



Etude de la résistance au gel des tiges et des bourgeons de bleuets sauvages nains  
(*Vaccinium Sp.*)

Par Léa Garcia

B.Sc (Chimie des produits naturels)

Mémoire présentée à l'Université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle  
de la maîtrise en ressources renouvelables

Québec, Canada

## RESUME

Dans la littérature, les études sur la résistance au gel ont souvent été limitées à un seul organe (bourgeons, feuilles, aiguilles ou rameaux) et elles sont souvent effectuées sur les arbres et rarement dans des conditions de froid et d'un niveau de neige extrêmes. L'étude porte, ici, sur un petit arbuste, le bleuet sauvage nain, qui pousse dans une région du Québec connue pour ses températures froides et son hiver rude, le Saguenay-Lac-Saint-Jean. D'après l'institut de la statistique du Québec en 2017, les dommages dans les bleuetières du Saguenay-Lac-Saint-Jean sont causés par les crues d'eau, la grêle et le gel. Les températures minimales extrêmes, ou encore, le gel hâtif et tardif, peuvent provoquer des dommages sur les plantes, ce qui entraîne un retard sur leur phénologie et une baisse de rendement de production du fruit. L'objectif principal de cette recherche est de déterminer l'acclimatation et la résistance des plants de bleuet au froid. Les modifications de la résistance au froid et de la teneur en glucides ont été suivies tout au long de l'hiver, sur deux années d'études. L'étude de la résistance au froid, déterminée par l'analyse des fuites d'électrolytes, a été effectuée sur les tiges. Ces valeurs de résistances, ont été liées aux températures de l'air et au niveau de neige qui a été différent au cours des deux hivers. La variation de sucre a été suivie dans trois organes : la tige, les bourgeons végétatifs et floraux durant l'hiver. Parmi les sucres solubles détectés, le raffinose est significativement associé à la résistance au froid. De plus, la concentration d'amidon a diminué tout au long de l'hiver, ce polysaccharide de réserve a été transformé afin de fournir à la plante des sucres solubles pour se protéger et avoir l'énergie nécessaire pour survivre à l'hiver. Les bourgeons floraux étaient les organes les plus concentrés en sucre durant l'hiver. En effet, la plante met en place des mécanismes de transports de sucres solubles vers ces organes, car ils sont indispensables pour la reproduction et la formation des fruits.

## Table des matières

Résumé .....	i
Liste des figures .....	iv
Liste des tableaux .....	vi
Remerciements .....	vii
Avant-propos .....	viii
Problématique .....	1
Introduction .....	4
L'eau sous toute ses formes .....	4
Condition hivernale.....	5
Perturbations métaboliques .....	7
Le gel sur les plantes.....	8
Mécanismes mis en place pour résister au froid .....	10
Les sucres dans l'acclimatation au froid .....	13
La désacclimatation .....	16
Les problèmes dans les cultures .....	17
Objectifs et hypothèses de l'étude .....	19
Matériel et méthode.....	20
Méthode d'échantillonnage, année 1 (2017-2018) .....	21
Traitement au froid à l'aide de la méthode de fuite d'électrolyte .....	23
Méthode d'échantillonnage, année 2 (2018-2019) .....	25
Détermination de la température létale à 50% de fuite d'électrolytes (LT <sub>50</sub> ) .....	27
Identification de la nature des sucres présents dans les différents organes du bleuet.....	29
Analyse de la composition en sucre dans les tiges et les bourgeons du bleuet .....	31
Analyse de la composition en amidon .....	32
Analyses statistiques.....	34
Résultats .....	36
Acclimatation au froid au cours de l'hiver .....	36
Identification des sucres .....	38
Relation entre les différents types de glucides non-structuraux.....	40
Variation des sucres et de l'amidon, de l'automne au printemps .....	42
Modèles régressifs de prédiction du LT <sub>50</sub> .....	50
Discussion .....	55
Conditions environnementales et résistance au froid .....	55
Identification et regroupement des différents glucides pendant l'hiver.....	57
Variation entre les différents organes dans la concentration en sucres .....	59
Variation de la concentration des sucres pendant l'hiver et relation avec le LT <sub>50</sub> .....	60

Variation de la concentration en amidon pendant l'hiver et relation avec le LT50.....	62
Conclusion.....	64
Références .....	67
Annexe 1 .....	74
Annexe 2 .....	75

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Changement d'état au cours de la congélation et de la décongélation d'eau pure (a) et d'une solution aqueuse (b). NT : Température de Nucléation, SC : Surfusion, FP : point de congélation, MP : point de fusion,  $\Delta$  : Dépression du point de fusion (Charrier 2011b). ..... 5
- Figure 2 : Voie des métaboliques de la dégradation de l'amidon en saccharose et polyols avec l'effet de la chaleur (en rouge) ou du froid (en bleu) sur l'exposition de chacune des enzymes impliquées (U = Activation et D = inhibition) (Guy et al. 2008). ..... 14
- Figure 3 : Bleuétière étudiée et représentation des zones échantillonnées pour les deux années. .... 20
- Figure 4 : Exemple d'une parcelle réalisée à l'automne 2017. .... 22
- Figure 5 : Méthode d'échantillonnage systématique le long d'un transect. Chaque échantillonnage était séparé par une distance de 5 m. .... 23
- Figure 6 : Fuite d'électrolyte relative (REL) exprimée en fonction de la température et exemple d'une courbe sigmoïde (calculée pour la parcelle C au mois d'avril 2019). Les étoiles noires correspondent aux fuites calculées pour chaque température cible alors que les points rouges représentent, aux mêmes températures, l'estimation de la fuite d'électrolytes relative par la fonction sigmoïde. L'asymptote supérieure et l'asymptote inférieure sont représentées par des lignes rouges horizontales tandis que l'estimation du  $LT_{50}$  est représentée par une flèche noire (voir le texte pour plus de détails). .... 29
- Figure 7 : Variation de la température maximum (ligne noire) et minimum (ligne rouge) de l'air ( $^{\circ}C$ ), du niveau de neige au sol (en gris, cm) et température en dessous de laquelle il y a 50% de probabilité de mortalité des tiges ( $LT_{50}$   $^{\circ}C$ ) durant la période s'échelonnant de septembre à mai 2017-2018 et 2018-2019. Pour le  $LT_{50}$ , les points noirs représentent la moyenne des 6 parcelles et les barres verticales représentent l'écart type. .... 37
- Figure 8 : CCM de l'extrait avec les différents témoins. .... 38
- Figure 9 : Chromatogramme d'un extrait de tige effectué sur LC-MS correspondant aux échantillons récoltés durant les mois de décembre et de janvier mélangés ensemble pour les fins du test. .... 39
- Figure 10 : Chromatogramme d'un extrait de tige effectué sur HPLC-RID correspondant aux échantillons récoltés durant le mois de novembre. .... 39
- Figure 11 : Diagrammes de l'analyse en composante principale (PCA) regroupés en fonction des axes principales 1 et 2 (à gauche), 1 et 3 (au centre) et 2 et 3 (à droite). .... 41
- Figure 12 : Variation de la concentration en sucre en fonction des mois pour les trois organes étudiés : bourgeons floraux, bourgeons végétatifs et tige durant la période s'échelonnant de septembre à mai 2017-2018 (à gauche) et 2018-2019 (à droite). Les points noirs représentent la moyenne de la concentration en sucre ( $mg.g_{dw}^{-1}$ ) correspondant des 6 parcelles pour les bourgeons floraux (cercles noirs), les bourgeons végétatifs (cercles blancs) et les tiges (losanges gris). Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne. .... 47
- Figure 13 : Variation de la concentration en amidon en fonction des mois pour les trois organes étudiés : bourgeons floraux, bourgeons végétatifs et tige durant la période s'échelonnant de septembre à mai 2017-2018 et 2018-2019. Les points noirs représentent la moyenne de la concentration ( $mg.g_{dw}^{-1}$ ) de

l'amidon des 6 parcelles pour les bourgeons floraux, les points blancs celle des bourgeons végétatifs et les losanges gris celle des tiges et les barres verticales représentent l'écart type..... 49

Figure 14 : Valeurs des  $LT_{50}$  prédites en fonction de la concentration en raffinose ( $mg \cdot g_{dw}^{-1}$ ) et de la température minimum ( $^{\circ}C$ ). Les points gris correspondent à l'année 2017-2018 et les points noirs à l'année 2018-2019..... 51

Figure 15 : Valeurs des  $LT_{50}$  prédites en fonction de la concentration de l'amidon ( $mg \cdot g_{dw}^{-1}$ ) et du glucose ( $mg \cdot g_{dw}^{-1}$ ). Les points gris correspondent à l'année 2017-2018 et les points noirs à l'année 2018-2019. 54

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Distance et direction appliquées lors des échantillonnages, pour chaque parcelle. ....	23
Tableau 2 : Exemple de préparation des échantillons et des solutions témoins, standard et les blancs pour la détermination de la concentration en l'amidon. ....	33
Tableau 3 : Modèles mixtes calculés pour la variation des sucres. Les effets pris en compte dans le modèle sont l'organe et l'année. Pour chaque effet, les résultats incluent le degré de liberté ( $v_1$ , $v_2$ ), la statistique $F$ et la probabilité $P>F$ . La probabilité ( $P$ ) est considérée comme non significative (NS) lorsque $P>0.05$ ..	46
Tableau 4 : Modèles prédictifs du $LT_{50}$ . Les résultats inclus l'estimation du modèle et son erreur standard (standard error, SE), la statistique du test $t$ (pour l'ordonnée à l'origine, intercept) ou $F$ (pour les variables explicative) avec les degrés de liberté ( $v_1$ , $v_2$ ) respectifs et la valeur de la probabilité $P$ . Les différentes statistiques d'ajustement des modèles sont aussi présentées. Les variables explicatives des modèles ont été sélectionnées en afin de minimiser la probabilité $P$ et les différentes statistiques d'ajustement. ....	52

## REMERCIEMENTS

Ces travaux de maîtrise n'auraient pas été possibles sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes. Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dre. Annie Deslauriers, qui m'a offert l'opportunité de réaliser mon projet de maîtrise. Je la remercie également pour ses conseils, son aide précieuse et le soutien qu'elle m'a accordé durant toute la période de ma maîtrise. Je remercie aussi mon co-directeur Dr. André Pichette, qui m'a accueilli dans son laboratoire et pour son aide sur la partie chimie de mon sujet de maîtrise.

J'adresse aussi mes remerciements, à l'équipe de l'UMR PIAF de l'INRA Centre Auvergne Rhône-Alpes, Thierry Ameglio, Guillaume Charrier, Christophe Serre, Romain Baffoin, qui m'ont accueilli dans leur laboratoire. Leur aide m'a été indispensable, pour la compréhension du calcul de LT50 et pour l'ajustement de ma méthode de traitement au froid.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux Entreprises Gérard Doucet qui m'ont permis d'aller échantillonner tous les mois dans leur bleuetière. Et à François Gionest qui m'a accompagné sur le terrain et qui m'a beaucoup aidé pour la mise en place du matériel pour les expériences de traitement au froid.

Merci également au laboratoire d'écologie végétale et au laboratoire Laseve, qui m'ont aidé à effectuer mes manipulations dans leurs laboratoires et pour leur aide au niveau professionnel et personnel. Je remercie aussi le pavillon de recherche sur le givrage et le laboratoire de génétique qui m'ont permis d'utiliser leur matériel.

Je tiens également à remercier les organismes qui ont financé ce projet, le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), les fonds de recherche agroalimentaire axés sur l'agriculture nordique du Saguenay-Lac-Saint-Jean (FRAN-02) et le syndicat des producteurs de bleuet du Québec (SPBQ), sans qui ce projet n'aurait pas été possible.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, à la réussite de ce travail.

Enfin, merci à ma famille, pour leur soutien constant et leurs encouragements.

## AVANT-PROPOS

Ce mémoire a été réalisé dans le cadre du programme de maîtrise en ressources renouvelables de l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC). Mme. Annie Deslauriers est la directrice de ce sujet de recherche et le codirecteur est M. André Pichette. Le projet porte sur l'étude de la résistance au gel des tiges et des bourgeons des bleuets sauvages nains au cours de l'hiver Québécois. Cette résistance au froid a été représenté par la variation de la fuite d'électrolyte et de la concentration en sucres solubles et en amidon. Ces mesures ont été effectués de septembre à mai des années 2017-2018 et 2018-2019. La prise des échantillons, à chaque mois, a été effectuée dans la bleuetière des Entreprises Gérard Doucet situé à St-Honoré. Les températures de l'air et le niveau de neige au sol ont été prises en compte pour l'interprétation des résultats. Cette étude de résistance au gel de l'espèce *Vaccinium angustifolium* (bleuet à feuilles étroites) n'est pas beaucoup retrouvée dans la littérature. De plus, les conditions climatiques extrêmes au cours de l'hiver comme dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean, n'a pas non plus été très étudié. Ce projet de maîtrise a été réalisé et financé grâce aux fonds de développement offerts par la fondation de l'UQAC, les fonds de recherche agroalimentaire axée sur l'agriculture nordique du Saguenay-Lac-Saint-Jean (FRAN-02), les fonds du conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), et les fonds de syndicat des producteurs de bleuet du Québec (SPBQ).

## PROBLEMATIQUE

Le bleuet sauvage nain est une plante indigène qui fait partie de la famille des Ericacées et plus particulièrement du genre *Vaccinium*. Ce genre comprend les espèces *angustifolium* (FNA Ed. Comm. 2009) (Bleuet à feuille étroite) et *myrtilloides* (Bleuet fausse-myrtille) qui représentent les deux genres de bleuets les plus répandus sur le sol Nord-Américain (Nouveau Brunswick Canada). L'espèce *V. angustifolium* est un arbuste bas, épars et généralement de 7 à 38 cm de haut à feuilles caduques. Ses tiges sont multiples et ses branches ramifiées. Le feuillage vert du printemps passe au bleu-vert foncé en été et au marron-violet en automne. De petites fleurs blanches, en forme de cloche et de couleur rose, sont suivies de baies bleues comestibles. Cette espèce est la plus commune dans les champs de production et dans les forêts. L'espèce *V. myrtilloides* est également présente dans les champs mais en très faible proportion (Nouveau Brunswick Canada 2010a). Elle se reconnaît par les poils qui recouvrent la tige et ses feuilles plus volumineuses que le genre *angustifolium*. Lors de cette étude, effectuée en majorité durant la période hivernale, les deux espèces seront dépourvues de feuilles et difficilement différenciables sous le couvert de neige remplie de glace. C'est pour cette raison, que l'espèce *Vaccinium angustifolium* sera considérée comme celle ayant été étudiée.

De nombreuses productions agricoles spécialisées dans les bleuets sauvages sont présentes en Amérique du Nord (Massicotte *et al.* 2017). En 2013, 85.2% de la production mondiale se retrouve sur le continent Nord-Américain, ce qui positionne le bleuet au premier rang des petits fruits produits au Canada (Gouvernement du Québec

2016). Au Québec, la production de bleuets sauvages est une activité économique importante avec une superficie de production qui s'étend sur 33 380 ha. Sur le total de la production de bleuets au Québec, 76% se retrouve dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean (MAPAQ 2017). Avec ses 386 entreprises enregistrées au MAPAQ et 102 non enregistrées, la production en revenu moyen de 2005 à 2010 est d'un peu plus de 45 millions de dollars (Grave 2011). Cette région est une productrice phare de bleuets.

Cependant, la région du Lac-Saint-Jean est aussi connue pour ses températures froides et pour son hiver rude. D'après l'institut de la statistique du Québec en 2017, les dommages dans les bleuetières du Saguenay-Lac-Saint-Jean sont causés par les crues d'eau au printemps, la grêle et le gel (Institut de la statistique Québec). En effet, le gel, qu'il soit printanier (tardif), automnal (hâtif) ou hivernal est un problème fréquent dans les bleuetières aménagées. Les températures minimales extrêmes ou encore le gel hâtif et tardif peuvent provoquer des dommages importants aux structures vivantes des plants, comme la déstabilisation de la membrane, la déshydratation cellulaire due à la formation de glace extracellulaire, l'embolie du xylème et d'autres lésions physiques (Xin et Browse 2000).

Le gel est souvent plus destructeur pour les bourgeons que pour les autres parties des plantes ligneuses (Raven *et al.* 2014). Par exemple, les bourgeons des conifères des milieux boréaux sont souvent plus sensibles aux températures inférieures à 0°C que les aiguilles (Kuprian *et al.* 2017). Ceci peut s'expliquer par le fait que les différents organes ou tissus des végétaux ne se ressemblent pas d'un point de vue anatomique (i.e. possèdent différents tissus cellulaires), ce qui modifie leur sensibilité au froid. En effet, les tiges sont composées de fibres ou de vaisseaux qui sont morts à

maturité et de cellules de parenchymes vivantes alors que les bourgeons sont composés presque uniquement de cellules vivantes tel que les parenchymes médullaires, de réserves et chlorophylliens (Hopkins 2003a).

Les dommages causés par le gel réduisent grandement les rendements en bleuets. En effet, ils nuisent à la croissance et au développement des tissus végétaux et donc, à la production de fruits. Il est donc très important d'étudier l'effet du gel sur différents types de tissus ou organes de la plante. Comme le bleuet est la principale exportation fruitière du Canada, une telle étude permettra une meilleure compréhension de la physiologie hivernale du bleuet nain sauvage et pourrait déboucher vers de nouvelles pratiques de culture. Cette étude sera donc un pas en avant qui, éventuellement, aidera à stabiliser les rendements afin de s'assurer une place de choix parmi les exportateurs mondiaux de bleuets sauvages (Lévesque 2019).

