide malique a une teneur de 4.7 +/- 0.5 %MS au premier stade. La teneur augmente entre le stade 1 et 2 jusqu'à 6.3 +/- 0.2 %MS. Cette teneur diminue ensuite fortement entre le stade 2 et 3 pour passer à 3.9 +/- 0.2 %MS puis remonte au stade 4. Au stade 4, on observe une différence de la teneur en acide dans les 2 péricarpes, avec une teneur beaucoup plus importante dans le péricarpe intérieur (5.5 +/- 0.78 %MS) que dans le péricarpe extérieur (2.7 +/- 0.3). La teneur en acide citrique est quasiment nulle et n'évolue pas aux deux premiers stades (0.31 +/- 0.04

%MS) et augmente pour le stade 3 (4.5 +/- 0.2 %MS). On retrouve enfin une légère baisse de la teneur en acide citrique au dernier stade puisqu'on a une valeur finale de 3.6 +/- 1.5 %MS. Comme pour les sucres et l'acide malique, on observe au stade 4 une différence assez marquée de concentration en acide citrique entre les deux péricarpes (4.8 +/- 0.8 et 2.3 +/- 0.3 % MS, pour le péricarpe interne et externe, respectivement).

La teneur en acide citrique et malique est à peu près la même au dernier stade, juste avant le stade mature. Les acides organiques sont plutôt stockés dans la partie intérieure du fruit. Il semble donc y avoir une compartimentation de la mise en réserve puisque les sucres étaient, eux, stockés préférentiellement dans la partie extérieure du fruit.

Croissance cellulaire au cours du développement du fruit

La taille moyenne des cellules pour les quatre stades étudiés est représentée sur la Figure 18. Nous n'avons pas pu réaliser le dénombrement des cellules au stade 1 car les cellules étaient en amas et donc indissociables les unes des autres, la mesure de surface n'a pas non plus été réalisée. Nous avons différencié les péricarpes intérieur et extérieur à partir du stade 3. Comme pour les précédentes analyses, les fruits issus des arbres à faible charge en fruits ont été analysés aux stades 3 et 4.

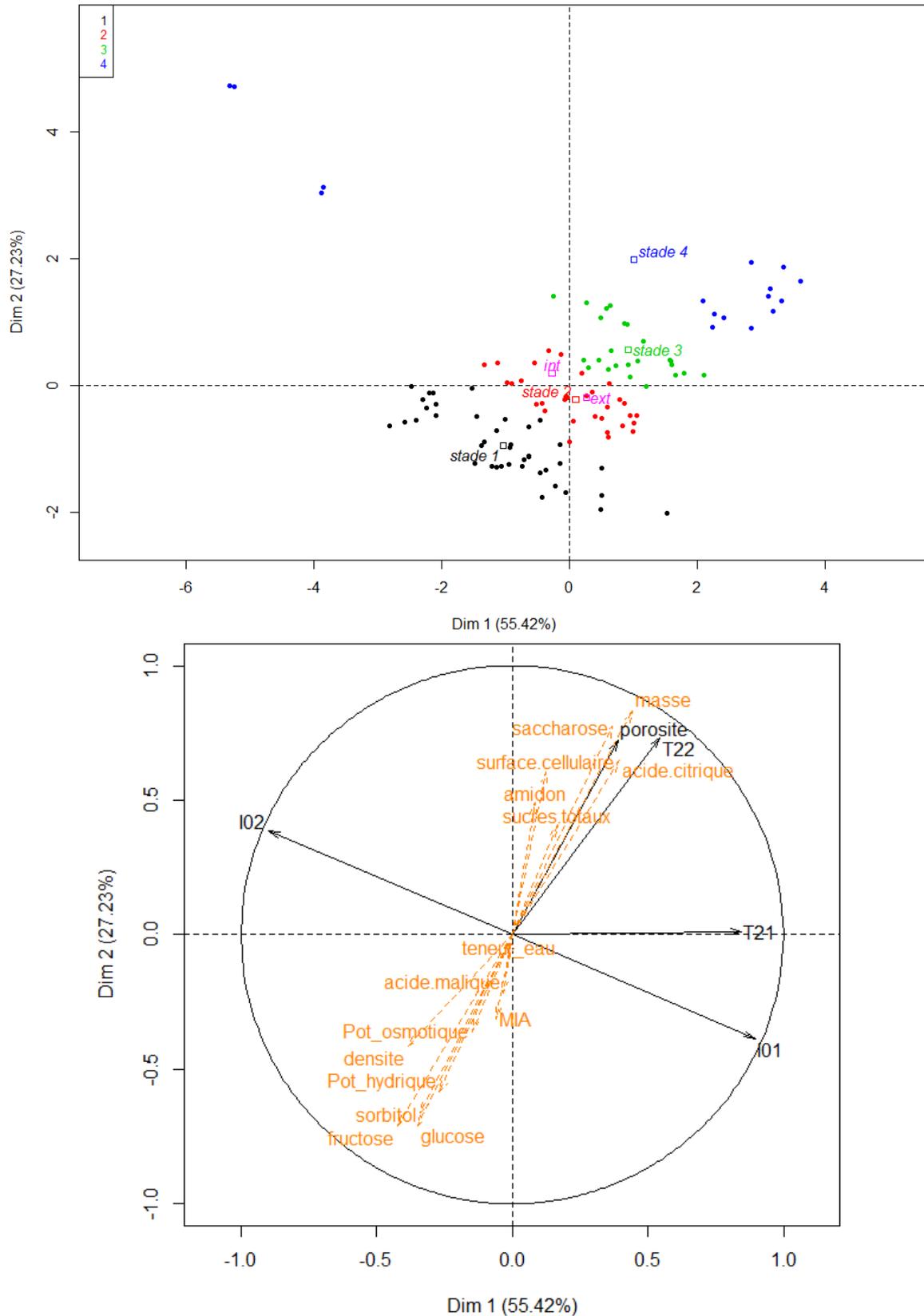


Figure 19: Graphiques des individus et ACP des paramètres IRM. Les stades de développement sont caractérisés par une couleur différente sur le graphique des individus, chaque point représentant un individu. Les variables IRM ont été utilisées comme variables actives (noires) alors que les données biologiques ont été utilisées comme variables explicatives (orange). La représentation de l'axe 1 et 2 a été choisi car ils correspondent à 93% de l'information.

Pour les pêches issues des arbres à forte charge en fruit, la taille moyenne des cellules augmente considérablement au cours du développement du $3556 \pm 502 \mu\text{m}^2$ au stade 2 à $13\,493 \pm 3047 \mu\text{m}^2$ au stade 4. On peut donc supposer que l'augmentation du volume du fruit au cours de la croissance est due à une augmentation du volume cellulaire. On n'observe pas de différence de taille des cellules entre les 2 péricarpes. Etant donné que les écart-types sont très importants pour cette mesure, nous avons regardé la distribution des données afin de voir si on retrouve deux populations de cellules (figure non présentée). Les résultats suivent une distribution normale, cependant, les données sont très étalées.

Au stade 3, on constate que les cellules des pêches issus des arbres à faible charge en fruits ont une surface plus importante que celle des fruits issus des arbres à forte charge ($13\,465 \pm 1226 \mu\text{m}^2$ contre $7725 \pm 665 \mu\text{m}^2$ pour le péricarpe extérieur respectivement pour la faible charge et la forte charge). Au stade 3, les fruits à faible charge ont donc une taille de cellule comparable à la taille des cellules que l'on retrouve au stade 4 pour les fruits à forte charge. Nous avons uniquement une image pour la mesure du péricarpe intérieur du dernier stade des fruits à faible charge, avec la surface moyenne des cellules de $32\,197 \mu\text{m}^2$ ce qui explique l'absence d'écart type. La taille des cellules a donc été multipliée par 2.6 entre les stades 3 et 4 alors que pour la forte charge en fruit, le coefficient de multiplication de croissance des cellules se trouve plutôt autour de 2 entre chaque stade. Les fruits à faible charge semblent donc avoir une croissance de cellules plus rapide que les fruits à forte charge.

Corrélations des données IRM et biologiques

Les axes 1 et 2 semblent expliquer à eux 2, l'évolution de la pêche au cours des divers stades. On peut facilement distinguer sur la figure 19, des paramètres ayant une certaine liaison. Le temps de relaxation long et la porosité sont proches sur ce cercle, ce qui indique une corrélation importante entre ces deux paramètres. Cependant, on voit que beaucoup de facteurs biologiques tels que la masse, l'acide citrique et dans une moindre mesure la teneur en saccharose et la surface cellulaire ont une évolution identique à celle du temps de relaxation long. On peut donc supposer que ces paramètres ont une influence dans la modification des temps de relaxation dans le fruit au cours du temps. On retrouve un grand nombre de facteurs biologiques qui ont une corrélation inversée aux temps de relaxation. La teneur en fructose, sorbitol et en glucose ainsi que le potentiel hydrique sont très négativement corrélés au temps de relaxation long. La densité semble être négativement corrélée à la porosité. Certaines données biologiques telles que la teneur en eau, les MIA, l'amidon et l'acide malique n'apportent pas d'informations sur la modification des temps de relaxation au cours du temps car on retrouve des flèches courtes (mal projetées sur ces axes). Cette ACP nous montre que l'intensité relative (I_{01}) et le temps de relaxation de la

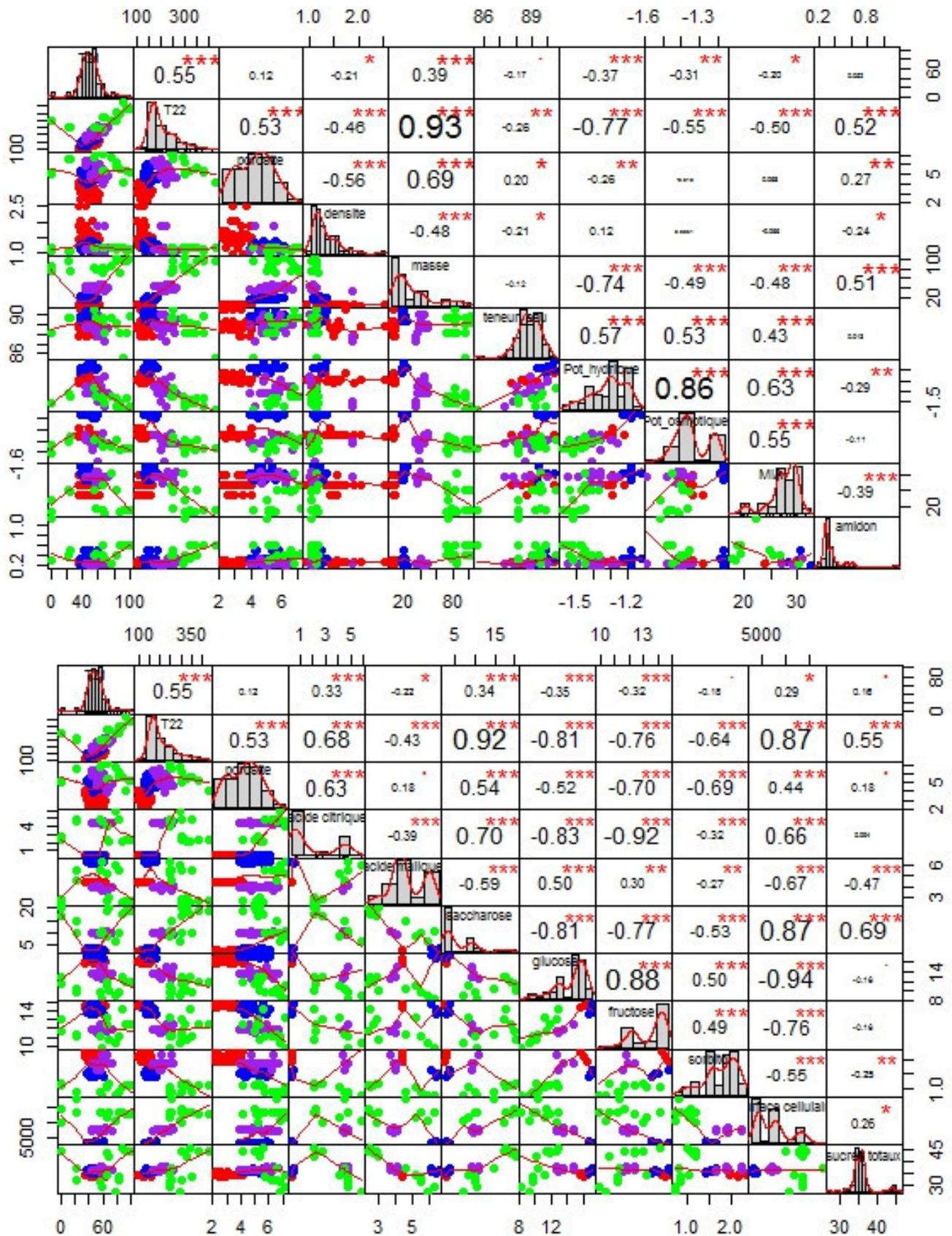


Figure 20: Matrice de corrélation des paramètres IRM et biologiques. La partie basse représente les valeurs de chaque individu au cours des différents stades (différencié par les couleurs : rouge, bleu, violet, vert). La partie moyenne indique la distribution des individus dans l'échantillon. La partie haute nous indique la valeur de la corrélation entre les paramètres 2 à 2.

première composante du signal de relaxation (T_{21}) ne sont pas expliqués par les variables biologiques. Les paramètres biologiques expliquent parfaitement la variation de temps de relaxation long (T_{22}).

Suite à cette ACP, nous avons décidé de construire une matrice de corrélation afin de voir précisément les paramètres qui sont liés entre eux. La matrice de corrélation est présentée dans la figure 20, nous l'avons coupé en deux pour des raisons de lisibilité. On voit très facilement que la masse est très corrélée aux paramètres IRM. On suppose que la masse du fruit est le reflet des différents stades de croissance. Le potentiel hydrique est lié de façon négative au temps de relaxation (T_{22}). Le temps de relaxation étant dépendant de l'eau présente dans les tissus et de sa forme, il semble logique que le potentiel hydrique soit corrélé aux temps de relaxation. Le potentiel osmotique n'a qu'une faible corrélation avec les paramètres de relaxation car il ne représente qu'une partie du potentiel hydrique (avec lequel il est très fortement corrélé).

La densité semble liée à la porosité du tissu (corrélation inverse). Cela semble logique car une plus grande présence d'air dans les tissus conduit à une modification de la densité du fruit. Cependant cela ne semble pas être le seul paramètre au vu du coefficient de corrélation relativement faible.