## INTRODUCTION

### L'EAU SOUS TOUTE SES FORMES

L'eau passe de l'état liquide à l'état solide, lorsque la température est inférieure à la température de cristallisation de l'eau pure. Lors du passage de l'eau à la glace, il y a un arrangement ordonné par établissement de 4 liaisons hydrogènes par molécule d'eau formant une structure cristalline (Benson 2008). Le point de nucléation permet la formation d'une structure cristalline des molécules d'eau, sur lesquelles peuvent s'établir des liaisons hydrogènes, c'est ainsi que les cristaux de glace peuvent se former. Si les molécules d'eau ne rencontrent pas de point de nucléation, elles peuvent être dans un état de surfusion, c'est-à-dire rester à l'état liquide à des températures très inférieures à 0°C (Muldrew *et al.* 2004). Ce phénomène de surfusion est un état métastable de la matière, il est dû à une cinétique de changement de phase très lente et à un besoin ponctuel d'énergie (Moyen 2012).

En passant de l'état liquide à l'état solide, les molécules d'eau passent d'un état instable à un état stable et cette augmentation de stabilité s'accompagne d'un dégagement de chaleur observable par l'augmentation transitoire de la température, appelé exotherme (Sakai 1978). Lorsqu'un liquide va passer d'un état liquide à solide, la température va diminuer jusqu'à la température de nucléation, la création des liaisons au sein du cristal va réchauffer le milieu réactionnel. A l'inverse, lors de la fusion, lorsqu'il y a rupture des liaisons entre molécules qui est une réaction endothermique [Figure 1, Charrier (2011a)].

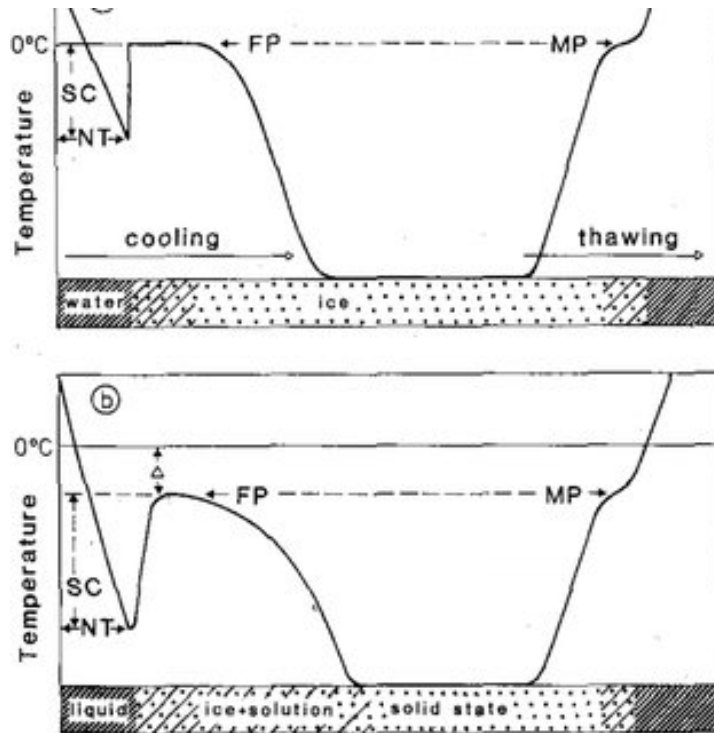


Figure 1 : Changement d'état au cours de la congélation et de la décongélation d'eau pure (a) et d'une solution aqueuse (b). NT : Température de Nucléation, SC : Surfusion, FP : point de congélation, MP : point de fusion,  $\Delta$  : Dépression du point de fusion (Charrier 2011b).

## CONDITION HIVERNALE

La température des végétaux est influencée par la température de l'air. Les parties souterraines resteront relativement protégées par l'effet isolant et l'inertie thermique du sol. Cependant, les parties aériennes seront plus exposées aux variations de températures, donc plus susceptibles d'être endommagées. Plusieurs paramètres influencent la température des organes aériens et souterrains, tel que l'heure de la journée, la saison, le couvert nuageux, la vitesse du vent, la hauteur par rapport au sol ou la profondeur dans le sol pour les racines (Lambers *et al.* 2008). Les conditions hivernales engendrent donc plusieurs formes de stress chez les végétaux. En plus du

stress strictement thermique, le gel ajoute un stress osmotique, hydrique et mécanique (Levitt 1980). Ces différents stress ont des impacts à plusieurs échelles dans les plantes.

Le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique est d'une importance primordiale pour la survie de la plante. La glace va se former dans un premier temps à la surface de la plante, par nucléation hétérogène, puis elle va se propager dans la matrice intercellulaire (Uemura *et al.* 2006). Le potentiel chimique de la glace étant inférieur à celle de la solution non gelée à l'intérieur de la cellule, l'eau à l'intérieur des cellules va en sortir et geler, ce phénomène entraîne la déshydratation cellulaire. La membrane plasmique étant semi-perméable, permet l'afflux ou l'efflux d'eau pendant un cycle de congélation ou de décongélation, respectivement (Figure 1). La survie des cellules pendant un cycle de congélation/décongélation dépend finalement du maintien de la membrane plasmique (Theocharis *et al.* 2012).

Les mouvements des lipides sont ralentis car les interactions hydrophobes entre les chaînes carbonées sont renforcées. La viscosité augmente au sein de la bicouche et la membrane passe d'un état liquide à un état de gel (Uemura et Steponkus 1999). Cet état rigide va limiter les échanges à l'intérieur de la bicouche lipidique et entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

Les lipides membranaires figés vont aussi exercer des contraintes sur des protéines membranaires. Certaines de ces protéines exercent une fonction de canal, ce qui permet de faciliter la diffusion et le transport de molécules au travers de la membrane. La rigidification des lipides restreint la possibilité de réarrangement tridimensionnel nécessaire à l'accomplissement de leur activité biologique. Les facteurs qui influencent la perméabilité membranaire sont la vitesse et la durée de

refroidissement (Keller 2015). Si le refroidissement est lent, la perméabilité de la membrane sera faible. En effet, cette dernière se contracte et restreint le passage aux petites molécules. Lors d'un refroidissement rapide, la contraction trop brusque de la membrane crée des fractures, qui vont augmenter sa perméabilité (Charrier *et al.* 2013a).

#### Perturbations métaboliques

La température exerce une influence sur la vitesse de réaction chimique et par conséquent, biologique. La diminution de la température ambiante favorise les réactions chimiques dans le sens exothermique, donc dans le sens catabolique. Dans une réaction exothermique, l'énergie dégagée par la formation des liaisons chimiques dans les produits de réaction est supérieure à l'énergie requise pour briser les liaisons dans les réactifs (Charrier *et al.* 2013b).

La température a aussi un impact sur la stabilité des molécules qui sont composées de liaisons faibles comme les interactions de van der Waals, liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes et interactions ioniques. Ainsi, la solubilité des protéines globulaires peut être affectée (Ruelland *et al.* 2009).

À l'échelle macroscopique, l'effet des basses températures affecte la vitesse de réactions catalytiques et cela cause un ralentissement de la croissance des plantes, entraînant un retard sur leur phénologie. Par conséquent, la durée de leur cycle annuel de croissance peut être prolongée jusqu'à une période où les températures diminuent et les risques de gel augmentent (Larcher 2003). Des études permettent de connaître la température moyenne minimale pour laquelle 50% des cellules sont lysés, en deçà de

cette dernière, il est considéré que la plante ne peut plus se reproduire et sa survie est compromise.

## LE GEL SUR LES PLANTES

Les plantes sont sensibles aux températures hivernales extrêmes, car elles peuvent infliger des blessures directes ou indirectes aux tissus végétaux. Les blessures directes sont principalement causées par de la glace qui se forme à l'intérieur des cellules. Ces blessures engendrent une déstabilisation des membranes en modifiant leur perméabilité (Sakai et Larcher 2012). La glace peut aussi se former au niveau extracellulaire. Dans ce cas précis, la glace peut entraîner une déshydratation et donc interrompre les transferts d'eau ou d'oxygène, causant alors des stress mécaniques (Ruelland *et al.* 2009).

Les dommages causés par le froid ne sont pas tous identiques et varient en fonction de l'intensité du froid et de l'endroit de formation la glace dans la plante. La glace peut se former dans un premier temps dans les tissus végétaux. La cristallisation de l'eau tissulaire intervient au niveau du lumen, des vaisseaux de large diamètre, le volume extracellulaire étant plus important que le volume intracellulaire, la formation de glace est la plus probable (Steponkus 1984). La glace peut aussi se former au niveau intracellulaire. Cette congélation entraîne la mort cellulaire : en effet, la formation de glace exclue tous les solutés présents dans le cytosol et la concentration en certains composés devient toxique (Rodrigo 2000). Le potentiel osmotique de l'eau étant tellement important, que les interactions moléculaires sont perturbées. La congélation intracellulaire est observée lorsque la cellule n'est plus capable de maintenir l'équilibre avec l'extérieur.

Lorsque le sol commence à geler en hiver, l'appareil racinaire ne peut plus absorber l'eau, ce qui entraîne une dessiccation de la plante. Le cytosol se concentre en solutés (protéines et sucres solubles) et la dépression du point de fusion de la glace augmente progressivement. Le ratio eau libre / eau liée diminue ce qui diminue le taux d'hydratation des parois et des membranes. Au cours de la cristallisation extracellulaire, tous les solutés sont expulsés dans une couche d'eau non gelée très concentrée qui va engendrer une différence de potentiel chimique. Cette différence d'osmolarité engendre des mouvements d'eau à travers la membrane afin de rétablir l'équilibre osmotique. Ce nouvel équilibre va être dépendant des concentrations intra et extra cellulaires (Charrier 2011b).

Le manteau neigeux exerce un effet protecteur, les plantes ne subissent pratiquement pas de perte d'eau et ne sont pas exposées aux températures de l'air qui sont généralement beaucoup plus froide que la température sous la neige (Tompkins *et al.* 2004). Cependant le manteau neigeux peut s'avérer également dommageable pour les plantes lorsqu'il est compact ou glacé. La diffusion des gaz est très ralentie et la concentration en CO<sub>2</sub> issu de la respiration augmente alors que celle en O<sub>2</sub> diminue. Ces conditions peuvent entraîner l'apparition de composés toxiques et des lésions cellulaires (Rakitina 1970). L'épaisseur et la densité de la neige peuvent engendrer des contraintes mécaniques sur les plantes et générer des dommages importants.

Le gel a un impact sur la survie d'un individu mais également sur sa capacité de reproduction. En effet, les organes reproducteurs sont les parties les plus sensibles et, lors d'hivers particulièrement rigoureux, les bourgeons peuvent être endommagés. Dans les bourgeons, la distribution de la glace est inégale et dépend de l'état

d'acclimatation. Dans des bourgeons acclimatés, la glace se forme dans les écailles, alors que désacclimatés, la glace peut se former dans l'ensemble des tissus (Kader et Proebsting 1992). Le gel des bourgeons peut avoir comme conséquence de retarder le débourrement, la floraison ou engendrer la stérilité des appareils reproducteurs (Modlibowska 1957).

## MECANISMES MIS EN PLACE POUR RESISTER AU FROID

Les conditions hivernales constituent un ensemble de stress abiotiques, dont les impacts sont minimisés par une réponse adaptative impliquant de multiples mécanismes d'acclimatation. Cette résistance aux températures gélives est souvent appelée l'endurcissement.

En effet, les plantes possèdent la capacité de résister aux stress par des mécanismes d'évitement ou de tolérance. Les mécanismes d'évitement réduisent l'impact d'un stress bien qu'il soit présent dans l'environnement (Mahajan et Tuteja 2005). Par exemple, pour survivre à la sécheresse, des plantes produisent des feuilles charnues qui stockent l'eau, se couvrent de cuticules épaisses ou deviennent pubescentes, afin de réduire l'évaporation et diminuer les pertes en eau (Fitter et Hay 2012). La tolérance exige que l'organisme soit en équilibre thermodynamique avec le stress, ce qui signifie que les conditions qui règnent dans la plante, sont en équilibre avec les conditions de l'environnement externe. Par exemple, pour une tolérance à la sécheresse, l'organisme doit survivre à une dessiccation qui n'endommage pas son protoplasme et qu'il conserve la capacité de reprendre une croissance normale lorsque le protoplasme sera réhydraté (Wahid *et al.* 2007).

Les plantes peuvent aussi s'adapter ou s'acclimater, ces deux termes ne veulent pas dire la même chose. Les deux s'appliquent à une façon de tolérer un stress particulier. Adaptation se rapporte à des modifications de structure ou de fonction héritables, qui augmentent l'adéquation de l'organisme dans un environnement stressant (Pareek *et al.* 2009). L'acclimatation, par ailleurs se rapporte à des modifications physiologiques non héritables, qui interviennent au cours de la vie d'un individu. Ces modifications se produisent lors d'une exposition graduée à un stress, comme des températures froides ou un dessèchement lent, elles permettent à l'individu de vivre et de se reproduire dans un environnement stressant (Mittler 2006). La capacité de s'acclimater est, bien sûr, un caractère génétique, mais les modifications produites en réponse au stress ne sont pas transmises à la génération suivante. Le processus d'acclimatation à un stress est appelé résistance et les plantes qui se sont acclimater à un stress sont dites résistantes. Par conséquent, les plantes résistantes au gel sont celles qui se sont acclimatées aux basses températures et qui sont capables de survivre aux gelées hivernales (Hopkins 2003a).

Pour les plantes, il est difficile d'éviter le stress induit par les basses températures. Il existe cependant certains mécanismes, comme le mouvement des feuilles et des pétales pour minimiser la perte de chaleur ou encore la physiologie de la plante qui va s'adapter sous l'influence climatique. Par exemple, la sénescence foliaire et l'entrée en dormance, permettent de réduire le risque de gel (Schwartz 2003). En effet, la survie pendant l'hiver des plantes vivaces ligneuses, comme le bleuet sauvage, se fait premièrement par la chute des feuilles permettant de limiter considérablement son besoin en eau pendant l'hiver. Dans un second temps, la survie des tissus vivants est assurée grâce au processus d'acclimatation au froid. Ce processus débute lorsque la

longueur des jours (moins de photopériode) et les températures diminuent (Spann *et al.* 2004). Pendant cette période, les tissus actifs – du point de vue métabolique – entrent progressivement dans un état de dormance, les cellules vivantes s'endurcissent progressivement au froid au cours de l'hiver pour augmenter leur capacité à supporter des températures très froides. Par exemple, pour les feuillus à feuilles caduques, la résistance au gel varie entre - 15°C à - 25°C dans les racines, entre - 25°C à - 35°C dans les bourgeons végétatifs et entre de - 30°C à - 50°C dans les rameaux (Yann *et al.* 2014). Ce processus complexe implique la régulation des gènes, des modifications au niveau de la membrane, l'augmentation des solutés compatibles, l'amélioration des mécanismes antioxydants et la synthèse de protéines protectrices (Xin et Browse 2000). Lorsque les températures commencent à diminuer, et que les plantes s'endurcissent, de nouvelles protéines sont synthétisées pour contribuer à la formation d'enzymes telles l' $\alpha$ -amylase et l'amidon phosphorylase (Hopkins 2003a). Ces enzymes vont dégradés les réserves en amidon afin de former des sucres solubles, qui jouent un rôle important dans l'acclimatation au froid.

Afin de tolérer le froid, les plantes mettent en place un des mécanismes majeurs qui consiste à conserver la fluidité membranaire par maintien de la bicouche lipidique dans un état liquide cristallin nécessaire à son activité biologique (Chinnusamy *et al.* 2007). Le maintien d'une membrane fluide permet de conserver une perméabilité et de limiter les contraintes sur les protéines membranaires, afin de conserver leurs activités. Le gel le plus destructeur est celui qui se crée au niveau intracellulaire, car il provoque des lésions irréversibles aux cellules. Afin de se protéger et de maintenir sa température, le gel extracellulaire est favorisé, la cellule peut se servir du dégagement de chaleur latente produite par la cristallisation (Charrier *et al.* 2013b). Le cytoplasme de la cellule

va par la suite se déshydrater en utilisant la force de succion créée lors de la formation de la glace extracellulaire (Malone et Ashworth 1991). Les plantes ligneuses mettent en place des mécanismes afin de résister aux températures sous le point de congélation. Elles limitent la présence de points de nucléation, afin d'empêcher la cristallisation et de permettre au cytosol d'être en état de surfusion.

#### LES SUCRES DANS L'ACCLIMATATION AU FROID

Une forte résistance au froid est souvent liée à une diminution en eau et une augmentation en solutés, tels que les sucres (Kasuga *et al.* 2007). Le métabolisme des glucides met en jeu plusieurs enzymes qui sont impliquées dans l'augmentation de la pression osmotique intracellulaire ( $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, sucrose synthase, sucrose phosphate synthase). L'activité  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase et amidon phosphorylase montrent une corrélation avec la diminution de la température ; plus les températures sont basses, plus ces enzymes sont produites (Kasuga *et al.* 2007). En effet, pendant la période d'endurcissement, ces enzymes vont dégrader les réserves d'amidon produites à la fin de l'été afin de former des sucres solubles (Figure 2). Au début de l'automne, les glucides sont donc produits et leurs concentrations restent soumises au gel jusqu'au début du durcissement printanier. En effet, ces derniers sont connus comme étant des cryoprotecteurs cellulaires (Lineberger et Steponkus 1980) car ils permettent la stabilisation des membranes cellulaires grâce à des liaisons hydrogènes avec les phospholipides de la membrane (Yuanyuan *et al.* 2009).