Concernant les paramètres issus des dosages, on voit que les MIA sont peu corrélés avec les paramètres IRM, par contre la teneur en amidon est relativement bien corrélée au temps de relaxation long. Le saccharose possède une très forte corrélation positive avec les temps de relaxation. Pour le glucose et le fructose, on observe aussi une forte corrélation négative. Le sorbitol qui est un sucre particulier que l'on retrouve essentiellement chez les rosaceae est corrélé négativement aux temps de relaxation et à la porosité mais en moindre mesure que les sucres que l'on a cités précédemment. La corrélation est moyenne entre le temps de relaxation long et les sucres totaux. Une corrélation est observable entre les paramètres IRM (T_2 et porosité) et la teneur retrouve plutôt un effet seuil qu'une corrélation à proprement parlé. Cette corrélation est légèrement supérieure pour les temps de relaxation par rapport à la porosité. L'acide malique n'est que très peu corrélé avec les paramètres IRM, il a donc peu d'influence sur les temps de relaxation ou la modification de la porosité au cours de la croissance du fruit.

La surface cellulaire est très fortement corrélée au temps de relaxation long mais pas au temps de relaxation court.

Discussion

Modifications des paramètres biologiques au cours de la croissance

Au cours du développement des fruits, la masse et le volume du fruit augmentent continuellement. Ces modifications résultent des modifications physiologiques et biochimiques conduisant à la mise en place des divers stades de développement du fruit. La croissance des fruits au cours de notre étude suit la croissance typique de la pêche et de la pomme comme le montrent les graphiques 4 et 5 dans la partie matériel et méthode. Le volume du fruit est un facteur variant principalement selon la taille des cellules et leur nombre. Nous avons mesuré une augmentation de la taille cellulaire tout au long de la période de développement analysée, cette augmentation est plus marquée pendant la période entre les stades 3 et 4 correspondant au développement du péricarpe du fruit. L'augmentation de la taille cellulaire est dépendante de l'état hydrique de la plante, la pression de turgescence permettant l'élongation cellulaire. La densité cellulaire a été également estimée dans cette étude (résultats non présentés). On observe une diminution de la densité cellulaire entre les stades 1 et 2, indiquant l'absence de division cellulaire étant donné l'augmentation en taille des cellules. Au troisième stade, la valeur très faible de densité cellulaire nous indique qu'il n'y a pas de division cellulaire pendant la phase de croissance du péricarpe. Au dernier stade étudié, la densité cellulaire dans le fruit est quasiment identique à la densité au premier stade.

Au cours du développement du fruit le potentiel hydrique et osmotique varient faiblement au vu des observations faites sur d'autres organes de la plante comme la feuille par exemple (Rahmati et al., 2015). Les mesures du potentiel hydrique et osmotique n'ayant pas été faites sur les mêmes fruits, nous n'avons pas pu calculer la pression de turgescence.

Le fruit met en place des réserves carbonées au cours du développement. En effet, on observe une modification de la concentration en différents sucres au cours du développement. En début de croissance on retrouve majoritairement des sucres simples (glucose, fructose) alors qu'en fin de croissance c'est plutôt le saccharose (sucre plus complexe) qui est majoritaire. Cependant, la concentration en sucres totaux augmente peu au cours des différents stades.

Evolution des paramètres IRM au cours de la croissance

Si l'on s'intéresse au temps de relaxation moyen, on peut démontrer son augmentation continue au cours du développement. C'est un paramètre qui est difficile à corréler car il reflète un temps de relaxation moyen résultant de plusieurs temps de relaxation qui peuvent être affectés différemment par les changements physiologiques et métaboliques dans le fruit au cours de la croissance. Dans le cas de la pêche, il est important de noter que l'intensité

relative de chaque temps de relation ne varie pas au cours de la croissance de nos fruits, seul la modification des temps de relaxation de chacun des pools d'eau conduit à une modification du temps de relaxation moyen. Il est donc plus pertinent de résonner individuellement sur les temps de relaxation issus d'un ajustement multi-exponentiel plutôt que sur le T_2 moyen ou le T_2 mono exponentiel (cartographie) qui ne nous donne pas d'informations sur les facteurs qui varient.

La pomme a déjà été suivie par IRM au cours de sa conservation post-récolte (Winisdorffer, 2014). Dans cette étude, le signal IRM de relaxation a été modélisé par le modèle tri-exponentiel. (Snaar and Van As, 1992) ont mis en évidence que lors d'un ajustement tri-exponentiel, le T_2 le plus long et ayant l'intensité relative la plus grande correspond à la vacuole. Le T_2 intermédiaire est attribué au cytoplasme et le T_2 le plus court à l'eau en interaction avec les polysaccharides de la paroi.

Pour les trois premiers stades de croissance des pêches, ainsi que pour les pommes, nous avons réalisé un ajustement bi-exponentiel car on c'est avec ce modèle qu'on obtenait le meilleur résultat (par rapport aux erreurs d'estimation des paramètres). Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer pourquoi la méthode n'est pas assez résolutive pour distinguer trois pools d'eau dans les fruits aux stades précoces. Une des hypothèses est que le temps de relaxation d'un des pools d'eau est trop court pour être mesuré par IRM ou le signal de l'un des pools d'eau n'est pas assez fort pour être mesuré. Au dernier stade de croissance de la pêche, le modèle tri exponentiel est presque aussi bien adapté que le modèle bi-exponentiel pour déterminer les paramètres de relaxation. On peut donc voir qu'il y a une modification au niveau biologique conduisant à la possibilité de mesure d'un nouveau pool d'eau. Si on compare les résultats des ajustements bi et tri exponentiel pour le stade 4 de la pêche, on met en évidence que l'apparition du nouveau pool d'eau n'est pas due à la division d'un des deux pools que l'on avait au stade précédent, mais plutôt d'une répartition entre les pools. Le temps de relaxation le plus long estimé par l'ajustement tri-exponentiel ne présente pas une intensité relative élevée comme nous l'attendions (Snaar and Van As, 1992). Cela laisse donc un doute sur notre hypothèse d'attribution des différents compartiments.

Influence des paramètres biologiques sur les temps de relaxation en cours de croissance

La teneur en eau a peu varié au cours des différents stades, ce paramètre n'est donc pas responsable de la modification du temps de relaxation. Par contre, les potentiels hydrique et osmotique ont varié tout au long du développement du fruit. Les paramètres de relaxation T_2 sont sensibles à l'état de l'eau et la faible modification des paramètres hydriques peut donc

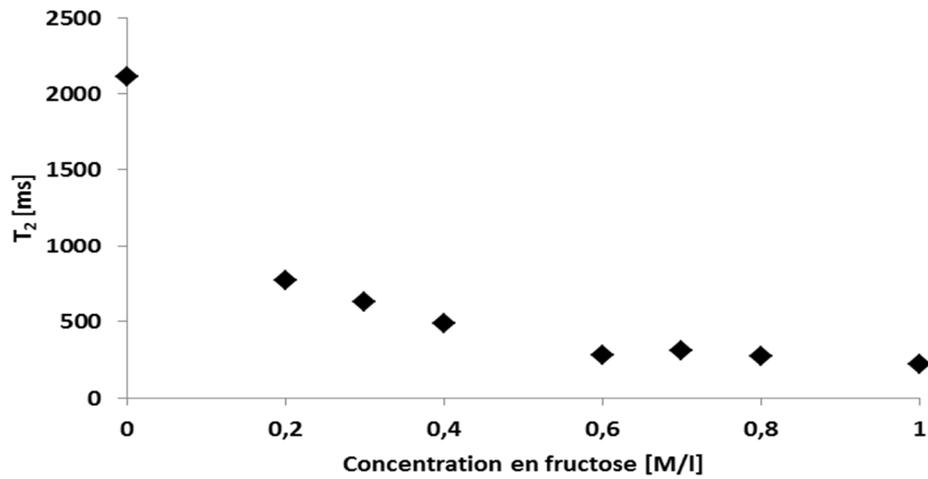


Figure 21: Abaque de référence de l'influence de la concentration en sucre sur le temps de relaxation. Nous avons utilisé une solution de fructose.

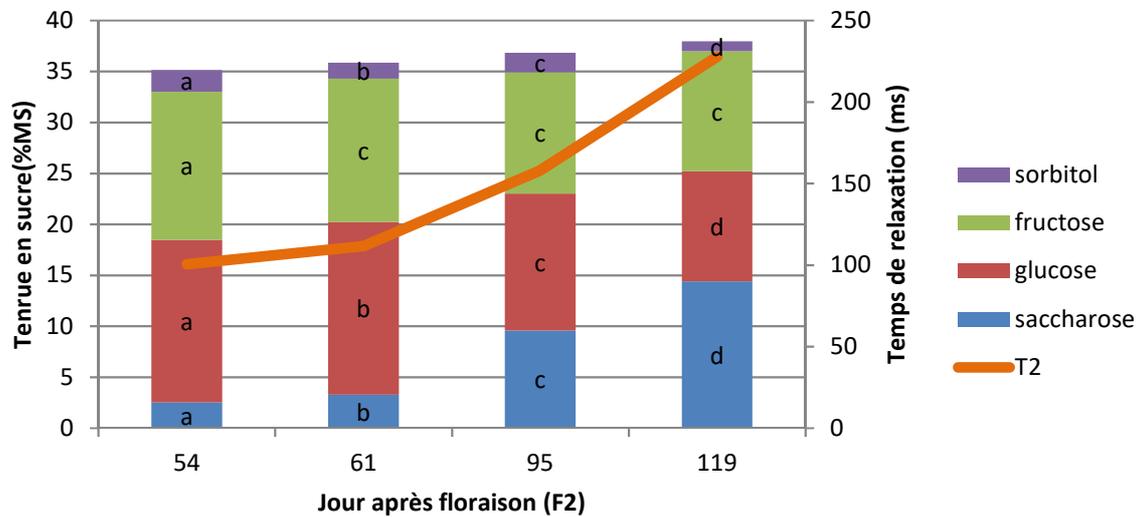


Figure 22: Evolution conjointe de la teneur en sucre et du temps de relaxation. La teneur en sucre a été représenté sous forme de diagramme empilé, ainsi une barre complète représente la teneur en sucres totaux. Les lettres indiquent les différences significatives entre les péricarpes.

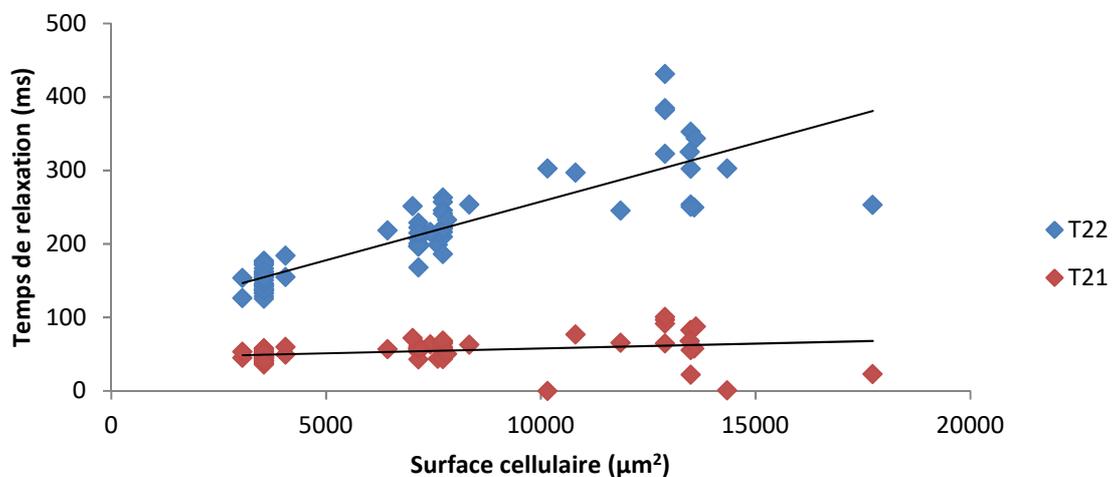


Figure 23: Evolution du temps de relaxation au cours de la croissance de la surface cellulaire.

conduire à une modification du temps de relaxation. Le potentiel hydrique étant négativement corrélé au temps de relaxation, il serait intéressant d'analyser les mécanismes qui pourraient être à l'origine de cette corrélation.

La présence de sucres dans l'eau impacte le temps de relaxation de l'eau (Raffo et al., 2005), dû aux échanges chimiques entre les molécules de sucres et les molécules d'eau. Cet effet dépend de la concentration en sucres et de leur forme, des paramètres de l'acquisition IRM et du champ B0 de l'aimant utilisé (Hills and Remigereau, 1997). Nous avons réalisé une gamme étalon de fructose entre 0 et 1 Mol/L afin d'évaluer si avec nos conditions expérimentales, il y a une influence de la concentration en sucres (isolé de l'ensemble des paramètres biologique) sur les temps de relaxation (Figure 21). Le fructose a été choisi pour cette expérience car la bibliographie (Yamaki and Ino, 1992) nous montre que c'est le sucre majoritaire chez la pomme. Nous avons obtenu des résultats similaires à la littérature (Prusova, 2016) avec une diminution de temps de relaxation à mesure que la concentration en fructose évolue. La diminution du temps de relaxation est rapide entre 0 et 0.3Mol.L puis la diminution est moins importante au-delà de cette concentration.

Nous avons dosé dans cette étude les différents sucres présents dans la cellule. Cependant, étant donné que les différents sucres sont stockés dans la vacuole, nous nous attendions à ce que les temps de relaxation soient impactés par la concentration en sucres totaux, sans pouvoir distinguer l'influence de sucres individuels. Dans le cas des pêches, il est par conséquent difficile d'expliquer les corrélations entre les paramètres de relaxation (notamment le T_{22}) et la teneur en différents sucres. En revanche, la concentration en sucres totaux évolue très peu au cours du développement (Figure 22) des fruits, n'impactant pas par conséquent les temps de relaxation. Les données de l'abaque pourront éventuellement servir à expliquer les résultats chez la pomme après conversion de la teneur en Mol/L.

La taille des cellules est un paramètre très important car elle va avoir un impact direct sur les temps de relaxation dû à l'effet de surface (Snaar and Van As, 1992). Cet effet se traduit par la réduction du temps de relaxation transversal avec la réduction de la taille du compartiment hydrique. L'observation des 4 stades de développement de la pêche, ainsi que les deux conditions étudiées (forte et faible charges en fruits) nous permet de voir l'évolution des temps de relaxation sur une large gamme de taille de cellules. Cette augmentation de la surface cellulaire s'explique surtout par la croissance de la vacuole. Cette dernière contient donc plus d'eau, mais aussi plus de solutés tel que le saccharose ce qui peut expliquer la corrélation positive entre la concentration en saccharose et le temps de relaxation. La surface de la vacuole a donc une forte influence sur le temps de relaxation et explique en grande partie l'augmentation de ce dernier. On peut observer une relation linéaire entre le temps de relaxation et la surface cellulaire (Figure 23). L'augmentation du temps de