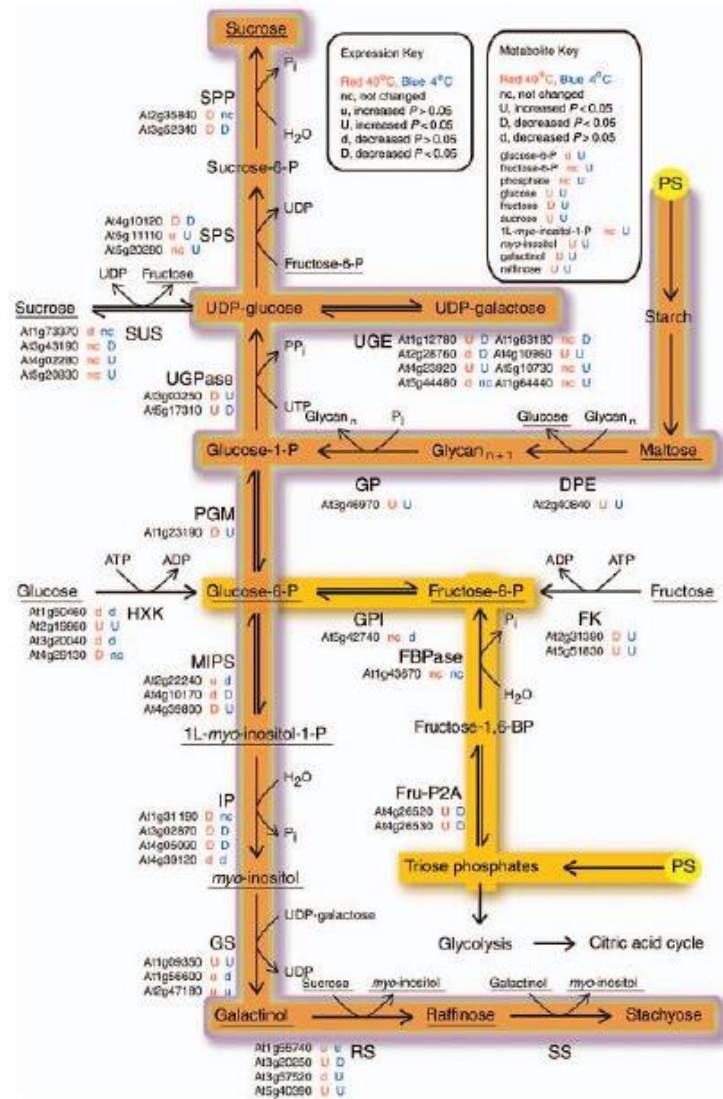


Figure 2 : Voie des métaboliques de la dégradation de l'amidon en saccharose et polyols avec l'effet de la chaleur (en rouge) ou du froid (en bleu) sur l'exposition de chacune des enzymes impliquées (U = Activation et D = inhibition) (Guy et al. 2008).

De plus, l'accumulation en sucres solubles dans les tissus actifs entraîne une diminution du point de congélation et protège les structures cellulaires de la déshydratation induite par le gel (Lee *et al.* 2012; Palacio *et al.* 2015). Les sucres solubles peuvent aussi se lier à des protéines antigels ce qui va permettre d'empêcher la propagation de la glace (Rached-Kanouni 2013). Le sucre le plus connu dans la résistance au froid des végétaux est le raffinose (Klotke *et al.* 2004). Il est notamment reconnu

comme étant un dessiccateur-protecteur, un sucre de transport et de stockage (Zuther *et al.* 2004a).

Parmi les glucides, le saccharose a un effet protecteur qui n'est pas basé uniquement sur l'effet osmotique, mais il a aussi une activité cryoprotectrice, stabilisant les membranes et les protéines (Palonen et Junntila 2001). C'est le sucre le plus transporté des tissus photosynthétiquement actifs (feuilles) au puit non photosynthétique (fleur, fruit, graine, racine). C'est dans ces puits où il est dégradé en glucose et en fructose (Ruan *et al.* 2010). La dégradation du saccharose, permet d'augmenter la concentration en monosaccharides, ce qui contribue à réduire le potentiel hydrique.

En résumé, l'augmentation du contenu en solutés exerce donc un effet protecteur par l'intermédiaire de trois mécanismes différents : l'effet osmotique, qui consiste à une augmentation du contenu en solutés diminue la température de congélation et limite la déshydratation engendrée par la glace. L'effet métabolique, les solutés sont des sources potentielles de substrats pour différentes voies métaboliques dans des conditions où la photosynthèse est fortement réduite (Charrier *et al.* 2013b). Et enfin, comme il a été dit précédemment, les sucres jouent un rôle cryoprotecteur, ils protègent les cellules, les organites, membranes et macromolécules par maintien ou remplacement de la couche de solvation. Les solutés permettent alors de maintenir une couche de protection autour des macromolécules en maintenant leur stabilité (Baek *et al.* 2004).

L'étude de la concentration en sucres solubles pourrait donc fournir des informations précieuses sur les changements qui surviennent lors de l'acclimatation de

la résistance au froid chez le bleuet. Cependant, les principaux sucres associés à l'acclimatation au froid ne sont pas les mêmes selon les espèces. Il est alors important de savoir quel(s) sucre(s) joue(nt) ce rôle chez les bleuets sauvages et comment les réserves en sucres et en amidon sont distribuées dans la plante, pour ensuite faire le lien avec la tolérance au froid des différents organes de la plante (tiges, bourgeons, etc.).

## LA DESACCLIMATATION

En règle générale, les réponses physiologiques qui ont lieu pendant l'acclimatation sont inversées pendant la dé-acclimatation. Ce phénomène est beaucoup plus rapide que celui de l'acclimatation (Charrier 2011b). Lors de ce processus, la plante s'adapte à des températures plus chaudes et entre dans les stades d'éclosion des bourgeons et de la croissance (Kalberer *et al.* 2006). Lors du phénomène de dé-acclimatation les composés carbonés cryoprotectants sont consommés par une respiration accrue lors du début de la croissance. La quantité de sucres solubles intracellulaires diminue avec la diminution de la résistance au gel de la plante.

Au printemps, lorsque les tissus ne sont plus acclimatés au froid, les organes tels les bourgeons, sont plus sensibles à une diminution de la température étant donné que le processus de résistance, n'est plus fonctionnel. Alors, que ce soit en automne ou au printemps, les plants risquent d'être endommagés lorsque des températures chaudes sont entrecoupés d'épisodes beaucoup plus froids, ce qui entraîne une baisse de productivité (Agrinova ; le Club Conseil Bleuet ; le MAPAQ et le CRAAQ 2016). Lors de ces phénomènes, les sucres sont consommés et la quantité d'amidon augmente dû à la diminution de la quantité d'enzymes impliquées dans son hydrolyse (Charrier 2011b).

## LES PROBLEMES DANS LES CULTURES

Le manque de résistance au froid et une sensibilité accrue aux gelées printanières sont les problèmes les plus critiques pour les différents cultivars de bleuets. La congélation endommage souvent les plantes et leurs cellules, c'est un stress environnemental qui affecte la croissance, la répartition géographique et la productivité des champs de cultures (Ehlenfeldt *et al.* 2007). Pour survivre pendant un hiver rigoureux, et reprendre leur croissance au printemps, les plantes vivaces ligneuses, y compris les bleuets, changent donc leur résistance au froid par le biais de processus d'acclimatation au froid et de dé-acclimatation, qui sont déclenchés par des changements de température (Patten *et al.* 1991). L'acclimatation au froid est un processus complexe impliquant une modification de la composition lipidique de la membrane, une augmentation des solutés compatibles, une amélioration des mécanismes antioxydants et une synthèse de protéines protectrices (Beck *et al.* 2007). Les principaux changements survenant pendant l'acclimatation sont généralement inversés pendant la dé-acclimatation.

Au cours de l'acclimatation, les sucres solubles s'accumulent et entraîne une diminution du point de congélation et protège les structures cellulaires de la déshydratation induite par la congélation (Xin et Browse 2000). Cependant, le principal sucre associé à la résistance au froid diffère d'une espèce à l'autre. Le saccharose est un sucre majeur associé à la résistance au froid chez la framboise rouge (Palonen *et al.* 2000). Le glucose et le fructose sont les principaux sucres du chêne (Morin *et al.* 2007), tandis que le stachyose et le raffinose sont associés à la résistance au froid chez le tremble (Cox et Stushnoff 2001). Une étude a été effectuée sur le bleuet en corymbe et

elle a démontré que les sucres fortement associés à la résistance au froid sont le glucose, le fructose et le raffinose (Lee *et al.* 2012).

Les études sur l'acclimatation et la résistance au gel, portent principalement sur des plantes des régions tempérées, les espèces les plus connus sont les noyers et les pommiers. Cette étude porte donc sur l'acclimatation au froid du bleuet sauvage nain (*Vaccinium angustifolium*) au Saguenay Lac-Saint-Jean, une région du Québec (Canada) faisant partie du biome boréale.

## OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE L'ETUDE

Pour que la production de bleuet reste une activité économique importante dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean, il est important de bien connaître les températures minimales tolérées par les plants à différents moments de l'année. De même, connaître la composition en sucres solubles en fonction de l'acclimatation au froid et de la dé-acclimatation, permet de déterminer les principaux sucres associés à la résistance au froid et la répartition des réserves lors des différentes saisons. L'objectif principal de cette recherche est de déterminer l'acclimatation et la résistance des plants de bleuet au froid. Plusieurs organes du plant seront à considérer comme les tiges, les bourgeons floraux et les bourgeons végétatifs.

Les hypothèses émises à l'aide de la littérature, sont que la résistance au froid devrait augmenter lors de l'hiver, puis diminuer lors de la dé-acclimatation des plants au printemps. La concentration en amidon devrait diminuer au cours de l'hiver, car il est dégradé pour former des sucres solubles. La concentration de ces derniers devrait alors augmenter lors de l'acclimatation, puis rapidement diminuer au printemps étant donné qu'ils seront consommés lors de l'ouverture des bourgeons. Une concentration supérieure en sucre dans les bourgeons et une résistance au froid supérieure dans la tige sont attendus. Afin de répondre à ces hypothèses, des tests de résistance au froid seront réalisés de l'automne à la fin de l'hiver et au printemps afin de déterminer la température létale ( $LT_{50}$ ) des tissus considérés. La concentration des sucres et de l'amidon sera mesurée à différent moment de l'année afin de les relier à la résistance au froid.

## MATERIELS ET METHODES

Les échantillonnages ont été effectués à la bleuétière « Les Entreprises Gérard Doucet Ltée » à St-Honoré (Saguenay-Lac-Saint-Jean, Québec), à partir du mois de septembre 2017 à mai 2018 pour la première année, et de septembre 2018 à mai 2019 pour la deuxième année. Ces périodes ont été sélectionnées afin d'étudier la résistance au froid de l'automne au printemps sur deux ans. Lors de l'année 2017-2018, les échantillonnages ont été effectués sur la partie droite du champ car à ce moment, les plants possédaient des bourgeons végétatifs et floraux menant à la production de bleuets à l'été 2018 (Figure 3). Lors l'année suivante (2018-2019), c'est la partie gauche qui a été étudié pour la même raison (champs en production à l'été 2019, Figure 3).



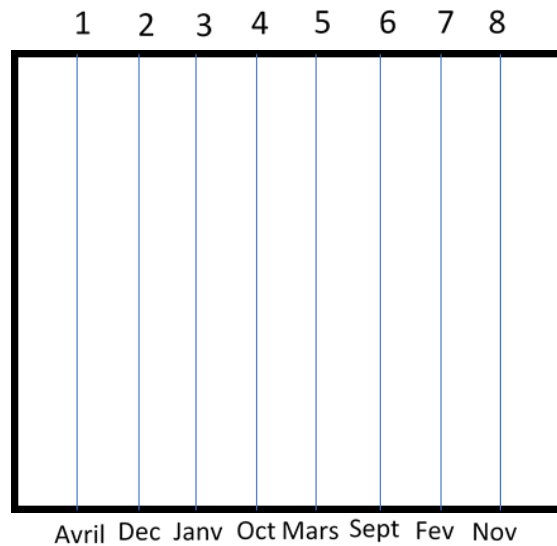
**Figure 3 : Bleuétière étudiée et représentation des zones échantillonnées pour les deux années.**

Dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean, le climat est qualifié de continental humide avec un été tempéré. Les températures moyennes varient entre -20°C en hiver et 18°C en été (Gouvernement du Canada).

#### METHODE D'ECHANTILLONNAGE, ANNEE 1 (2017-2018)

Ce sujet n'ayant jamais été étudié au sein de l'UQAC, la méthodologie a été beaucoup modifiée durant la première année d'étude. Dans un premier temps, la méthodologie a été inspirée de la littérature et par la suite, elle a été adaptée avec le matériel disponible.

A l'automne 2017, six parcelles (A à F, Figure 4) d'une dimension de 2 × 2 m ont été mises en place dans trois champs différents de la bleuetière (Figure 3) pour un total de 2 parcelles par champs. Chaque parcelle, a ensuite été divisée en huit sous-parcelles qui correspondent aux différents moments d'échantillonnage, de l'automne au printemps, chacune de ces sous-parcelles ont été espacées de 25 cm.



**Figure 4 : Exemple d'une parcelle réalisée à l'automne 2017.**

Chaque échantillonnage (un par mois) a été attribué à une sous-parcelle de manière aléatoire. À chaque échantillonnage, dans chaque sous-parcelles, 14 plants ont été récoltés pour le traitement au froid et une vingtaine pour l'analyse des sucres solubles et de l'amidon. Lors des échantillonnages, le matin, les plants ont été placés dans une éprouvette en ayant pris soin, au préalable, d'enroulé du papier absorbant humide autour de la base afin de prévenir la déshydratation des plants. Par la suite, les plants ont été gardés au frais jusqu'à leur arrivée au laboratoire. En après-midi, les plants utilisés pour l'analyse des sucres solubles ont été placés au congélateur à  $-17^{\circ}\text{C}$ . Les organes étudiés lors des analyses de traitement au froid sont les tiges, les bourgeons floraux et les bourgeons végétatifs.

Pour des raisons de conditions extrêmes climatiques (1.20 m de neige), la méthode d'échantillonnage a été modifiée lors de l'échantillonnage du 7 février 2018. Une nouvelle méthode a été donc mise en place et maintenue jusqu'à la fin de la deuxième année d'échantillonnage (année 2, 2018-2019). Un échantillonnage systématique, le long d'un transect, a été privilégié en considérant les arbres en bordure

du champ comme point de repère (représenté par une étoile bleue sur la figure 5). À tous les mois, les échantillonnages suivaient un transect établi à chaque 5 mètres, à partir des arbres bordures. Une certaine distance et orientation étaient aussi maintenue dans chacune des zones échantillonnées afin d'éviter certaines zones près des arbres de bordure (Tableau 1).

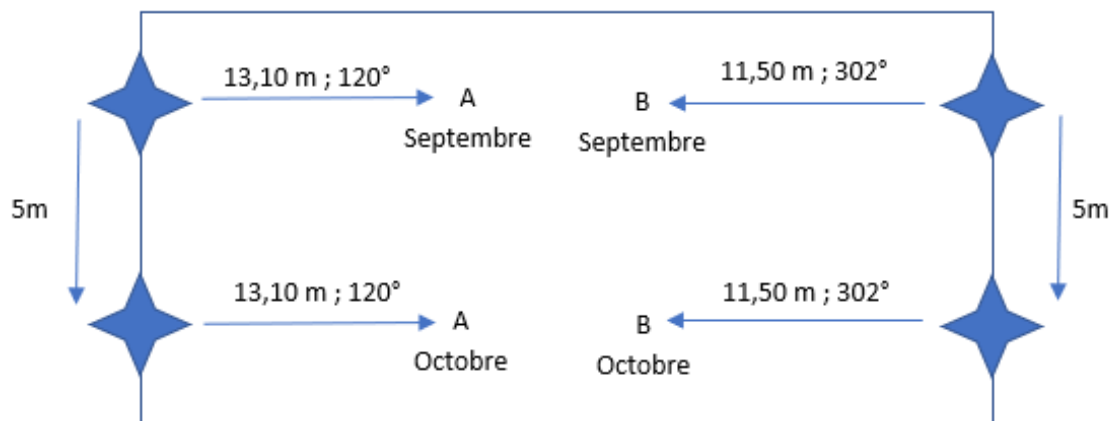


Figure 5 : Méthode d'échantillonnage systématique le long d'un transect. Chaque échantillonnage était séparé par une distance de 5 m.

Tableau 1 : Distance et direction appliquées lors des échantillonnages, pour chaque parcelle.

Parcelle	Distance (m)	Direction (°)
A	13,1	120
B	11,5	302
C	13	118
D	12,2	303
E	14,7	124
F	13,4	295

TRAITEMENT AU FROID A L'AIDE DE LA METHODE DE FUITE D'ELECTROLYTE

Lors de la première année (2017-2018), deux méthodes de test de résistance au froid ont été mis en place : la première étant de séparer les bourgeons des tiges avant le traitement au froid, et la deuxième de les séparer après le traitement au froid. Dans les deux cas, deux tiges de chacune des parcelles ont été utilisées et placées dans des tubes correspondants à la température à atteindre. Quatre tiges par parcelle ont été placées et conservées à 5°C pendant le protocole du traitement au froid afin de servir comme contrôle.

Le traitement au froid a été réalisé dans un bain circulateur refroidissant (VWR 13271-122, modèle : 1180S) muni d'un liquide refroidissant (VWR, PolyScience polycool HC, -50°C). La température minimale de ce bain étant de seulement - 25°C, lorsque le traitement au froid dépassait cette température, les échantillons étaient transportés dans un frigo maintenu à - 80°C (ThermoFisher Scientific – série Forma 89000). Les échantillons étaient placés dans un thermos, ce qui permettait de ralentir la vitesse de descente de la température. Afin de contrôler la température, un thermomètre était placé à l'intérieur du thermos.