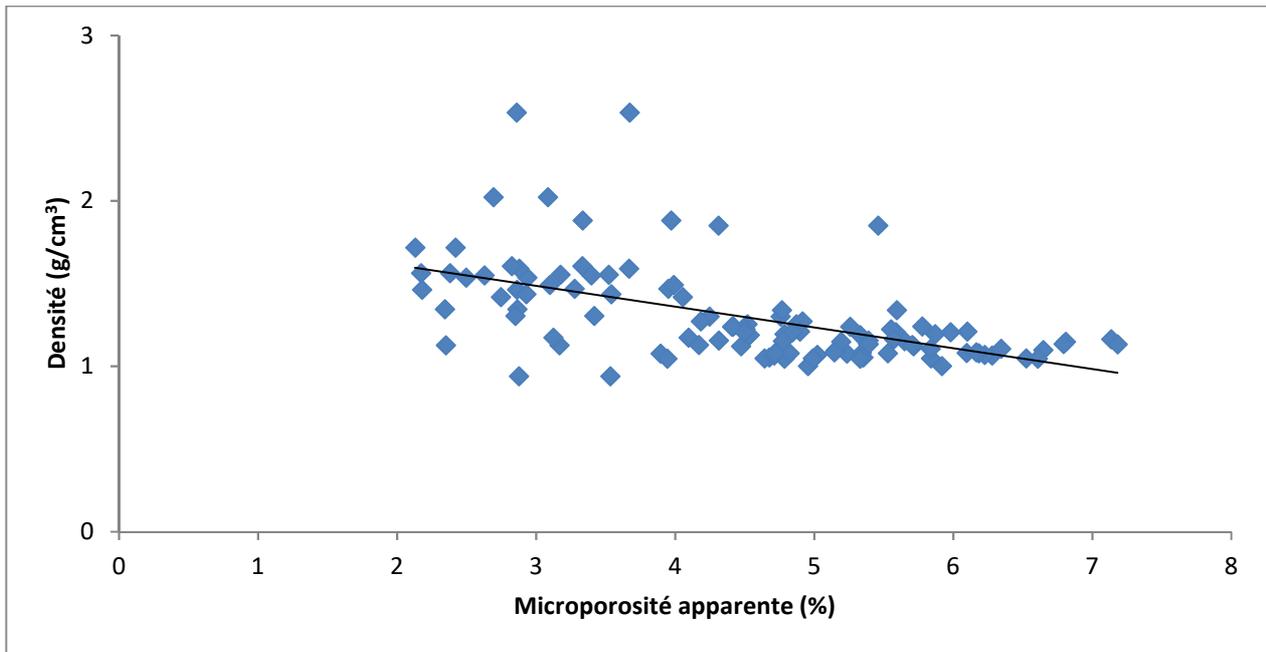


Figure 24: Evolution de la densité au cours de la modification de la microporosité.

relaxation T_{22} semble très dépendante de l'augmentation de la surface cellulaire contrairement au T_{21} qui lui varie peu avec l'augmentation de surface cellulaire.

La microporosité apparente a varié en fonction du stade de développement de la pêche. Cette microporosité est différente entre les 2 péricarpes, le péricarpe interne étant le plus poreux. Ces résultats sont contraires à ce que l'on retrouve chez la pomme (Winisdorffer, 2014) où c'est le péricarpe externe qui est le plus poreux. La baisse de densité peut s'expliquer en partie par l'augmentation de la microporosité apparente (Figure 24). Cependant, la microporosité n'est pas le seul paramètre ayant une influence car la densité est mesurée sur l'ensemble du fruit. Les autres tissus tels que le noyau ou l'amande peuvent aussi avoir un impact sur la densité. La densité a fortement diminué entre les 2 premiers stades puis est restée constante au cours des stades suivants. Des observations similaires ont été faites dans la pomme en fonction du calibre de cette dernière (Winisdorffer, 2014).

Conclusion

Un des objectifs de ce stage a été de corréler les paramètres de relaxation IRM à des observations biologiques. Parmi les paramètres mesurés, la surface cellulaire semble avoir la plus grande influence sur le temps de relaxation. En effet, les variations des temps de relaxation sont corrélées à l'accroissement de la surface cellulaire au cours du développement du fruit. Deux autres paramètres biologiques semblent avoir une influence: le potentiel hydrique et la teneur en sucre. Le potentiel hydrique a un effet moins marqué sur les temps de relaxation mais qui reste tout de même conséquent de par la modification de l'état hydrique de la cellule. De faible variation de ce paramètre ne sont pas immédiatement visible sur le temps de relaxation. Afin de déterminer si ce paramètre a une forte influence sur le temps de relaxation, il serait intéressant que le fruit soit stressé hydriquement, ainsi nous pourrions voir si nous pouvons faire une corrélation plus précise entre le temps de relaxation et le potentiel hydrique. Le teneur en sucre a plutôt tendance à diminuer le temps de relaxation mais son effet doit être relativement faible sur le temps de relaxation car il n'a pas été observé au cours de l'analyse. Le potentiel osmotique n'est lui pas couplé aux paramètres IRM, il n'est donc pas possible de suivre son évolution grâce à la technique IRM. Ce peut être une mesure complémentaire permettant le calcul de la pression de turgescence. La densité semble être couplée à la microporosité apparente malgré que le coefficient de corrélation soit faible. Les variations de ces 2 paramètres sont contraires

(diminution de la densité et augmentation de la microporosité) mais apparaissent aux mêmes stades de développement.

A partir de ces différentes corrélations entre les paramètres IRM et biologiques, nous avons trouvé plusieurs marqueurs nous permettant de caractériser le développement de la pêche. La microporosité apparente semble pouvoir être un prédicteur de la densité du fruit. Elle semble aussi être un marqueur de la fin de croissance du noyau car à partir du stade 2 (fin de croissance du noyau), l'augmentation de la microporosité est moins importante que lors des stades précédents. Plusieurs marqueurs peuvent être retrouvés à partir du temps de relaxation. Lors des 2 premiers stades (croissance et développement du noyau), nous observons uniquement une augmentation du temps de relaxation long dans les cellules du péricarpe (T_{22}) correspondant à la modification de la vacuole (grandissement). A partir du stade 3, on observe une modification des 2 temps de relaxation, ce moment peut donc être considéré comme le marqueur du début de la croissance du péricarpe. Enfin au dernier stade de croissance, nous devons utiliser un modèle tri exponentiel pour ajuster le plus précisément possibles les paramètres de relaxation. On peut considérer ce changement comme un marqueur de fin de croissance du fruit. On peut donc mettre en place un total de 4 marqueurs du développement du fruit via les différentes séquences IRM que nous avons utilisé au cours de notre étude. Afin d'aller plus loin dans nos connaissances du développement du fruit via la méthode IRM, il serait intéressant de réaliser une étude afin de connaître les raisons de la seule augmentation du temps de relaxation long au cours des premiers stades de développement du fruit. Il aurait aussi été intéressant de réaliser un autre point de mesure pour voir si l'on obtient un plateau dans l'évolution du temps de relaxation. Si l'on arrive à pouvoir définir plus précisément ces marqueurs de développement du fruit, nous pourrions peut-être via les techniques IRM portable qui sont développées, caractériser le développement du fruit au verger directement sur l'arbre