Afin d'effectuer les tests de résistance au froid, sept températures cibles ont été sélectionnées à l'aide des moyennes minimales et maximales mensuelles. Ces valeurs ont été obtenus par la station météorologique de Bagotville. Ces températures varient en fonction des mois et étaient toujours plus froides de l'automne à l'hiver et *vice versa* au printemps. Des vials (VWR Vials, Borosilicate Glass with Phenolic Screw Cap, capacity : 3 drams) contenant les plants de bleuets étaient placés dans le bain refroidissant en débutant à 5°C suivie d'une descente de température progressive. Les vials étaient ensuite sortie du bain à mesure que la température cible était rejointe. Une

fois sortie du bain, les vials ont été décongelés à 5°C pendant une nuit. Le lendemain, les bourgeons floraux et végétatifs ont été séparés de la tige à l'aide d'un scalpel chirurgical et une partie de 2 cm, la plus proche de l'apex, a été coupée de la tige. Les organes ont été ensuite placés dans un vial de 30 ml muni d'un bouchon hermétique (VWR Vials, Borosilicate Glass, with Phenolic Screw Cap, capacity : 8 drams) avec une quantité de 10 ml d'eau ultra pure.

Ensuite, les vials ont été installés dans une chambre à pression pour subir un traitement sous vide pendant 3 minutes et placés sur des plaques agitatrices pendant 20 heures avec une agitation douce (Lee *et al.* 2012). Une première mesure de conductivité a été effectuée (C1). À la fin, les échantillons ont été autoclavés pendant 30 minutes à 120°C. Une deuxième mesure de conductivité a été effectuée (C2).

#### **METHODE D'ECHANTILLONNAGE, ANNEE 2 (2018-2019)**

Afin de mieux contrôler la descente des températures, la méthode de traitement au froid a été modifiée à partir du mois d'octobre 2018. A chaque échantillonnage, deux plants entiers de chaque parcelle ont été identifiés et entourés de papier buvard et de papier aluminium. Pour mesurer la température lors du test de refroidissement, une sonde thermocouple, reliée à un enregistreur de données (CR100, Campbell Scientific) a été insérée au centre des plants de bleuets et le tout placé dans des thermos isolés. Par la suite, les thermos ont été placés dans une chambre froide (Envirotronics EH40-2-3) située au pavillon de recherche sur le givrage à l'UQAC. La descente de température de la chambre froide a été fixée à environ 5°C·h<sup>-1</sup>, permettant d'éviter aux plants, un choc de température. Pour cette méthode, huit températures ont été sélectionnées : la première est 5°C, elle a servi de température contrôle (assumant une lyse minimum des

cellules) alors que  $-1^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-30^{\circ}\text{C}$ ,  $-40^{\circ}\text{C}$  et  $-50^{\circ}\text{C}$  représentaient les températures testées pour le traitement au froid. Finalement des thermos contenant des plants ont aussi été placés dans un congélateur de  $-80^{\circ}\text{C}$ , correspond à la température pour laquelle les plants ont subi un maximum de lyse due au gel.

Une fois la température cible rejointe, les thermos ont été sortis de la chambre froide et la totalité des thermos ont été placés à  $5^{\circ}\text{C}$  pendant toute la nuit afin d'assurer une décongélation lente. Par la suite, les bourgeons floraux et végétatifs ont été séparés de la tige à l'aide d'un scalpel chirurgical et une partie de 2 cm a été coupée de la tige (la plus proche de l'apex). Comme lors de la première année, les organes ont été placés dans un vial de 30 ml avec une quantité de 10 ml d'eau ultra pure. La pression a été réduite sur les plants pendant 3 minutes puis les vials ont été placés sur des plaques agitatrices pendant 20 heures avec une agitation douce (Lee *et al.* 2012). Une première mesure de conductivité a été effectuée (C1). À la fin, les échantillons ont été autoclavés pendant 30 minutes à  $120^{\circ}\text{C}$ . Une deuxième mesure de conductivité a été effectuée (C2). Étant donné que la quantité disponible d'électrolytes avec cette méthode était trop faible, le traitement de la tige a été légèrement modifiée. En effet, le matériel libéré (c'est-à-dire les électrolytes) par un bout de tige de 2 cm ayant seulement deux extrémités coupées n'était pas assez représentatif de la lyse produite lors du traitement au froid. Les bourgeons ont donc été séparés des tiges et les tiges entières ont été coupées en petit morceau de 2-3 mm afin d'obtenir une libération d'électrolytes supérieure dans la solution et ainsi obtenir une valeur de lyse plus grande et plus précise. Les deux types de bourgeons (floraux et végétatifs) ont été mélangés et les plus gros bourgeons ont été coupés en deux, afin d'assurer un traitement similaire aux tiges. Cependant, même en mélangeant les deux types de bourgeons, les valeurs de lyses

obtenus n'étaient pas assez fiable d'une point de vue scientifique. C'est pour cette raison que la lyse des bourgeons ne sera pas présentée dans la section des résultats.

#### DETERMINATION DE LA TEMPERATURE LETALE A 50% DE FUITE D'ELECTROLYTES (LT<sub>50</sub>)

La fuite d'électrolyte relative (*REL*) (Mancuso *et al.* 2004) a été calculée selon la formule suivante :

$$REL = \frac{C1}{C2}$$

Où *C1* est la conductivité de la solution d'électrolytes mesurée après le traitement au froid et *C2* est la conductivité de la solution d'électrolytes mesurée après autoclave. Ensuite, la relation entre la fuite d'électrolytes et la température a été calculée selon la relation sigmoïdale suivante :

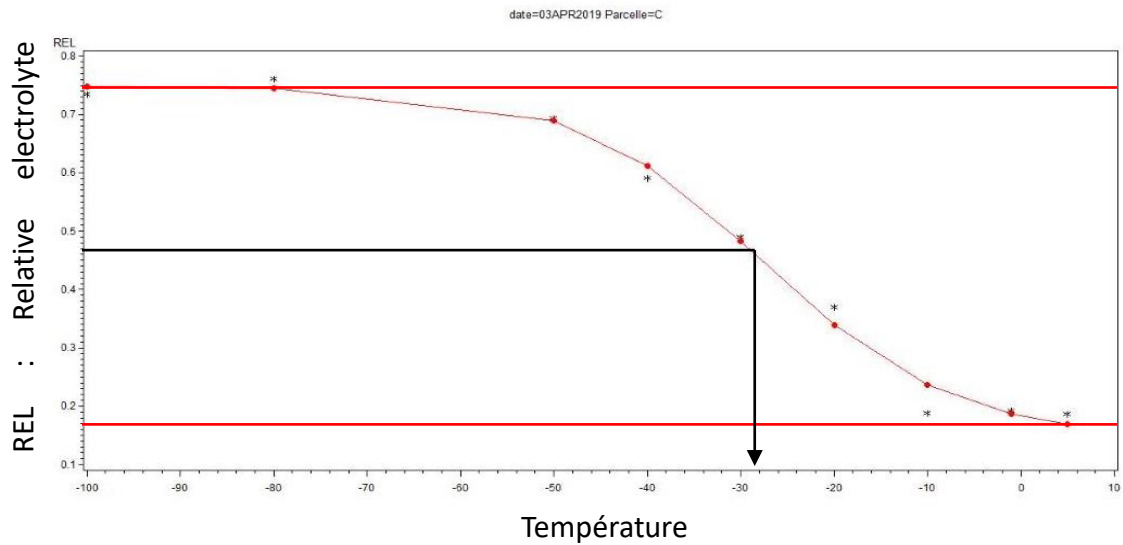
$$REL = \frac{a}{1 + e^{b(c-\theta)}} + d$$

Où  $\theta$  est la température (°C) du test de résistance au froid, les paramètres *a* et *d* définissent les asymptotes inférieures et supérieures de la fonction sigmoïde et *b* est la pente linéaire au point d'inflexion *c* (voir un exemple à la figure 6). L'estimation des paramètres a été réalisée par une procédure de régression non linéaire (PROC NLIN) à l'aide du logiciel d'analyse SAS. Afin d'améliorer l'estimation de la fuite d'électrolyte relative en fonction de la température, par la fonction sigmoïde, un point à -100°C a été défini car cela permettait d'allonger l'asymptote supérieure. Ce point correspond à la

moyenne des fuites à - 80°C pour les six parcelles du même mois (représenté à la figure 6 par le mois d'avril 2019).

Un exemple d'estimation de la fuite d'électrolyte est présenté à la figure 6 où les points rouges correspondent à l'estimation de la courbe sigmoïde logistique à quatre paramètres pour les températures testées. Cette courbe possède une asymptote inférieure et une asymptote supérieure qui varient légèrement en fonction du mois et de la parcelle. Dans l'exemple présenté à la figure 6, la valeur de la lyse minimale de la solution d'électrolyte, correspondant à l'asymptote inférieure était de 17%, tandis que la valeur de la lyse maximale de la solution d'électrolyte correspondant à l'asymptote supérieure, était de 75%. En effet, au niveau expérimental les valeurs de lyse comprennent les électrolytes relargués par les blessures infligées par la découpe des échantillons et les électrolytes relargués par l'autoclave. Les valeurs minimales et maximales de lyse, représentant la fuite d'électrolyte de la solution, ne sont jamais à 0% ou 100% de lyse infligé par le gel. Cela indique un seuil de dommage minimum et maximum des tissus végétaux et qu'ils ne sont jamais complètement détruits entièrement par le traitement au froid (i.e. 100% de lyse). En effet

Finalement, entre l'asymptote inférieure et supérieure, le 50% de fuite d'électrolyte relative (i.e., la lyse, figure 6) correspond au point d'inflexion (c) de la courbe sigmoïde. Ce point d'inflexion, estimé directement par le paramètre  $c$  de la courbe permet de connaître la température pour laquelle 50% des cellules sont lysées (nommé *Lethal temperature at 50%*,  $LT_{50}$ ). Lorsque la température dépasse ce seuil ( $LT_{50}$ ), il y a mortalité de la plante.



**Figure 6 : Fuite d'électrolyte relative (REL) exprimée en fonction de la température et exemple d'une courbe sigmoïde (calculée pour la parcelle C au mois d'avril 2019). Les étoiles noires correspondent aux fuites calculées pour chaque température cible alors que les points rouges représentent, aux mêmes températures, l'estimation de la fuite d'électrolytes relative par la fonction sigmoïde. L'asymptote supérieure et l'asymptote inférieure sont représentées par des lignes rouges horizontales tandis que l'estimation du LT<sub>50</sub> est représentée par une flèche noire (voir le texte pour plus de détails).**

## IDENTIFICATION DE LA NATURE DES SUCRES PRESENTS DANS LES DIFFERENTS ORGANES DU BLEUET

En se basant sur la littérature du bleuet nain, des sucres tels que le glucose, le fructose, le saccharose, le raffinose, le galactose, le xylose et le ribose ont été sélectionnés, car ils sont souvent retrouvés dans les tissus végétaux. Premièrement, des tests CCM (Chromatographie sur Couche Mince) ont été réalisés avec l'extrait de la plante et des sucres témoins afin de faire une première identification. Une quantité de poudre de tige de bleuet de 0.88 mg a été diluée dans 200 µL d'éthanol 95%, ce solvant a été choisi afin de solubiliser les sucres présents dans la tige, et pouvoir par la suite les

identifier. 15  $\mu$ L de cet extrait, a été déposé au bas de la plaque CCM (5 cm  $\times$  20 cm) sur une bande de 1 cm située à 1.5 cm du bord de la plaque. La plaque a ensuite été éluée dans un système de solvant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  dans un rapport 50 :25 : 5 jusqu'à ce que le front de solvant soit à 2 cm du haut de la plaque CCM. La plaque a ensuite été révélée avec une solution de Naphtoresorcinol préparé en milieu acide puis chauffée à 100°C.

Pour l'identification des polyols, la plaque CCM a été migrée dans un mélange de solvant  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}/\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  dans un rapport 45 : 4.5 : 0.5. La plaque a été révélée avec une solution d'acide molybdate d'ammonium cérique (CAM). Les témoins de polyols choisis étaient le myo-inositol, le sorbitol, le xylitol et le mannitol. Ces premiers tests ont été effectués sur des échantillons mélangés de tiges provenant des échantillonnages effectués aux mois de septembre et de novembre 2017 (parcelles A, C et F). Les échantillons ont été extraits dans de l'éthanol à 95%.

L'extrait a été par la suite, injecté sur l'appareil LC-MS unité 1100 LC et instrument G1946 VL MS (Agilent Technologies) avec une source d'ionisation multimode ESI et APCI. La colonne utilisée pour les séparations analytiques est une Hypersil GOLD HILIC (250mm  $\times$  4.6mm). Les solvants qui ont été utilisés, sont de l'acétonitrile (solvant A) et de l'eau (solvant B). Au départ, l'éluant est composé de 10% de solvant B. Pendant 30 minutes, le pourcentage de B est augmenté à 55%. Le volume d'injection était de 10  $\mu$ L, le débit de 1ml/min et la détection a été effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse.

La méthode utilisée par la suite pour le dosage des sucres a servi pour différencier les isomères. Pour cela, les échantillons et les témoins ont été injectés sur l'appareil HPLC unité 1200 et instrument G1362A RID (Agilent Technologies) avec une

pré colonne Shodex SC-LG (50 × 6mm 10µm) et une colonne Shodex SC 1011 sugar series (300 × 8mm 6µm). Cette analyse a une durée de 20 minutes en isocratique 100% H<sub>2</sub>O, la température de la colonne est à 80°C et celle du RID est de 35°C. Pour cette méthode, les échantillons ont été extraits avec 20% EtOH puis l'alcool a été évaporé, à l'aide d'une chambre à vide, pour qu'il ne reste que de l'eau. Par la suite, les échantillons ont subi une extraction sur phase solide (SPE), plus particulièrement sur résine CH, non polaire, dense en électron et très sélective et N<sup>+</sup> Quaterny amino, qui a permis d'extraire les anions forts. Une fois injecté sur HPLC-RID, les sucres et les polyols ont été identifiés avec leurs temps de rétention (voir Annexe 1). Cette méthode et celle sur LC-MS ont permis l'identification d'un sucre important pour la résistance au froid, soit le stachyose.

#### ANALYSE DE LA COMPOSITION EN SUCRE DANS LES TIGES ET LES BOURGEONS DU BLEUET

Pour cette partie, une vingtaine de tiges échantillonnées dans chaque parcelle et à chaque date d'échantillonnage ont été regroupées afin d'obtenir suffisamment de matériel pour l'extraction des sucres solubles et le dosage de l'amidon. Une fois récolté, les échantillons ont été plongés dans l'azote liquide, puis placés dans un lyophilisateur pendant une semaine pour une dessiccation à froid. Une fois les plants bien secs, les bourgeons floraux ou végétatifs ont été séparés de la tige, pour ensuite être broyés à l'aide d'un broyeur à billes (broyeur vibrant MM 200, Retsch).

L'étape de l'extraction des sucres solubles a été séparée en deux parties : la solubilisation des glucides à l'éthanol et la filtration de l'échantillon à l'eau. Après plusieurs tests de solubilités, il a été conclu que l'éthanol à 20% était le solvant qui permettait de solubiliser le plus de sucres. Pour l'extraction, 10 mg de poudre d'échantillon de bourgeons floraux, de bourgeons végétatifs ou de tiges, ont donc été

placés dans une éprouvette de 15 ml et mélangés avec 5 ml d'éthanol 20% et 100  $\mu$ L d'une solution à 1% de sorbitol représentant un étalon interne. Les échantillons ont été centrifugés pendant 10 minutes, et seul les surnageants ont été récupérés. Ces étapes ont été répétées trois fois en tout, mais l'étalon interne n'a été ajouté que lors de la première extraction. Le mélange des surnageants a été évaporé pour enlever l'alcool. Ensuite, les échantillons ont été passés à travers une résine échangeuse d'ions : CH et N<sup>+</sup> Quaternary amino, afin de séparer les sucres et les polyols des composés indésirables, tels que les résines, les pigments ou encore les flavonoïdes. La solution filtrée a été évaporée, puis, purifiée de nouveau à l'aide d'un filtre à seringue en nylon (taille des pores 0,45  $\mu$ m) et injectée au HPLC-RID (Agilent 1200 series) sur une colonne Shodex SC 1011 sugar series (Rossi *et al.* 2007). La concentration en sucre des échantillons est ensuite déterminée à l'aide de courbes standards effectuées pour chacun des sucres identifiés en amont, c'est-à-dire le saccharose, le glucose, le fructose, le raffinose et le stachyose, (Beaulieu 2011).

#### ANALYSE DE LA COMPOSITION EN AMIDON

Le culot récupéré suite à l'analyse des sucres, a été utilisé pour mesurer la concentration en amidon (Bellasio *et al.* 2014). Un ajout de l'enzyme  $\alpha$ -amylase (Megazyme – 3000 U/L), a permis de décomposer l'amidon en oligosaccharides et en dextrines. Cette amylase accélère la digestion de la deuxième enzyme, l'amyloglucosidase (Megazyme – 3260 U/L). Dans un premier temps, la solution  $\alpha$ -amylase – buffer (composé de 850 ml d'eau distillée, de 5.8 ml d'acide acétique glacial, du NaOH 1M, 0.74 g de CaCl<sub>2</sub> déshydraté) a été mélangée et incubée 12 minutes à 90-

100°C. Puis, un volume de 0.15 ml de la deuxième enzyme, l'amyloglucosidase, a été ajouté et les échantillons ont été incubés pendant 45 minutes à 50°C. Le volume des tubes a été par la suite ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée et après avoir été centrifugé pendant 6 minutes, le surnageant est récupéré pour ensuite effectuer l'analyse.

**Tableau 2 : Exemple de préparation des échantillons et des solutions témoins, standard et les blancs pour la détermination de la concentration en l'amidon.**

Échantillon (duplicata)	540 µl H2O distillée 60 µl de surnageant d'échantillon
Témoin d'amidon 4 mg (duplicata) *DILUÉS 1/10	540 µl H2O distillée 60 µl de surnageant de témoin
Standard de glucose GLU (duplicata)	580 µl H2O distillée 20 µl solution standard de glucose
Blanc avec solvant SAB (duplicata)	540 µl H2O distillée 60 µl de surnageant blanc solvant
Blanc STB (duplicata)	600 µl H2O distillée

Par la suite 2 ml de la solution Reagent 3 (réalisé à partir de 100 ml d'eau distillée, 1 capsule de peroxydase (PGO) et 1.6 mL de ortho-dianisidine) ont été ajoutés dans chacun des tubes. La peroxydase (PGO) a permis d'oxyder le glucose en acide gluconique avec une production quantitative de peroxyde d'hydrogène qui a oxydé à son tour le colorant (ortho-dianisidine).

Après avoir reposé pendant 45 minutes dans le noir, 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 75% ont été ajoutés, en effet l'amidon est hydrolysé en condition acide. Afin que la coloration apparaisse, il est important de laisser reposer dans le noir pendant 20 minutes les échantillons. L'absorbance a été mesurée à 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

## ANALYSES STATISTIQUES

Afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus, différentes analyses statistiques ont été effectuées. Dans un premier temps, une analyse en composante principale (Principal Component Analysis, PCA), a permis d'explorer les liens entre les différents types de sucres. Cette analyse a été effectuée avec le logiciel Primer 6. Seules, les trois premières composantes (PC1 à PC3) qui expliquaient la majorité de la variabilité dans les résultats ont été retenues.

Par la suite, des modèles mixtes ont été utilisés pour caractériser les différences entre les organes et les années, dans la concentration en sucre et en amidon (Proc Mixed, SAS). Un modèle par type de sucre a été utilisé. Le type d'organe (tige, bourgeons floraux et bourgeons végétatifs) et l'année ont été considérées comme des variables fixes alors que les parcelles et la date de récolte ont été considérés comme des variables aléatoires. La normalité de la distribution des données a été vérifiée à l'aide de la procédure Univariate (SAS). De plus, la distribution des résidus des modèles mixtes a été vérifiée à l'aide de l'option VCIR (Proc Mixed, SAS). Les différences entre les traitements et la température ont été générées grâce à l'option LSMEANS (Proc Mixed, SAS) utilisant les tests de comparaisons multiples de Bonferroni.

Enfin, des modèles régressifs ont été réalisés, afin de lier la LT50 avec la concentration des différents sucres, ainsi que la hauteur de neige au sol avec les températures minimales, maximales et moyennes (Proc Mixed, SAS). Dans un premier temps, la colinéarité (ou corrélations) entre les variables de sucres a été vérifiée à l'aide de l'option VIF (Variation Inflation Factor) de la procédure de régression (Proc Reg, SAS). Étant donné qu'aucune variable représentant les sucres (incluant l'amidon), ne montrait un facteur d'inflation supérieure à 10, toutes ces variables ont été testées dans les modèles régressifs successifs. En revanche, la colinéarité des températures minimums, maximums et moyennes ayant des facteurs d'inflation > 10, seule la température minimum a été retenue. En effet, cette dernière a été retenue car c'est la température qui risque d'infliger le plus de dommage aux plants de bleuets (limite minimum du gel). Deux modèles régressifs ont, par la suite, été réalisés en tenant compte des types de sucre : un premier incluant seulement l'amidon et le glucose, et un second incluant tous les types de sucre, excluant l'amidon. Dans les deux cas, la température minimum moyenne des 5 jours précédents, la date d'échantillonnage et la hauteur moyenne de la neige étaient aussi insérées dans le modèle régressif. Les modèles ont ensuite été réduits en enlevant les variables non-significatives ( $P > 0.05$ ), en débutant par les interactions entre les sucres et les années. Les modèles finaux étaient donc constitués des variables de sucres et climatiques expliquant, de plus, la variabilité du LT50 ( $P < 0.05$ ). Dans les modèles, les variables aléatoires étaient constituées de la date d'échantillonnage (i.e. le jour julien, JJ), de la parcelle et de l'année selon le schéma suivant : JJ (année), parcelle (année\*JJ). La distribution des résidus des modèles mixtes a été vérifiée à l'aide de l'option VCIR (Proc Mixed, SAS) et à l'aide de graphique.

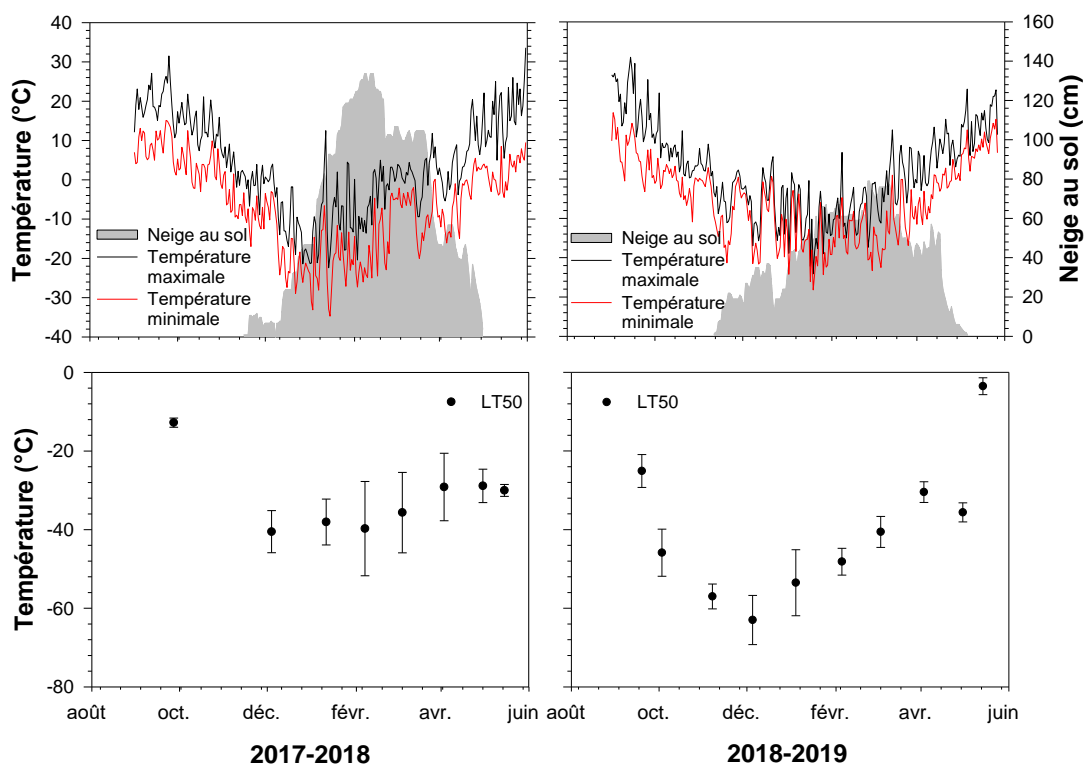
## RESULTATS

### ACCLIMATATION AU FROID AU COURS DE L'HIVER

Durant la première année d'analyse (s'échelonnant de septembre 2017 à mai 2018), le  $LT_{50}$  des tiges a diminué avec les températures de l'air (Figure 7). En effet, de septembre à décembre, la résistance au froid est passée de  $-15^{\circ}\text{C}$  à  $-40^{\circ}\text{C}$ , avec des températures de l'air qui ont chuté de  $20^{\circ}\text{C}$  à  $-10^{\circ}\text{C}$ . Par la suite, les valeurs du  $LT_{50}$  sont restés stables à environ  $-40^{\circ}\text{C}$  de décembre à mars : pendant cette période d'acclimatation au froid, les températures de l'air ont varié entre  $-10^{\circ}\text{C}$  et  $-20^{\circ}\text{C}$ . La température d'acclimatation la plus froide au cours de l'hiver 2017-2018, a été observée au mois de février avec un  $LT_{50}$  avoisinant le  $-45^{\circ}\text{C}$ . Durant cette période, les températures moyennes de l'air oscillaient autour de  $-20^{\circ}\text{C}$  avec un niveau de neige de 120 cm. Malgré une hausse des températures au printemps 2018 avec des valeurs oscillant autour du zéro, le niveau d'acclimatation des plants n'a pas beaucoup varié comparativement aux valeurs observées en février-mars 2018. En effet, des valeurs de  $LT_{50}$  autour de  $-30^{\circ}\text{C}$  ont été observées au mois d'avril et mai, et ce, même après la disparation du couvert de neige au sol à la fin du mois d'avril 2018.

Tout comme en 2017-2018, les valeurs calculées de  $LT_{50}$  pour l'année 2018-2019 ont diminué de septembre à décembre, pour ensuite remonter de janvier à avril (Figure 7). En effet, les valeurs de  $LT_{50}$  ont chuté de  $-25^{\circ}\text{C}$  à  $-65^{\circ}\text{C}$  de septembre à décembre lorsque les températures moyennes de l'air passaient d'environ de  $20^{\circ}\text{C}$  à  $-10^{\circ}\text{C}$ . La température d'acclimatation la plus froide au cours de l'hiver 2018-2019 ( $LT_{50}$  de  $-65^{\circ}\text{C}$ ) a été observée en décembre 2018 lorsque les températures de l'air approchaient les

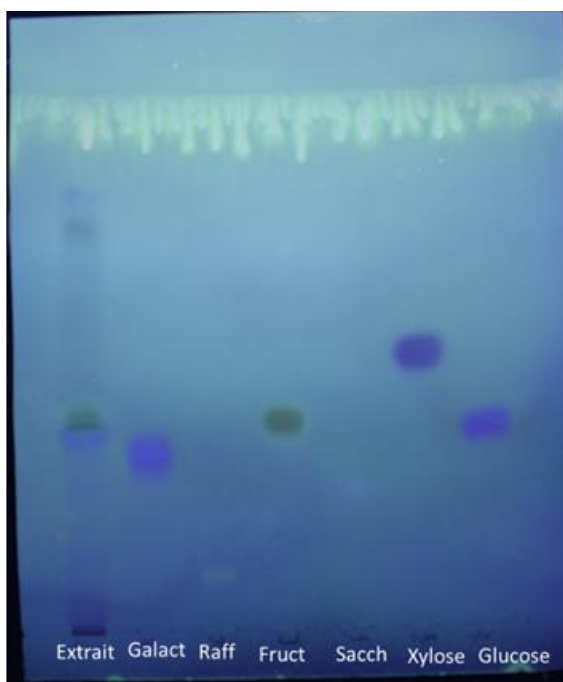
- 10°C, mais avec un niveau de neige de seulement 20 cm. Par la suite, les valeurs de  $LT_{50}$  ont graduellement augmenté, de -50 à -30 °C environ, de janvier à avril. Cependant, lors de l'échantillonnage effectué le 30 avril 2019, la résistance au froid a ré-augmenté avec un  $LT_{50}$  de -40°C : à cette période, seule des traces de neige étaient observées au sol avec des températures de l'air oscillant autour -5°C. À la mi-mai, une valeur de  $LT_{50}$  de -5°C a été calculée lorsque les températures de l'air approchaient les 10°C.



**Figure 7 : Variation de la température maximum (ligne noire) et minimum (ligne rouge) de l'air (°C), du niveau de neige au sol (en gris, cm) et température en dessous de laquelle il y a 50% de probabilité de mortalité des tiges ( $LT_{50}$  °C) durant la période s'échelonnant de septembre à mai 2017-2018 et 2018-2019. Pour le  $LT_{50}$ , les points noirs représentent la moyenne des 6 parcelles et les barres verticales représentent l'écart type.**

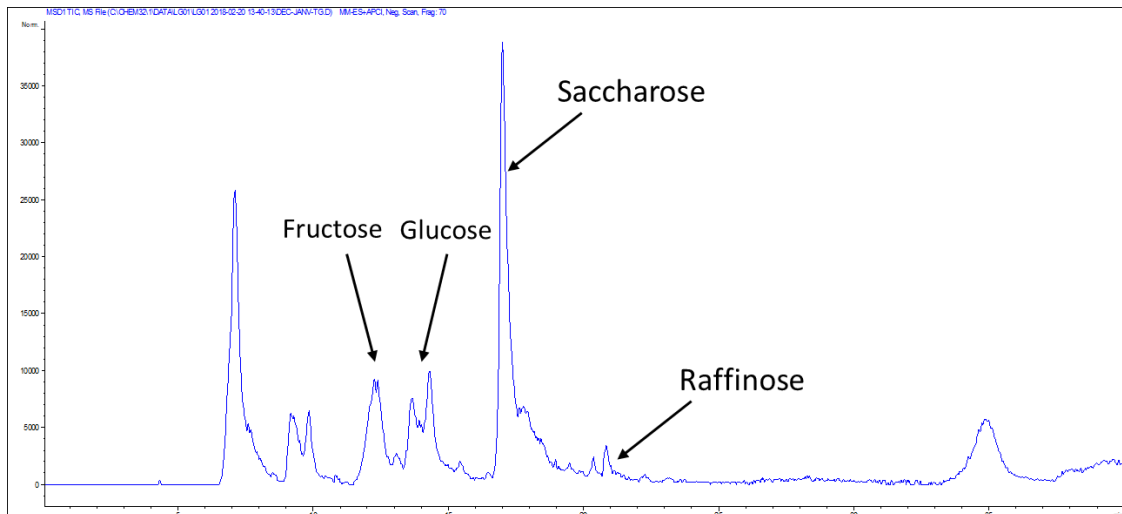
## IDENTIFICATION DES SUCRES

Une première phase d'identification des sucres a été réalisée à l'aide de la chromatographie sur couche mince (CCM) (Figure 8). Cette approche, a permis de supposer la présence de glucose et de fructose dans l'extrait. Cependant, les autres sucres n'étaient pas assez visibles pour être identifier avec cette méthode.



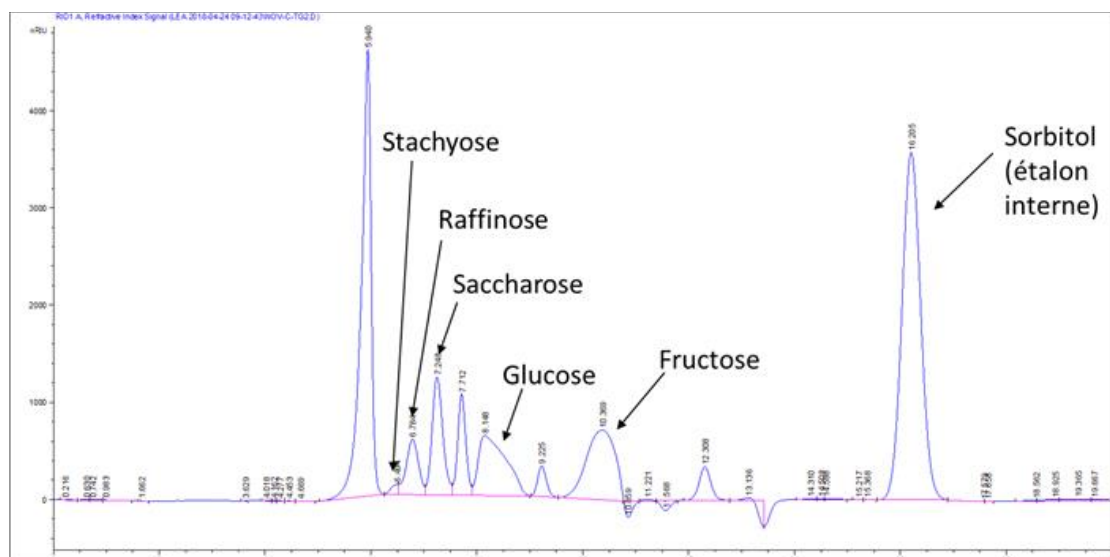
**Figure 8 : CCM de l'extrait avec les différents témoins.**

Étant donné la faible précision de l'identification des sucres par CCM, cette technique n'a pas été retenue pour les dosages successifs. Afin de poursuivre l'identification des différents sucres, l'extrait a été injecté sur LC-MS. Le chromatogramme a révélé la présence de glucose et de fructose ainsi que deux autres sucres qui ont été identifiés à l'aide de témoin, soit le saccharose et le raffinose. L'extraction a été effectuée dans de l'éthanol 20%.



**Figure 9 : Chromatogramme d'un extrait de tige effectué sur LC-MS correspondant aux échantillons récoltés durant les mois de décembre et de janvier mélangés ensemble pour les fins du test.**

Afin de continuer l'identification des sucres, l'extrait a été injecté sur HPLC-RID, avec une colonne Shodex SC 1011 sugar series et une méthode isocratique 100% eau. La présence de glucose, fructose, saccharose et raffinose ainsi que le stachyose a été réalisée à l'aide des témoins correspondants (Figure 10).



**Figure 10 : Chromatogramme d'un extrait de tige effectué sur HPLC-RID correspondant aux échantillons récoltés durant le mois de novembre.**

Plusieurs échantillons correspondant à des mois et à des organes différents ont été injectés pour fins d'analyse. À titre d'exemple, les résultats d'analyse de deux échantillons différents analysés par deux modes de détection différents sont présentés aux Figures 9 et 10.

#### RELATION ENTRE LES DIFFERENTS TYPES DE GLUCIDES NON-STRUCTURAUX

Une analyse en composante principale a été effectuée afin de comprendre la variation des différents types de glucides non-structuraux, incluant les sucres et l'amidon au cours des hivers 2017-2018 et 2018-2019. Les axes 1 et 2 contribuaient respectivement à 40.2% et 32.4% de l'explication de variance, tandis que l'axe 3 contribuait à seulement 14.5% de la variabilité des données (Figure 11). Cette analyse a permis de décortiquer les regroupements entre les différents types de glucides non-structuraux.

Les regroupements observés, en comparant les axes principaux 1 et 2 (Figure 11), montrent que les concentrations de glucose et d'amidon varient de façon inversement proportionnelle aux concentrations de fructose, saccharose, stachyose et raffinose. En effet, une nette séparation de ces groupes de sucres a été observée sur l'axe 1, qui compte pour près de 41% de la variabilité observée. Par la suite, une nette séparation a été observée entre l'amidon et le glucose ainsi que deux autres regroupements entre le fructose - saccharose et le stachyose - raffinose. L'amidon et le glucose ne sont pas corrélés et ont une variation inverse et différentes des autres sucres. L'axe 3, contribuant à seulement 14.5% de l'explication de la variation des sucres, sépare le glucose et le fructose des autres sucres. Les axes 2 et 3 montrent que la variation de l'amidon et du saccharose est similaire, comme celle du raffinose et du stachyose.