- Baldazzi, V., A. Pinet, G. Vercambre, C. Bénard, B. Biais, and M. Génard. 2013. In-silico analysis of water and carbon relations under stress conditions. A multi-scale perspective centered on fruit. *Frontiers in plant science*. 4:495.
- Clark, C., P. Hockings, D. Joyce, and R. Mazucco. 1997. Application of magnetic resonance imaging to pre-and post-harvest studies of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 11:1-21.
- Clark, C.J., L.N. Drummond, and J.S. MacFall. 1998. Quantitative NMR imaging of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) during growth and ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 78:349-358.
- Clark, C.J., and J.S. MacFall. 2003. Quantitative magnetic resonance imaging of 'Fuyu' persimmon fruit during development and ripening. *Magnetic resonance imaging*. 21:679-685.
- Eccher, G., S. Ferrero, F. Populin, L. Colombo, and A. Botton. 2014. Apple (*Malus domestica* L. Borkh) as an emerging model for fruit development. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 148:157-168.
- Geya, Y., T. Kimura, H. Fujisaki, Y. Terada, K. Kose, T. Haishi, H. Gemma, and Y. Sekozawa. 2013. Longitudinal NMR parameter measurements of Japanese pear fruit during the growing process using a mobile magnetic resonance imaging system. *Journal of Magnetic Resonance*. 226:45-51.
- Hills, B.P., and B. Remigereau. 1997. NMR studies of changes in subcellular water compartmentation in parenchyma apple tissue during drying and freezing. *International journal of food science & technology*. 32:51-61.
- Hochberg, U., C. Albuquerque, S. Rachmilevitch, H. Cochard, R. David-Schwartz, C.R. Brodersen, A. McElrone, and C.W. Windt. 2016. Grapevine petioles are more sensitive to drought induced embolism than stems: evidence from in vivo MRI and microcomputed tomography observations of hydraulic vulnerability segmentation. *Plant, cell & environment*.
- Ishida, N., H. Ogawa, M. Koizumi, and H. Kano. 1997. Ontogenetic changes of the water status and accumulated soluble compounds in growing cherry fruits studied by NMR imaging. *Magnetic resonance in chemistry*. 35.
- Janssen, B.J., K. Thodey, R.J. Schaffer, R. Alba, L. Balakrishnan, R. Bishop, J.H. Bowen, R.N. Crowhurst, A.P. Gleave, and S. Ledger. 2008. Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit. *BMC Plant Biology*. 8:16.
- Lombardo, V.A., S. Osorio, J. Borsani, M.A. Lauxmann, C.A. Bustamante, C.O. Budde, C.S. Andreo, M.V. Lara, A.R. Fernie, and M.F. Drincovich. 2011. Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage. *Plant Physiology*. 157:1696-1710.
- Morandi, B., P. Losciale, L. Manfrini, M. Zibordi, S. Anconelli, F. Galli, E. Pierpaoli, and L.C. Grappadelli. 2014. Increasing water stress negatively affects pear fruit growth by reducing first its xylem and then its phloem inflow. *Journal of plant physiology*. 171:1500-1509.
- Morandi, B., L. Manfrini, P. Losciale, M. Zibordi, and L. Corelli-Grappadelli. 2010. The positive effect of skin transpiration in peach fruit growth. *Journal of plant physiology*. 167:1033-1037.
- Moriwaki, S., Y. Terada, K. Kose, T. Haishi, and Y. Sekozawa. 2014. Visualization and Quantification of Vascular Structure of Fruit Using Magnetic Resonance Microimaging. *Applied Magnetic Resonance*. 45:517-525.
- Musse, M., F. De Guio, S. Quellec, M. Cambert, S. Challos, and A. Davenel. 2010. Quantification of microporosity in fruit by MRI at various magnetic fields:

- comparison with X-ray microtomography. *Magnetic resonance imaging*. 28:1525-1534.
- Musse, M., S. Quellec, M. Cambert, M.-F. Devaux, M. Lahaye, and F. Mariette. 2009a. Monitoring the postharvest ripening of tomato fruit using quantitative MRI and NMR relaxometry. *Postharvest Biology and Technology*. 53:22-35.
- Musse, M., S. Quellec, M.-F. Devaux, M. Cambert, M. Lahaye, and F. Mariette. 2009b. An investigation of the structural aspects of the tomato fruit by means of quantitative nuclear magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance Imaging*. 27:709-719.
- Percy, A.E., L.D. Melton, and P.E. Jameson. 1997. Xyloglucan and hemicelluloses in the cell wall during apple fruit development and ripening. *Plant Science*. 125:31-39.
- Prusova, A. 2016. Light on phloem transport (an MRI approach). Wageningen University.
- Raffo, A., R. Gianferri, R. Barbieri, and E. Brosio. 2005. Ripening of banana fruit monitored by water relaxation and diffusion 1H-NMR measurements. *Food Chemistry*. 89:149-158.
- Rahmati, M., G.H. Davarynejad, M. Génard, M. Bannayan, M. Azizi, and G. Vercambre. 2015. Peach water relations, gas exchange, growth and shoot mortality under water deficit in semi-arid weather conditions. *PloS one*. 10:e0120246.
- Snaar, J.E.M., and H. Van As. 1992. Probing water compartments and membrane permeability in plant cells by (1)H NMR relaxation measurements. *Biophysical Journal*. 63:1654-1658.
- Volz, R.K., F.R. Harker, and S. Lang. 2003. Firmness decline in Gala'apple during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 128:797-802.
- Windt, C.W., F.J. Vergeldt, P.A. De Jager, and H. Van As. 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 & Environment*. 29:1715-1729.
- Winisdorffer, G. 2014. Caractérisation de la microstructure spatiale de la pomme en lien avec ses propriétés mécaniques par des méthodes quantitatives d'IRM. Université de Nantes.
- Wu, B., M.B. Mimoun, M. Genard, F. Lescourret, J. Besset, and C. Bussi. 2005. Peach fruit growth in relation to the leaf-to-fruit ratio, early fruit size and fruit position. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 80:340-345.
- Wu, B.H., M. Genard, F. Lescourret, L. Gomez, and S.H. Li. 2002. Influence of assimilate and water supply on seasonal variation of acids in peach (cv Suncrest). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82:1829-1836.
- Yamaki, S., and M. Ino. 1992. Alteration of cellular compartmentation and membrane permeability to sugars in immature and mature apple fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 117:951-954.

8- CONTENU :

8-1 Pesée et extraction :

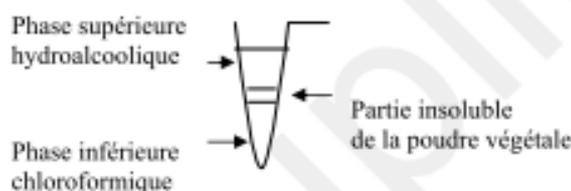
- Disposer les poudres végétales 1h à l'étuve sous vide à 30°C ou directement dans un dessiccateur s'il y a contre-indication
- Identifier une série de 32 microtubes (2 mL).

Opération à répéter 2 fois pour l'ensemble du mode opératoire (1 fois avec des microtubes de 2 mL ou de 1,5 mL (cf. § 8-3) et 1 fois avec des microtubes de 1,5 mL).

- Si l'analyse de l'**amidon** est demandée, et seulement **dans ce cas, tarer la 1^{ère} série de microtubes** de 2 mL, en utilisant le logiciel Basile ou en faisant une saisie manuelle.
- Peser, dans chaque microtube, environ **5 mg** de poudre végétale homogénéisée.
- Disposer les microtubes sur un portoir au-dessus d'un pain de glace froid.
- A l'aide d'un distributeur, ajouter **1 mL** de solution A.
- A l'aide d'un distributeur, ajouter **300 µL** de chloroforme.
- Agiter quelques secondes au vortex puis sur la roue de paillassse pendant 20min (40 tr/min, 4°C).
- Centrifuger 5min (13200tr/min, 4°C)

On observe 2 phases liquides :

La phase supérieure (hydroalcoolique) et la phase inférieure (chloroformique). Les 2 phases sont séparées par la partie insoluble de la poudre végétale.