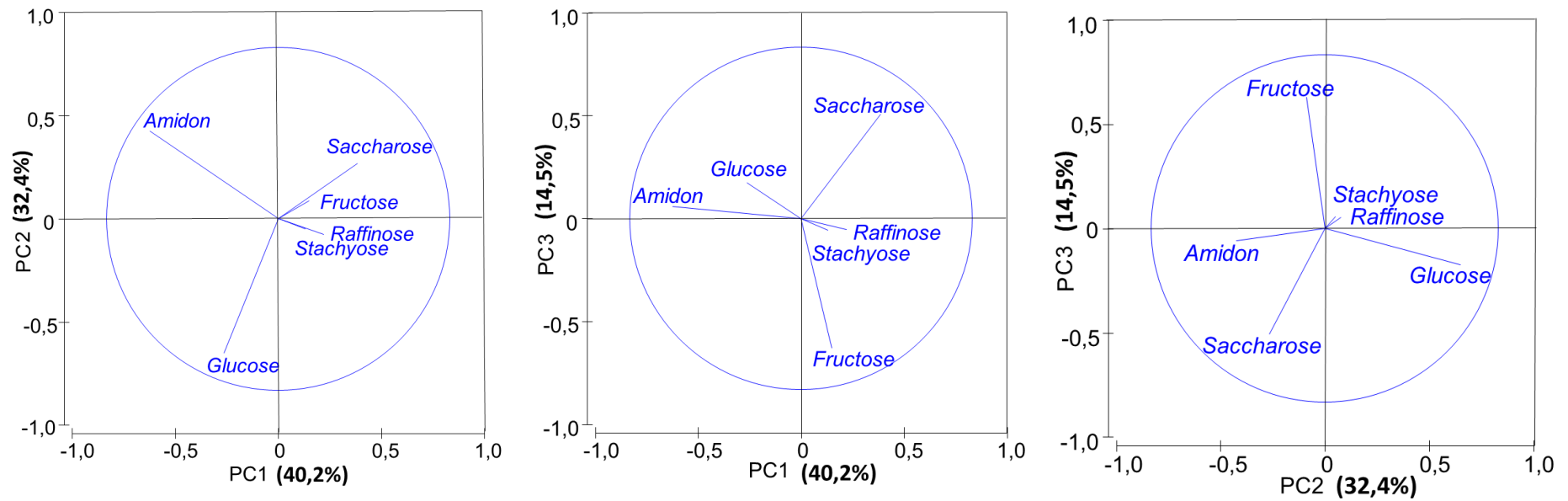


Figure 11 : Diagrammes de l'analyse en composante principale (PCA) regroupés en fonction des axes principales 1 et 2 (à gauche), 1 et 3 (au centre) et 2 et 3 (à droite).

## VARIATION DES SUCRES ET DE L'AMIDON, DE L'AUTOMNE AU PRINTEMPS

Pendant les deux années d'analyses (s'échelonnant de septembre à mai) et dans les trois organes étudiés, la concentration générale des différents sucres augmente au cours de l'hiver, puis diminue au mois d'avril, lorsque les plants se désacclimatent. Cependant, cette augmentation de la concentration des sucres a été plus marquée lors de l'hiver 2017-2018 (Figure 12). En effet, au cours de l'hiver 2018-2019, la variation des concentrations en sucre entre les organes ne suit pas la même tendance. L'effet organe  $\times$  année est significatif pour tous les sucres : pas pour le fructose, le stachyose et l'amidon, ce qui confirme que la variation des sucres solubles est différente d'une année à l'autre, avec des tendances qui divergent (Tableau 3).

Lors de la période s'échelonnant de septembre à mai 2017-2018, la concentration en glucose et en fructose a été supérieure dans les bourgeons végétatifs pour le mois de septembre (Figure 12). Pour le glucose, elle est passée de  $60 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  à  $40 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  de septembre à novembre, puis la concentration est restée autour des  $40 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  de novembre à mars. Pour les bourgeons floraux et les tiges, la concentration de glucose a fortement augmenté en passant de  $20 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  en septembre à  $60 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  en novembre, la concentration en glucose dans ces deux organes a rejoint celle des bourgeons végétatifs en restant autour de  $40 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  du mois de décembre au mois de mars. La concentration de glucose dans les trois organes a ensuite diminué au mois d'avril à environ  $10 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  puis a légèrement augmenté jusqu'à  $20 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  au mois de mai. En revanche, aucune différence significative n'a été trouvée entre les différents organes ( $P > 0.05$ , Tableau 3)

La concentration de fructose dans les bourgeons végétatifs est restée constante, avec des valeurs autour de  $40 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  du mois de septembre 2017 au mois de mars 2018. La concentration dans les bourgeons floraux et les tiges a augmenté de septembre à novembre, puis a varié comme celle des bourgeons végétatifs avec des valeurs autour de  $40 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Par la suite la concentration a diminué pour les trois organes à  $35 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  d'avril à mai (Figure 12). Cependant, une différence significative a été trouvée entre les différents organes ( $P < 0.001$ , tableau 3), avec des valeurs significativement plus élevées chez les bourgeons floraux comparativement aux tiges et aux bourgeons végétatifs (Figure 12).

Comme pour le glucose et le fructose, la teneur en saccharose était supérieure dans les bourgeons végétatifs pour le mois de septembre 2017, puis elle a diminué dans tous les organes au mois de novembre 2017, puis a augmenté jusqu'à  $30 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  de décembre 2017 à avril 2018 (Figure 12). Au mois de mai 2018, la concentration de saccharose dans les différents organes a atteint une valeur minimum de  $20 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ . La variation générale de ce sucre est inverse à la variation du glucose et du fructose. En effet, la concentration en glucose et en fructose a atteint son maximum en novembre 2017. Parallèlement la teneur en saccharose est à son minimum en novembre 2017. Le modèle mixte a démontré une différence significative au niveau de l'année, des organes et de l'année  $\times$  organe (Tableau 3). En effet, la concentration en saccharose est significativement plus élevée dans les bourgeons floraux comparativement aux bourgeons végétatifs ( $P < 0.001$ ) et les tiges ( $P < 0.0006$ ) qui ont des concentrations similaires ( $P > 0.05$ , Tableau 3).

Les variations en raffinose et en stachyose ont été très similaires, bien que le stachyose ait été présent en plus faible quantité que le raffinose (Figure 12). En effet, les bourgeons floraux, ne contenaient pas de stachyose au mois de septembre et novembre 2017 et au mois de mai 2018. Leurs concentrations ont atteints leur maximum au mois de décembre 2017 et de janvier 2018 avec une concentration de 20  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  et 15  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  pour, respectivement, le raffinose et le stachyose. Tous comme le fructose et le saccharose, les bourgeons floraux contenaient significativement plus de raffinose et de stachyose que les autres organes analysés (Tableau 3, Figure 12)

Lors de l'hiver 2018-2019, la variation dans les concentrations de glucose et de fructose ont été beaucoup plus variables entre les organes comparativement à 2017-2018. Pour le glucose, la concentration a augmenté de septembre à mars fluctuant autour de 40  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  et diminuant par la suite de mars à avril pour atteindre une concentration de 10  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Puis, au mois de mai 2019, la concentration a ré-augmentée légèrement jusqu'à 20  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ . La concentration de fructose augmente de 30  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  à 50  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  de septembre à novembre, puis diminue jusqu'à 20  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  pour le mois de janvier. Elle augmente au mois de février vers 40  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ , diminue encore jusqu'au mois d'avril puis augmente à la mi-mai vers 25  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ . La concentration en fructose au cours de cette deuxième année d'étude varie de façon irrégulière, elle n'a pas la même tendance que les autres sucres, c'est-à-dire, augmenter de l'automne à l'hiver puis de diminuer lorsque le printemps arrive.

La concentration de saccharose de l'année 2018-2019 est différente de la première année d'étude. Elle augmente légèrement au mois de novembre jusqu'à 20  $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ , puis diminue au mois de mars et atteint son minimum à la fin avril où la

concentration était à  $5 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  et a ré-augmentée légèrement à la mi-mai pour atteindre les  $15 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Le raffinose et le stachyose sont présents en faible quantité pour la deuxième année de l'étude et le stachyose est toujours présent en plus faible quantité. La concentration du raffinose augmente du mois d'octobre jusqu'au mois de février avec des légères variations entre 15 et  $20 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  puis elle diminue à partir du mois de mars et devient nulle. La concentration de stachyose a approché les  $10 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ , mise à part pour les bourgeons végétatifs pour le mois d'avril, elle a augmenté jusqu'à  $15 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Puis comme le raffinose, sa concentration devient nulle à la mi-mai.

Pour le fructose, le saccharose et le raffinose, l'effet organe est significatif : les bourgeons floraux contiennent plus de ces sucres que les autres organes (Tableau 3). En effet, la variation de ces trois sucres est similaire dans les tiges et dans les bourgeons végétatifs, mais elle est très différente dans les bourgeons floraux. L'effet année est significatif pour le fructose, le saccharose, le raffinose et le stachyose. En effet, les températures et le niveau de neige sont différents d'une année à l'autre, ce qui induit inévitablement une variation différente de ces sucres.

**Tableau 3 : Modèles mixtes calculés pour la variation des sucres. Les effets pris en compte dans le modèle sont l'organe et l'année. Pour chaque effet, les résultats incluent le degré de liberté ( $v_1, v_2$ ), la statistique  $F$  et la probabilité  $P>F$ . La probabilité ( $P$ ) est considérée comme non significative (NS) lorsque  $P>0.05$ .**

		Statistiques			Tests de comparaison multiple		
Sucre	Effet	$v_1, v_2$	$F$	$P > F$	B-fl×B-ve (F)	B-fl×Tige (F)	B-ve×Tige (F)
Glucose	Organe	2, 112	1.16	NS	NS	NS	NS
	Année	1, 16.7	0.76	NS			
	Organe×année	2, 112	4.67	0.0113			
Fructose	Organe	2, 120	13.85	<.0001	<.0001	0.0002	NS
	Année	1, 17.9	8.01	0.0112			
	Organe×année	2, 120	2.38	NS			
Saccharose	Organe	2, 115	10.74	<.0001	<.0001	0.0006	NS
	Année	1, 15.5	15.15	0.0014			
	Organe×année	2, 115	6.73	0.0017			
Raffinose	Organe	2, 96	7.31	0.0011	0.0004	0.0015	NS
	Année	1, 20.1	14.22	0.0012			
	Organe×année	2, 96	3.23	0.0439			
Stachyose	Organe	2, 77.7	0.53	NS	NS	NS	NS
	Année	1, 25.1	8.38	0.0077			
	Organe×année	2, 77.7	1.97	NS			
Amidon	Organe	2, 113	35.14	<.0001	0.0005	<.0001	<.0001
	Année	1, 77.2	2.64	NS			
	Organe×année	2, 113	1.54	NS			

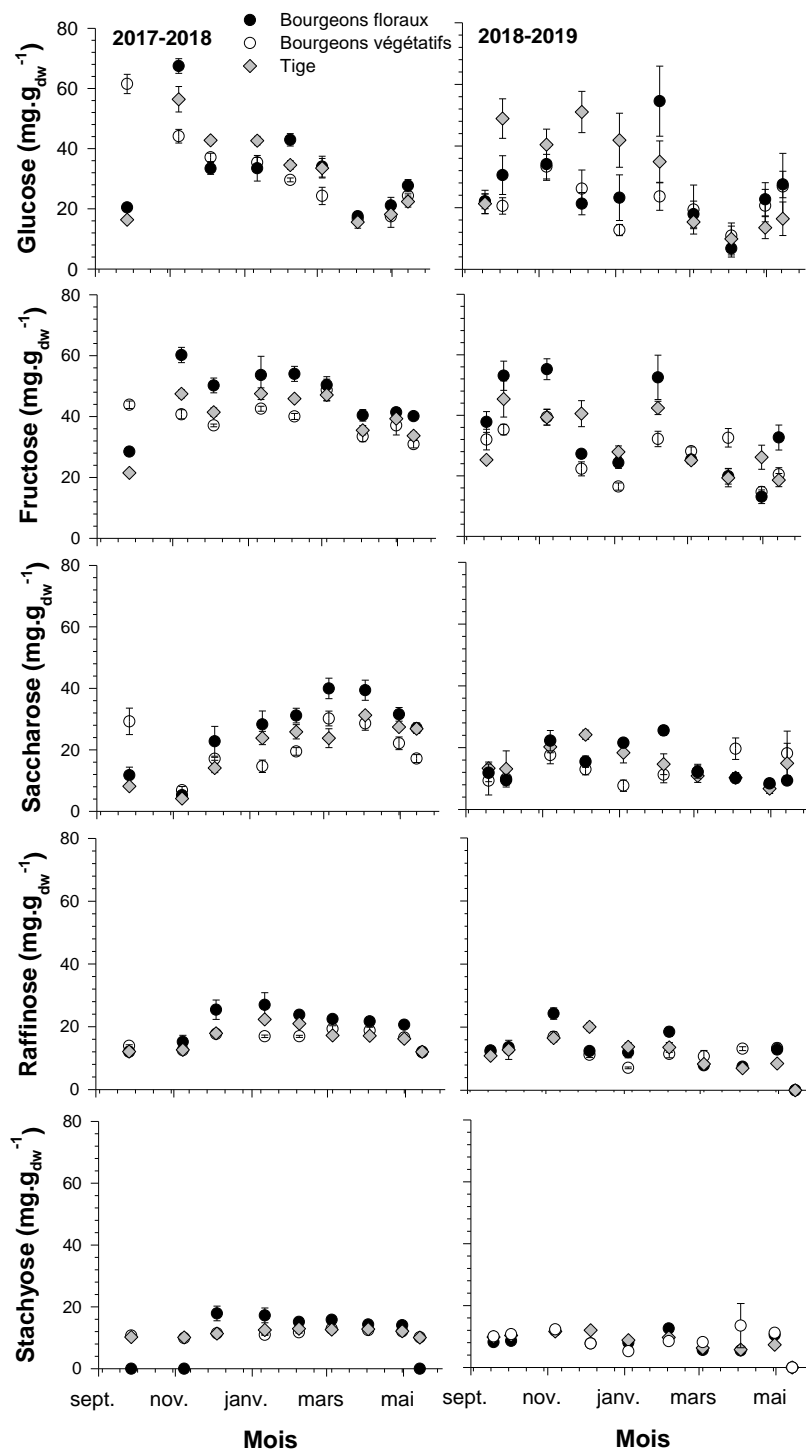


Figure 12 : Variation de la concentration en sucre en fonction des mois pour les trois organes étudiés : bourgeons floraux, bourgeons végétatifs et tige durant la période s'échelonnant de septembre à mai 2017-2018 (à gauche) et 2018-2019 (à droite). Les points noirs représentent la moyenne de la concentration en sucre (mg.g<sub>dw</sub><sup>-1</sup>) correspondant des 6 parcelles pour les bourgeons floraux (cercles noirs), les bourgeons végétatifs (cercles blancs) et les tiges (losanges gris). Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne.

La variation de l'amidon des deux années étudiées (s'échelonnant de septembre à mai 2017-2018 et 2018-2019) est très similaire. En effet, l'année n'est pas significative dans le modèle ( $P > 0.05$ , Tableau 3). Pour les deux années d'études, la concentration d'amidon diminue et devient nulle lorsque les plantes sont acclimatées (Figure 13). Au mois de septembre et de novembre, la tige est fortement concentrée en amidon. Pendant la période de décembre à mars, au même moment où elles ont atteint leur résistance maximale au froid (Figure 7), les réserves sont dégradées et les plantes ne contiennent plus que des sucres solubles (Figure 12). Le facteur organe n'étant pas significatif ( $P < 0.05$ , Tableau 3) confirmant que la variation d'amidon entre les organes est très similaire. En effet, les tiges contenaient pour le mois de septembre lors de la première année  $40 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  et pour la deuxième année  $25 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  d'amidon. Au mois de novembre, la concentration diminue à  $10 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  pour la première année et à  $20 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  pour la deuxième année. Par la suite, la concentration en amidon est nulle pendant tout l'hiver. À la mi-mai, la concentration en amidon augmente dans les tiges, alors qu'elle est restée presque nulle pour les deux types de bourgeons au printemps.

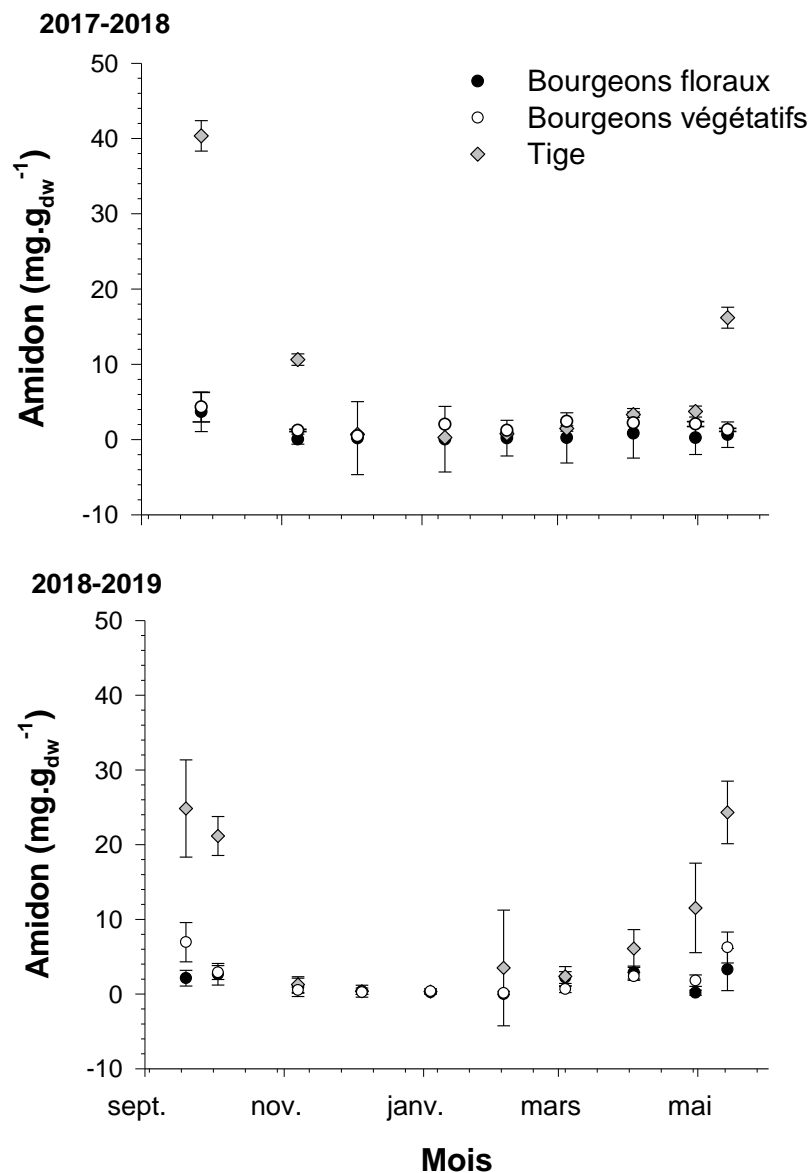
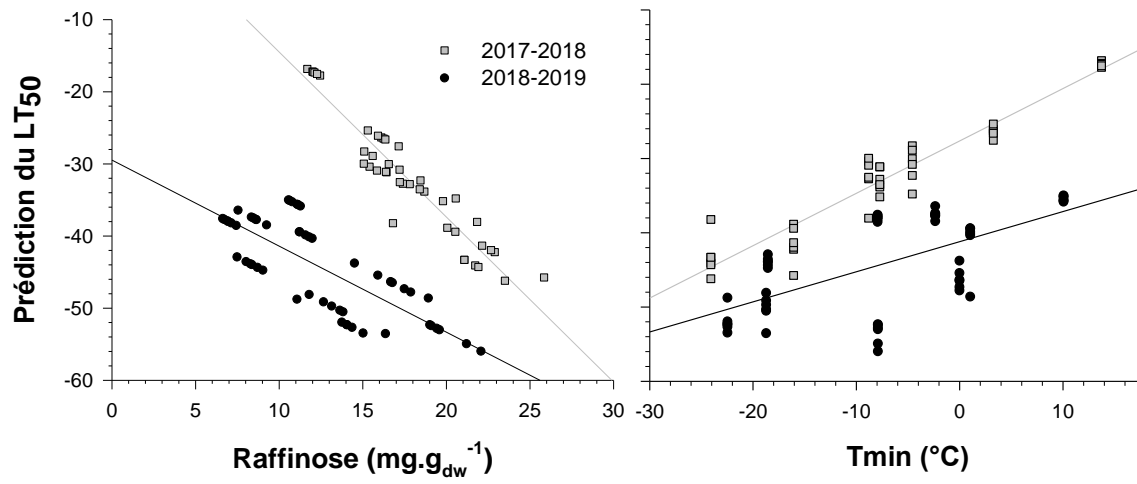


Figure 13 : Variation de la concentration en amidon en fonction des mois pour les trois organes étudiés : bourgeons floraux, bourgeons végétatifs et tige durant la période s'échelonnant de septembre à mai 2017-2018 et 2018-2019. Les points noirs représentent la moyenne de la concentration ( $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ ) de l'amidon des 6 parcelles pour les bourgeons floraux, les points blancs celle des bourgeons végétatifs et les losanges gris celle des tiges et les barres verticales représentent l'écart type.

## MODELES REGRESSIFS DE PREDICTION DU LT<sub>50</sub>

Deux modèles prédictifs ont été retenus pour expliquer les variations du LT<sub>50</sub> en fonction de différentes variables de sucres et climatiques (Tableau 4, Figures 14 et 15). Les différents modèles ont été sélectionnés en fonction des probabilités obtenues par les différentes variables explicatives ( $P < 0.05$ ) et les statistiques d'ajustements (Tableau 4). Pour cette raison, toutes les autres combinaisons de variables testées n'ont pas été retenues. Selon les statistiques d'ajustement des deux modèles, le modèle 1 est légèrement plus robuste que le modèle 2 étant donné des valeurs plus basses de AIC, AICC et BIC.

Le premier modèle obtenu (modèle 1) met en relation le LT<sub>50</sub> avec le raffinose, la température minimum et l'année (Tableau 4, Figure 14). Les valeurs de LT<sub>50</sub> diminuent significativement en fonction de la température minimum moyenne des 5 jours précédant le test de résistance au froid ( $P < 0.05$ ) et en fonction d'une augmentation de la concentration en raffinose ( $P < 0.01$ ). Ce sont ces deux facteurs qui expliquent le plus la variation des LT<sub>50</sub> : Plus la concentration de raffinose augmente, plus la prédiction du LT<sub>50</sub> est faible ; Plus la température minimale est basse, plus la prédiction du LT<sub>50</sub> est basse, la résistance de la plante est donc élevée. Pour le raffinose comme pour la température minimale, les valeurs de la première année s'approchent le plus des valeurs prédites. Cependant, un effet de l'année est aussi présent ( $P < 0.001$ ), créant deux relations bien distinctes pour chacune des années (Figure 14). Même si les deux droites de régression des années ne sont pas parallèles, les effets combinés raffinose  $\times$  année et température minimum  $\times$  année n'étaient pas significatifs ( $P > 0.05$ ) et n'ont pas été retenus dans ce modèle.



**Figure 14 : Valeurs des  $LT_{50}$  prédites en fonction de la concentration en raffinose ( $mg \cdot g_{dw}^{-1}$ ) et de la température minimum ( $^{\circ}C$ ). Les points gris correspondent à l'année 2017-2018 et les points noirs à l'année 2018-2019**

Tableau 4 : Modèles prédictifs du LT<sub>50</sub>. Les résultats incluent l'estimation du modèle et son erreur standard (standard error, SE), la statistique du test t (pour l'ordonnée à l'origine, intercept) ou F (pour les variables explicative) avec les degrés de liberté ( $\nu_1, \nu_2$ ) respectifs et la valeur de la probabilité P. Les différentes statistiques d'ajustement des modèles sont aussi présentées. Les variables explicatives des modèles ont été sélectionnées en afin de minimiser la probabilité P et les différentes statistiques d'ajustement.

Modèle	Effet	Estimation (SE)	Test (t ou F), Probabilité P	Statistique d'ajustement	
1- Sucres et variables climatiques	Intercep	-26.49 (4.82)	-5.49 (24), <0.0001	<b>-2 log Likelihood</b>	621.7
	Raffinose	-1.19 (0.37)	10.34 (1, 45), 0.0024	<b>AIC</b>	627.7
	Temp. Minimum	0.4046 (0.16)	6.49 (1, 9), 0.0305	<b>AICC</b>	628.0
	Année, 1	18.0165 (3.94)	20.86 (1, 13), 0.0006	<b>BIC</b>	630.0
	Année, 2	0	--		
2- Amidon et glucose	Intercep	-42.18 (3.07)	-13.74 (21), <0.0001	<b>-2 log Likelihood</b>	703.9
	Glucose	-0.1576 (0.0607)	6.74 (1, 93), 0.0109	<b>AIC</b>	706.9
	Amidon	0.5295 (0.1088)	23.69 (1, 18), 0.0001	<b>AICC</b>	710.2
	Année, 1	10.24 (3.03)	11.43 (1, 8), 0.0096	<b>BIC</b>	712.6
	Année, 2	0	--		

Le deuxième modèle obtenu (modèle 2) met en relation le  $LT_{50}$  avec le glucose, l'amidon et l'année (Tableau 4, Figure 15). Les valeurs de  $LT_{50}$  diminuent significativement en fonction d'une augmentation de la concentration en glucose ( $P < 0.05$ ) et en fonction d'une diminution de la concentration en amidon ( $P < 0.0001$ ). Donc, plus la concentration en l'amidon est faible, plus la prédiction du  $LT_{50}$  sera faible, c'est-à-dire que les plantes sont fortement résistantes au froid. Inversement, plus la concentration du glucose est élevée, plus la plante sera résistante au froid. Comme dans le cas du modèle 1, un effet significatif de l'année est aussi présent ( $P < 0.01$ ), créant deux relations bien distinctes pour chacune des années (Figure 14). Même si aucun effet combiné de l'année était significatif, les deux droites de régression formées chacune des années sont parallèles, alors qu'elles se croisent dans le cas du glucose. Pour la prédiction du  $LT_{50}$  en fonction de la concentration d'amidon, les valeurs des deux années étudiées sont proches des valeurs prédites. En revanche, sur le graphique qui met en relation la prédiction du  $LT_{50}$  avec la concentration de glucose, ce sont les valeurs de la deuxième année qui sont le plus proche des valeurs prédites. En 2017-2018, les valeurs ne suivent pas la courbe de prédiction.

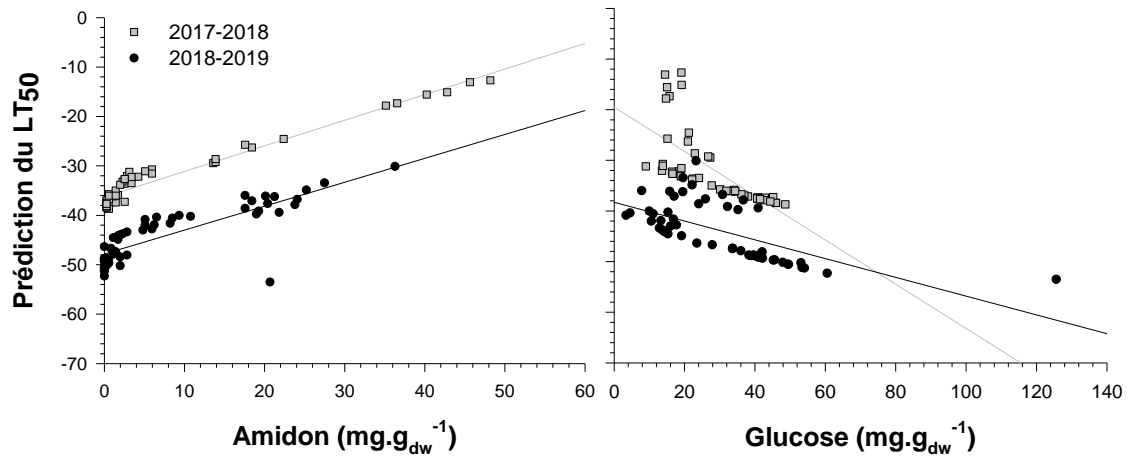


Figure 15 : Valeurs des  $LT_{50}$  prédites en fonction de la concentration de l'amidon ( $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ ) et du glucose ( $\text{mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ ). Les points gris correspondent à l'année 2017-2018 et les points noirs à l'année 2018-2019.

## DISCUSSION

### CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES ET RESISTANCE AU FROID

L'indice d'acclimatation au froid des plants de bleuet, nommé  $LT_{50}$ , a bien suivi les patrons de diminution et d'augmentation de la température, soit de façon visuelle (voir figure 7 par exemple) ou inséré dans un modèle statistique (voir figure 15 par exemple). En revanche, des différences ont été observées entre les années d'étude. Les températures mesurées pendant l'hiver 2017-2018 ont été plus froides que celles de l'hiver 2018-2019, avec des températures minimums qui sont descendues jusqu'à  $-35^{\circ}\text{C}$ , alors qu'elles étaient de  $-25^{\circ}\text{C}$  pour l'année 2018-2019. Malgré des températures moins froides, les plants ont été plus résistants lors de la deuxième année d'étude, étant donné les valeurs de  $LT_{50}$  plus négatives, d'environ une dizaine de degré. En revanche, le niveau de neige au sol a été beaucoup plus important en 2017-2018, avec 140 cm de décembre à mars comparativement à 70 cm pour la même période en 2018-2019. Cela pourrait donc expliquer les valeurs plus basse de  $LT_{50}$  calculées en 2018-2019, car la neige est connue pour jouer un rôle de couche isolante et elle protège les plants des températures extrêmes de l'air (Wildung et Sargent 1988). Il est important de rappeler que deux méthodologies différentes ont été employées pour déterminer la résistance au gel au cours des deux années de suivi, l'effet année a donc aussi pu être influencé par ce paramètre.

En effet, plusieurs auteurs ont observé que la survie et la productivité des plants de bleuets du Minnesota étaient positivement liées aux hauteurs de neige en hiver (Wildung et Sargent 1988; Takeda et Phillips 2011). De plus, des hauteurs de neiges

différentes mènent à des différences significatives dans la résistance au froid chez des arbustes alpins (Palacio *et al.* 2015). En effet, ces auteurs ont observé que les plantes récoltées dans des zones où la neige est peu profonde étaient plus endurcies sur le plan physiologique que des plantes récoltées dans des zones où la couverture de neige est plus épaisse, comme indiqué par les concentrations de sucres qui étaient plus élevées dans le premier cas (Palacio *et al.* 2015). D'ailleurs, ces résultats confirment ce qui a été obtenu au cours de notre étude sur le bleuets.

Les résultats de cette étude montrent que les  $LT_{50}$  peuvent atteindre des valeurs négatives jusqu'à -60°C lorsque les températures de l'air descendent sous la barre des -30°C. Des études effectuées sur l'espèce *Vaccinium corymbosum* L. (Bleuet en corymbe) (FNA Ed. Comm 2009) en Corée au cours de l'année 2012-2013 ont montré que les valeurs de  $LT_{50}$  peuvent descendre jusqu'à -35°C voir -40°C lorsque les températures extérieures atteignent leur minimum, c'est-à-dire vers les -35°C (Lee *et al.* 2012; Lee 2013). Malgré des températures de l'air assez similaires entre notre étude et celle de Lee *et al.* (2012, 2013), les bleuets sauvages nains du Saguenay-Lac-Saint-Jean sont beaucoup plus résistants que les bleuets en corymbe situés en Corée. D'autres études portant sur des espèces boréales ont démontré que l'épinette noire et l'épinette blanche étaient des espèces très résistantes, même plus résistantes que le pin gris. En effet, les valeurs de  $LT_{50}$  mesurées chez l'épinette noire et blanche étaient de -60°C au mois de décembre, alors que celle du pin gris étaient de -50°C (Man *et al.* 2015; Man *et al.* 2017). Tout de même, ces valeurs se rapprochent beaucoup plus de celles obtenues dans cette étude pour les bleuets nains sauvages. En revanche, les températures de l'air observées dans les études sur la résistance au froid chez les épinettes et les pins étaient beaucoup plus chaudes que celles mesurées au cours de cette étude. Par exemple, au

mois de décembre, les températures dans les études de Mans et al. (2015,2017) étaient autour de 0°C alors que celles entre janvier à mars atteignaient les -10°C, ce qui est bien au-dessus des températures mesurées au Saguenay-Lac-Saint-Jean, qui variaient entre -20°C et -30°C.

Pour la première année d'étude (2017-2018), les plants n'étaient pas encore désacclimatés à la dernière date d'échantillonnage au printemps 2018. En effet, la  $LT_{50}$  était encore à des valeurs très négatives, -30°C le 15 mai 2018 alors que pour la deuxième année d'étude, cette valeur était de l'ordre de -5°C le 14 mai 2019. Le niveau de neige au sol pourrait aussi expliquer ces résultats divergents entre les deux années d'étude : lors du printemps 2019, les plants ont été exposés de façon plus précoce aux variations externes des températures de l'air, étant donné que le niveau de neige était inférieur à 10 cm à partir du 27 avril 2019. Les plants se sont donc désacclimatés plus rapidement que, lors de la première année où la couche de neige est passée de 60 cm en avril à un niveau quasiment nul au 1<sup>er</sup> mai 2018.

#### IDENTIFICATION ET REGROUPEMENT DES DIFFERENTS GLUCIDES PENDANT L'HIVER

Cinq sucres principaux ont été identifiés au cours de la période s'échelonnant de l'automne au printemps avec des concentrations qui augmentent au cours de l'hiver selon le degré de résistance au froid. En plus des sucres solubles, la concentration en amidon a aussi été mesurée. Les différentes concentrations mesurées au cours des deux années ont permis de comprendre les interrelations existant entre les types de sucre et l'amidon. Un premier groupement identifié est celui formé par la variation du glucose et de l'amidon. Deux autres regroupements de sucres ont aussi été identifiés dont celui formé par le fructose – saccharose et celui formé par le stachyose – raffinose.

Une nette séparation a été observée entre l'amidon et le glucose, ces deux variables contiennent tous les deux une information distincte et peuvent ainsi être utilisées pour modéliser la résistance au gel. L'amidon étant formé de plusieurs unités de glucose, leurs variations sont inverses, moins il y a d'amidon, plus il y a de glucose, surtout en l'absence de photosynthèse comme durant la période hivernale (Sulpice *et al.* 2009). Les plantes soumises à un stress abiotique tel que le froid, réagissent en mobilisant des réserves d'amidon pour fournir de l'énergie pour la croissance lorsque la photosynthèse est limitée, voire impossible, ces réserves d'amidon fournissent aussi des osmoprotecteurs et des solutés compatibles tel que le glucose (MacNeill *et al.* 2017).