8-2 Séparation des extraits :

A partir de cette étape, des traitements spécifiques sont nécessaires pour poursuivre l'extraction des sucres solubles et des acides organiques d'une part et de l'amidon d'autre part.

➤ Préparation des extraits « acides organiques - sucres solubles » :

- Disposer les microtubes sur un portoir au-dessus d'un pain de glace froid.
- Transférer **800 µL** de **surageant** (phase supérieure) dans une 2^{ème} série de microtubes. **Le volume des microtubes dépend de l'option de purification choisie** par la suite (cf. § 8-3) : microtubes de **1,5 mL** pour une agitation au **vortex** et de **2 mL** pour une agitation sur la **roue de paillassse**.

NB : Ces extraits sont ensuite évaporés (cf. § 8-3) ; S'ils ne le sont pas immédiatement, ils doivent être conservés à -20°C (à évaporer le plus rapidement possible).

NB : Si l'analyse de l'amidon n'est pas demandée, procéder à l'élimination de l'extrait et du cadot restant dans les microtubes. Dans le cas contraire, procéder à la préparation de l'extrait « amidon ».

➤ **Préparation des « culots amidon » :**

Cette étape, à effectuer uniquement **si l'amidon est à doser**, nécessite d'avoir au préalable procédé à la **préparation des extraits « acides organiques – sucres solubles »** (paragraphe précédent).

- Ajouter **1 mL de méthanol** dans les microtubes contenant le **reste d'extrait et le culot**.
- **Agiter** au vortex quelques secondes puis sur la roue de pailleuse pendant 20min (40 tr/min, 4°C).
- **Centrifuger** 5min (13200 tr/min, 4°C).
- **Éliminer le surnageant** par transvasement **ou** par aspiration avec la pompe à vide et une pipette Pasteur. *La consistance du culot étant variable selon le type de végétal et d'organe, choisir la méthode la plus adaptée pour éliminer le surnageant.*
- Ajouter **100 µL d'éthanol** sur le culot et poursuivre l'**extraction de l'amidon** en se référant au **MO-AL-02-** ou stocker les microtubes à **-20 °C** (faire la suite des opérations le plus tôt possible).

8-3 Evaporation et purification des extraits « sucres solubles - acides organiques » :

Allumer le SpeedVac à l'avance (35 min de mise en route).

- **Evaporer à sec**, au SpeedVac sans chauffage, pendant environ 3h15.
- *A ce stade de l'analyse, il est possible de poursuivre l'analyse immédiatement ou de mettre en attente à -20°C les microtubes contenant les résidus secs.*
- Disposer les microtubes sur un portoir au-dessus d'un pain de glace.
- **Solubiliser** le résidu avec **800 µL d'eau UP**.
- **Vortexer** le mélange et laisser au repos 10 min à 4°C.
- **Purifier l'extrait** en ajoutant environ **5 mg de PVPP** (élimination des composés phénoliques susceptibles d'interférer lors du dosage).
- **Favoriser le contact entre le PVPP et l'extrait**, soit en disposant les microtubes de **2 mL sur la roue de pailleuse** pendant 20 min (40 tr/min, 4°C), soit en **vortexant** fortement **10 secondes** chaque microtube de **1,5 mL, à 3 reprises**, avec des temps de repos intermédiaires de 5 min à 4°C.
- **Centrifuger** 10min (13200 tr/min, 4°C).

A cette étape, si l'extrait et, surtout, si le PVPP sont très colorés, il est possible que tout le PVPP soit saturé. Il faut dans ce cas rajouter les étapes suivantes :

- **Rajouter** environ **5 mg de PVPP**.
- **Favoriser le contact entre le PVPP et l'extrait**, soit en disposant les microtubes de **2 mL sur la roue de pailleuse** pendant 20 min (40 tr/min, 4°C), soit en **vortexant** fortement **10 secondes** chaque microtube de **1,5 mL, à 3 reprises**, avec des temps de repos intermédiaires de 5 min à 4°C.
- **Centrifuger** 10 min (13200 tr/min à +4°C).
- **Transférer** le maximum de **surnageant** dans la 3^{ème} série de microtubes (1,5 mL). *Il est important de ne pas prélever de culot qui pourrait interférer lors du dosage par voie enzymatique.*

Conserver ces extraits à -20°C (dosier le plus rapidement possible) ou stocker à 4 °C pour doser le lendemain par voie enzymatique sur microplaque.

- cf MO-AL-04-, MO-AL-05-, MO-AL-15-, MO-AL-16-, pour méthode manuelle
- cf MO-AL-17-, MO-AL-18-, MO-AL-22-, MO-AL-23-, pour méthode robotisée.

Annexes II

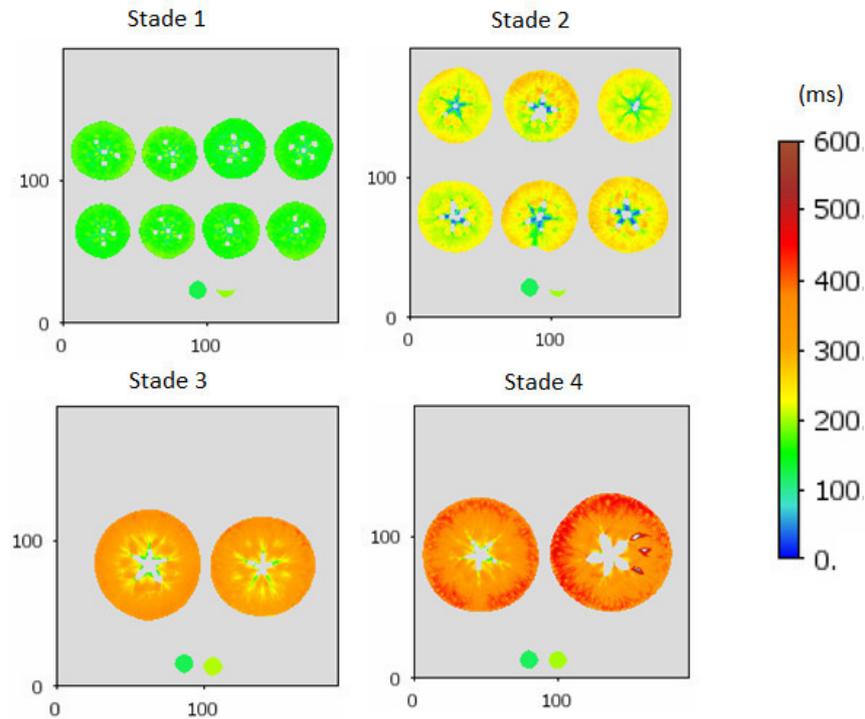


Figure 1: Cartographie T2 de pommes à 4 stade de développement (du stade 1 en haut à gauche jusqu'au stade 4 en bas à droite). Les fausses couleurs nous indiquent la valeur du temps de relaxation T2 (mono exponentiel) pour chaque voxel de l'image.

La figure 1 montre un exemple de cartographies T2 au cours du développement de la pomme. Nous pouvons observer dans cette cartographie qu'il est possible de distinguer deux péricarpes dans la pomme. Cette distinction ne peut se faire qu'à partir du second stade (distinction non visible pour le stade 3 à cause de l'échelle de fausses couleurs communes à l'ensemble des cartographies). Le temps de relaxation est plus long dans le péricarpe extérieur que dans le péricarpe intérieur. Le T2 augmente continuellement au cours du développement du fruit. Il varie de manière importante entre les 2 premiers stades, pour ensuite n'augmenter que peu entre les stades 3 et 4.

Si l'on compare avec la pêche, on peut constater qu'il est possible dans les deux cas de différencier des péricarpes interne et externe dans le fruit. En ce qui concerne les valeurs des temps de relaxation, on voit que chez la pomme l'évolution des T2 est relativement constante au cours du temps alors que pour la pêche, le temps de relaxation était identique au cours des 2 premiers stades et n'évoluait que par la suite. On peut donc supposer que la croissance cellulaire est différente entre les deux espèces puisque c'est le facteur qui impact majoritairement le temps de relaxation.

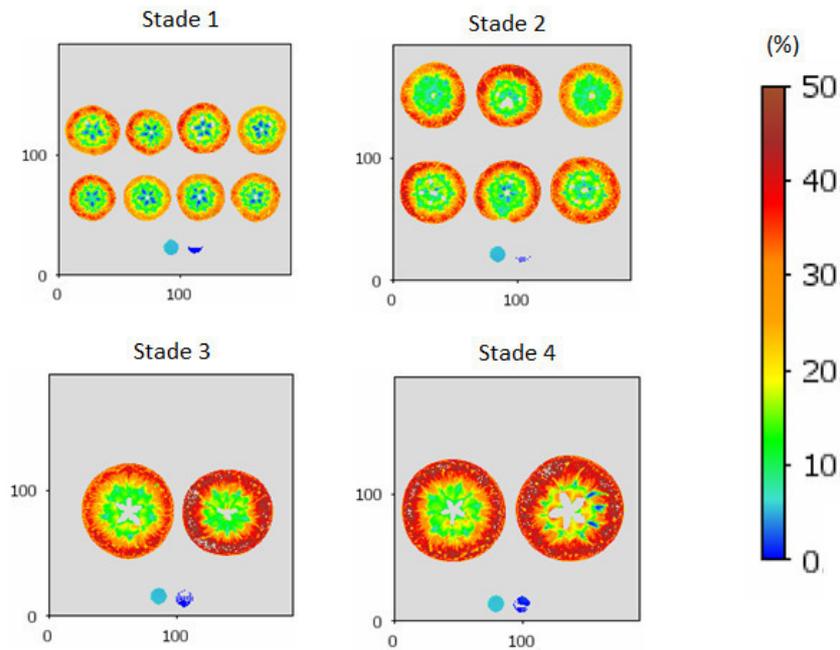


Figure 2: Cartographie de microporosité des pommes pour les 4 stades étudiés. L'échelle de fausse couleur nous renseigne sur la valeur de microporosité de chaque voxel. Les points sans couleur lors des stades 3 et 3 (bas) sont dus à des valeurs de voxel supérieur à l'échelle que nous avons choisie.

La figure 2 montre un exemple de cartographies de microporosité apparente au cours du développement de la pomme. Dès le premier stade, nous obtenons des valeurs de microporosité apparente assez surprenante car elle représente jusqu'à 40% du péricarpe extérieur. Ce phénomène de surestimation de la microporosité apparente dans le cas de la pomme a déjà été observé dans le cas des travaux précédents (Winisdorffer, 2014), étant donné que les valeurs de la microporosité présentées dans la littérature sont d'environ 20-30% en fonction de la technique utilisée et la variété de la pomme (Winisdorffer, 2014). Toutefois, nous pouvons arriver à dissocier les 2 péricarpes (intérieur et extérieur) avec la cartographie de porosité. Dès le premier stade de développement, nous pouvons constater que la porosité est plus importante dans le péricarpe extérieur ce qui est conforme avec la bibliographie (Winisdorffer, 2014). On retrouve une augmentation progressive de la microporosité au cours du temps malgré une très haute valeur dès le premier stade de développement. Quelques sois le stade, on distingue facilement le cœur de la pomme (loge carpellaire) qui possède une microporosité beaucoup moins importante (environ 15% de microporosité dans le tissu).

Ces résultats sont très différents de ceux que l'on a pu constater pour la pêche. Le péricarpe le plus poreux dans la pêche est le péricarpe intérieur alors qu'ici il s'agit du péricarpe extérieur. De plus, la microporosité dans la pêche (maximum 6%) est assez faible comparé à ce qu'on peut retrouver dans la pomme dans le cadre de notre étude (jusqu'à 50%). Ces résultats préliminaires sur la pomme doivent être confirmés pas des analyses postérieures.

	Diplôme : Master 2 Spécialité : Production et technologies du végétal Spécialisation / option : Qualité et valorisation des produits végétaux Enseignant référent : F Cabello-Hurtado
Auteur(s) : Bidault Kévin	Organisme d'accueil : IRSTEA Adresse :
Date de naissance* : 02/07/1994	17 Avenue de Cucillé
Nb pages : 25 Annexe(s) : II	35000 Rennes
Année de soutenance : 2017	Maître de stage : M Musse/N Bertin
Titre français : Mesures par relaxation et imagerie RMN de paramètres biologiques impliqués dans le contrôle de la croissance en volume du fruit chez différentes espèces horticoles Titre anglais : Measures by relaxation and NMR imaging of biological parameters involved in the growth fruit in different horticultural species	
<p>Les laboratoires de recherches cherchent à développer des méthodes non invasives pour mesurer des critères de qualités des fruits et suivre leur évolution en cours de croissance. Durant ce stage, nous avons cherché à mettre en relation les modifications du signal IRM avec l'évolution de paramètres biologiques au cours du développement de deux fruits d'intérêt commercial (pomme et pêche). Nous avons mesuré par IRM les temps de relaxation transversale (T_2) et la microporosité apparente puis mesuré cinq paramètres biologiques (potentiel hydrique et osmotique, teneur en sucre et acide, surface cellulaire). Nous avons réalisé ces mesures à quatre stades de croissance de chacune des espèces. Les T_2 mesurés ont permis d'accéder à des informations sur les compartiments hydriques et leurs évolutions au cours de la croissance. Nous avons constaté que le paramètre ayant le plus d'impact sur les T_2 est la surface cellulaire, elle conduit à l'augmentation du T_2 correspondant à la vacuole au fil de la croissance. Le potentiel hydrique présente également une corrélation avec le T_2 mais ce lien n'est pas encore expliqué. Enfin, nous savons que la teneur en sucre a un impact sur le temps de relaxation mais étant donné les faibles variations de la teneur en sucres totaux, il n'a pas été possible de mettre en évidence ce phénomène. Ce stage aura donc permis d'ouvrir des pistes de recherches pour déterminer l'impact des différents paramètres biologiques de croissance sur le temps de relaxation.</p>	
<p>Research laboratories search to develop no invasive technics for evaluation of factors of fruit quality during fruit growing and storage. In this study, we seek to link modifications in MRI signal and biological parameters during the growth of two fruit (peach and apple). For that, we measured transversal relaxation time (T_2) and apparent microporosity by MRI and five biological parameters (water and osmotic potential, sugar and acid content and cell size). We have made these measurements at four developmental stages for both species. The results of T_2 measurements allowed to access information about water in cell compartments. We observed that cellular area had the greatest impact on T_2; the increase in cell size during fruit growth impacted the relaxation time of MRI signal component corresponding to the vacuolar water. Water potential was also correlated to T_2 but the link between these parameters is not yet explained. Finally, it is known that sugar content can impact relaxation times but this phenomenon was not observed in our experiment because of very slight modifications in sugar content. This study will permit to find suggestions for the future researches to find impact of different biological parameters on the MRI signal</p>	
Mots-clés : Pêche, pomme, IRM, T_2 , surface cellulaire, potentiel hydrique Key Words: Peach, apple, MRI, T_2 , cell size, water potential	