Les résultats de l'analyse en composante principale, ont aussi démontré que la variation de la concentration du saccharose est similaire à celle du fructose. En effet, ces deux sucres sont produits de la même façon : la dégradation de l'amidon va produire du maltose, dans le cytosol, le maltose est converti en glucose, ce qui forme par la suite du fructose et du saccharose (Krasensky et Jonak 2012). De plus, ils ont un rôle important dans la période d'acclimatation au froid, car leur accumulation est adaptative. Plus les plantes sont soumises à des stress abiotiques comme le froid, plus la quantité de saccharose et de fructose augmente et vice versa (Guy *et al.* 1992). Pour sa part, le fructose, est un sucre qui a des capacités d'antioxydant car il répond au stress oxydatif qui est induit par le froid (Bogdanović *et al.* 2008). Le saccharose joue un rôle de cryoprotecteur étant donné qu'il est transporté vers les tissus non photosynthétiques afin d'y être métabolisé et d'assurer une protection complète à la plante (Hopkins 2003b).

Le dernier groupement est formé par le raffinose et le stachyose qui sont les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO) les plus connus et les plus fréquents chez les plantes. Ces oligosaccharides sont formés à l'aide du galactinol, qui lui-même est synthétisé à partir du polyol myo-inositol est de l'UDP-galactose. De plus, l'activité de la galactinol-synthase est accrue à basse température, ce qui justifie l'accumulation d'oligosaccharides pendant l'hiver (Sprenger et Keller 2000). Le raffinose et le stachyose sont connus pour ne pas être présents en très grande quantité dans les plantes. Ils interviennent lorsque la plante est soumise à un stress environnemental, comme le froid. C'est pour cette raison, que la concentration de ces deux sucres augmente au cours de l'hiver, de façon synchrone. Ces sucres sont ensuite consommés pour fournir l'énergie nécessaire à la plante pour continuer sa croissance, par exemple pour le développement de nouvelles fibres dans les tissus des fleurs (Tarpley et Sassenrath 2006).

#### VARIATION ENTRE LES DIFFERENTS ORGANES DANS LA CONCENTRATION EN SUCRES

De tous les organes, les bourgeons floraux sont plus concentrés en fructose, raffinose et stachyose, que les bourgeons végétatifs et les tiges, expliquant l'effet significatif de l'organe dans la majorité des tests de comparaison de la concentration en sucre. Pour leur part, les tiges contiennent beaucoup de tissus ligneux morts à maturité, ce qui pourrait expliquer une concentration plus faible en sucre par rapport aux bourgeons floraux (Deslauriers *et al.* 2014).

Cette différence de concentration peut s'expliquer par le fait que les bourgeons floraux sont les organes les plus protégés, car ce sont eux qui vont permettre la floraison et la production des fruits. Cela pourrait expliquer le fait que les bourgeons floraux

contiennent plus de sucres comparativement aux bourgeons végétatifs. Les bourgeons ont un fonctionnement discontinu, lorsque les conditions environnementales deviennent néfastes pour la survie des tissus vivants, c'est-à-dire lorsque les températures chutent et la durée des journées raccourcies, ils entrent en dormance (Bilavcik *et al.* 2012). L'activité des bourgeons re- commence au printemps suivant, et c'est à ce moment que la concentration des sucres transportés dans les bourgeons floraux au cours de l'hiver, diminue, autrement dit ces sucres sont consommés. Pendant la floraison, la demande en glucide est permanente, de l'évocation florale jusqu'à la maturation des organes floraux et des fruits (Gourieroux *et al.* 2016). Les réserves glucidiques ont un rôle majeur lors de la floraison, influençant fortement le succès reproducteur et la croissance des fleurs chez les ligneux (Oliveira et Priestley 1988). Les sucres impliqués dans l'évocation florale et dans le développement de la fleur peuvent être des sucres solubles comme le saccharose ou des sucres insolubles comme l'amidon (Bernier *et al.* 1993).

#### VARIATION DE LA CONCENTRATION DES SUCRES PENDANT L'HIVER ET RELATION AVEC LE $LT_{50}$

La concentration en raffinose et en stachyose a augmenté dans les tiges comme dans les bourgeons, au cours de l'hiver avec des concentrations significativement supérieures dans les bourgeons. Les concentrations de raffinose retrouvées dans les plants de bleuets étaient d'environ  $15 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ , dans les tiges et elles ont atteint plus de  $20 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  à partir du mois de janvier dans les bourgeons. Pour le stachyose, les concentrations mesurées au cours de l'hiver étaient respectivement d'environ  $10 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  et  $5 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ , pour les tiges et les bourgeons. Par conséquent, malgré leurs faibles concentrations relatives, le raffinose et le stachyose peuvent jouer un rôle décisif

dans la tolérance au gel (Palonen 1999). Chez de nombreuses espèces de plantes, la quantité d'oligosaccharides accroît au cours du processus d'acclimatation au froid, ils s'accumulent en même temps, que la teneur en eau diminue dans les tissus végétaux (Zuther *et al.* 2004b). En effet, l'étude effectuée en Corée sur les bleuets en corymbe, confirme le fait que le raffinose et le stachyose soient présents en petite quantité (Lee *et al.* 2012): au cours de l'hiver, la concentration en raffinose a augmenté, elle est passée de  $1 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  en septembre à  $4 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  au mois de janvier, pour retomber aux alentours de  $1 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  au mois de mars. Pour le stachyose, la concentration était nulle au mois de septembre et octobre, comme dans les bourgeons floraux tel qu'observé, lors de notre première année d'étude (Lee *et al.* 2012).

Les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFO) sont les carbohydrates les plus impliqués lors de l'exposition à un stress abiotique (Nishizawa-Yokoi *et al.* 2008; dos Santos *et al.* 2011). Ces sucres peuvent avoir une fonction particulière dans la résistance au froid car ils facilitent la vitrification, c'est-à-dire la formation de verre intracellulaire au lieu de la cristallisation. Ils empêchent alors le saccharose de cristalliser pendant le stress de déshydratation hivernale et préserver ainsi son effet cryoprotecteur (Charrier 2011b). En effet, s'il cristallise, les groupes hydroxyles du saccharose ne sont pas disponibles pour remplacer l'eau dans les groupes phospholipides de la membrane (EISayed *et al.* 2014).

Étant donné les fonctions essentielles du raffinose lors de la résistance au froid, ce sucre a été directement mis en relation avec la résistance au froid des bleuets sauvages, soit les  $LT_{50}$  mesurées (modèle 1). Dans un premier modèle régressif, tous les sucres ont été pris en considération (sauf l'amidon, voir la section suivante) mais seul le

raffinose et la température minimale étaient significatifs et expliquaient les variations de la résistance au froid ( $LT_{50}$ ) mesurées au cours de l'hiver. Ce modèle a donc illustré de façon précise l'effet combiné des températures froides sur l'augmentation de la résistance au froid (plus la température minimale est basse, plus la prédiction du  $LT_{50}$  est basse) et sur la mise en place de mécanisme de résistance via le raffinose (la concentration de raffinose augmente à mesure que la prédiction du  $LT_{50}$  diminue). Ces résultats coïncident avec les résultats présentés précédemment. En effet, le raffinose est un sucre qui intervient lorsque la plante est soumise à un stress environnemental comme la résistance à des températures extrêmes et négatives.

#### VARIATION DE LA CONCENTRATION EN AMIDON PENDANT L'HIVER ET RELATION AVEC LE $LT_{50}$

La teneur en amidon dans les plants de bleuets a diminué au cours de l'acclimatation, lorsque les plants ont commencé à s'endurcir, la concentration en amidon était nulle et ce, dans tous les organes analysés. En effet, les bourgeons, ne contenaient pas d'amidon pendant une grande majorité de la période d'étude (septembre à mai) car l'amidon n'est pas synthétisé à cet endroit ; la plante transporte les sucres dans les bourgeons floraux afin de les fournir en énergie et de les protéger contre le froid. Du mois de septembre au mois de mai, la concentration d'amidon dans les deux types de bourgeons est donc restée aux alentours de  $0 \text{ mg.g}_{dw}^{-1}$ , pour les deux années d'études. Alors que dans les tiges, la concentration lors de la première année d'étude, pour le mois de septembre était à  $40 \text{ mg.g}_{dw}^{-1}$ , elle est passée ensuite à  $10 \text{ mg.g}_{dw}^{-1}$ , pour le mois de novembre puis elle est devenue nulle de décembre à avril, pour finalement ré-augmenter à  $15 \text{ mg.g}_{dw}^{-1}$  en mai. Pour la deuxième année, la concentration d'amidon dans la tige, pour les mois de septembre et de novembre, sont

respectivement à  $25 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  et  $20 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Du mois de novembre, au mois de janvier, la concentration est nulle, puis elle ré-augmente au mois de février à  $5 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  jusqu'au mois de mai où elle atteint la même concentration qu'au mois de septembre c'est-à-dire  $20 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Des valeurs comparables ont été rapportées dans la littérature, par exemple sur une étude effectuée sur le sapin baumier du New Brunswick, au Canada, ou encore, sur les bleuets sauvages en Nouvelle-Ecosse. Dans la première étude, l'amidon est présent seulement de mai à juillet, et a atteint son maximum en juin avec une concentration de  $160 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$ . Pendant le reste de l'année, la concentration en amidon est stabilisée au tour de  $10 \text{ mg.g}_{\text{dw}}^{-1}$  (Palonen *et al.* 2000). L'étude de Jatinder Kaur qui porte sur la dynamique de croissance saisonnière et allocation de carbone du bleuets sauvages, confirme le fait que la concentration d'amidon dans les plants de bleuets diminue au cours de l'hiver. A partir du mois d'octobre, la concentration d'amidon diminue jusqu'à 75% des niveaux maximaux et se sont maintenus jusqu'à la fin de l'hiver (Kaur *et al.* 2012).

Dans un second modèle régressif, l'amidon et le glucose ont été pris en considération pour expliquer les variations de la résistance au froid ( $LT_{50}$ ), étant donné leur variation inversement proportionnelle (voir section identification et regroupement des différents glucides). En effet, l'amidon est composé de chaînes de molécules de D-glucose et plus l'amidon est dégradé plus la concentration de glucose augmente et *vice versa*. Les résultats du modèle (modèle 2), ont confirmé la variation inversement proportionnelle entre le glucose et l'amidon et leur lien avec la résistance au froid. La variation de la concentration de l'amidon est un facteur important, car c'est lui qui va fournir à la plante des sucres solubles (Smith *et al.* 2005). Tout comme le modèle 1, l'effet combiné de l'amidon (moins il y a d'amidon, plus la prédiction du  $LT_{50}$  est basse)

et du glucose (la concentration en glucose augmente à mesure que la prédiction du LT<sub>50</sub> diminue) permettent d'expliquer la mise en place des mécanismes de résistance.

Cette diminution de l'amidon à mesure que la résistance au froid diminue, est due, en partie, au besoin grandissant en glucides (glucose et fructose) pour le métabolisme de base. Lors de la respiration cellulaire, les plantes vont dégrader ces sucres pour en consommer l'énergie (Baek *et al.* 2004). La température est un facteur qui va faire varier l'intensité de la respiration. En effet plus les températures sont basses, moins la respiration cellulaire est importante (Derraz *et al.* 1995), ce qui pourrait expliquer l'accumulation du glucose en hiver. Les réserves en amidon produites à la fin de l'été vont donc être dégradées afin de former des sucres solubles, expliquant la diminution de la teneur en amidon à partir du mois de novembre et son absence durant les mois d'hiver. L'augmentation de la concentration des réserves en amidon dans les tiges au mois de mai est causée par la re-mobilisation des réserves présentes dans les rhizomes (Kaur *et al.* 2012). En effet, l'amidon est un glucide de réserve utilisé pour stocker de l'énergie, il se trouve principalement dans les organes de réserves des plantes (MacNeill *et al.* 2017).

## CONCLUSION

Dans la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean, la production de bleuets sauvage nain est une activité économique importante. Le climat froid et humide de cette région constitue un stress environnemental sur les plants de bleuets et il va induire une diminution du rendement de production du fruit.

Les résultats issus de ce projet de maîtrise ont permis de constater que les plants de bleuets sauvages nains s'acclimatent au cours de l'hiver. En comparant avec la littérature, les températures létales à 50% de lyse (LT<sub>50</sub>) sont très basses pour ces plants qui subissent un hiver rude et des températures négatives extrêmes. Cette acclimatation est en relation avec le niveau de neige au sol. En effet, plus il y a de la neige, moins les plants sont exposés au froid et ils sont alors moins résistants. Cette résistance est aussi liée avec la variation de la concentration des différents sucres : plus les températures sont basses, plus la plante est concentrée en sucres simples et moins elle contient d'amidon, car c'est ce dernier qui se dégrade afin de former les sucres solubles nécessaire à la résistance au froid. Cependant, les différents organes de la plante ne sont pas protégés de la même manière. Il a été observé que les organes à l'origine de la floraison et de la production du fruit, c'est-à-dire les bourgeons floraux, sont plus concentrés en sucre au cours de l'hiver comparativement aux deux autres organes étudiés (la tige et les bourgeons végétatifs).

Afin d'améliorer la précision des résultats et leurs interprétations, des perspectives ont été envisagées. Tout d'abord, il est important de mettre en place des méthodes de différenciation des espèces sur le terrain, afin de pouvoir affirmer ou infirmer la différence d'acclimatation au gel entre les espèces *Vaccinium angustifolium* et *Vaccinium myrtilloides*. Il serait aussi nécessaire de pouvoir mesurer la fuite d'électrolytes (LT<sub>50</sub>) pour les deux types de bourgeons, végétatifs et floraux, et associer cette mesure aux différents sucres et polyols présents dans les bourgeons, afin de pouvoir tirer une interprétation plus précise de leur résistance au froid. Enfin plusieurs autres méthodes existent afin de mesurer la résistance au froid, comme par exemple les tests acoustiques et la méthode des thermocouples différentiels qui permettent de

connaître la température à laquelle la glace se forme dans les tissus extra et intracellulaires. Ces informations supplémentaires pourraient augmenter les connaissances sur la résistance au froid des espèces nordiques de bleuets sauvages.

## RÉFÉRENCES

Agrinova ; le Club Conseil Bleuets ; le MAPAQ et le CRAAQ. 2016. Le gel printanier et automnal. Guide de production du bleuets sauvage.

Baek MH, Yoo B et Lim ST. 2004. Effects of sugars and sugar alcohols on thermal transition and cold stability of corn starch gel. *Food Hydrocolloids*, 18 : 133-142.

Beaulieu M. 2011. Méthodologie utilisée pour l'extraction des glucides solubles chez *Picea mariana*. Travail écrit sujet choisi (IMRR824), UQAC, Chicoutimi, 21 p.

Beck EH, Fettig S, Knake C, Hartig K et Bhattarai T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of biosciences*, 32 : 501-510.

Bellasio C, Alessio F et Francesco F. 2014. Evaluation of a high throughput starch analysis optimised for wood. *PLoS ONE*, 9 : e86645.

Benson EE. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical reviews in plant sciences*, 27 : 141-219.

Bernier G, Havelange Ae, Houssa C, Petitjean A et Lejeune P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *The Plant cell*, 5 : 1147.

Bilavcik A, Zamecnik J, Grospietsch M, Faltus M et Jadrna P. 2012. Dormancy development during cold hardening of in vitro cultured *Malus domestica* Borkh. plants in relation to their frost resistance and cryotolerance. *Trees-Structure and Function*, 26 : 1181-1192.

Bogdanović J, Mojović M, Milosavić N, Mitrović A, Vučinić Ž et Spasojević I. 2008. Role of fructose in the adaptation of plants to cold-induced oxidative stress. *European Biophysics Journal*, 37 : 1241-1246.

Charrier G. 2011a. Mécanismes et modélisation de l'acclimatation au gel des arbres: application au noyer *Juglans regia* L. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

Charrier G. 2011b. Mécanismes et modélisation de l'acclimatation au gel des arbres : application au noyer *Juglans regia* L. Thèse, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 216 p.

Charrier G, Cochard H et Améglio T. 2013a. Evaluation of the impact of frost resistances on potential altitudinal limit of trees.

Charrier G, Poirier M, Bonhomme M, Lacointe A et Améglio T. 2013b. Frost hardiness in walnut trees : How to link physiology and modelling? *Tree Physiology*, 33 : 1229-1241.

Chinnusamy V, Zhu J et Zhu J-K. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in plant science*, 12 : 444-451.

Cox SE et Stushnoff C. 2001. Temperature-related shifts in soluble carbohydrate content during dormancy and cold acclimation in *Populus tremuloides*. *Canadian journal of forest research*, 31 : 730-737.

Derraz M, Dauta A, Capblancq J et Abassi M. Influence de la lumière et de la température sur les taux de croissance et de photosynthèse de *Scenedesmus crassus* Chodat, isolée de la retenue eutrophe El Kansera (Maroc). Dans : *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 1995. EDP Sciences, p. 65-74.

Deslauriers A, Beaulieu M, Balducci L, Giovannelli A, Gagnon MJ et Rossi S. 2014. Impact of warming and drought on carbon balance related to wood formation in black spruce. *Annals of Botany*, 114 : 335-345.

dos Santos TB, Budzinski IG, Marur CJ, Petkowicz CL, Pereira LF et Vieira LG. 2011. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 : 441-448.

Ehlenfeldt MK, Rowland LJ, Ogden EL et Vinyard BT. 2007. Floral Bud Cold Hardiness of *Vaccinium ashei*, *V. constablaei*, and Hybrid Derivatives and the Potential for Producing Northern-adapted Rabbiteye Cultivars. 42 : 1131.

ElSayed A, Rafudeen M et Golldack D. 2014. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biology*, 16 : 1-8.

Fitter AH et Hay RK. 2012. *Environmental physiology of plants*. Academic press.

FNA Ed. Comm. 2009. *Vaccinium corymbosum*.  
<https://data.canadensys.net/vascan/name/bleuet%20en%20corymbe?lang=fr>

FNA Ed. Comm. 2009. Canadensys. Consulté le 29/05/2019,  
<http://data.canadensys.net/vascan/taxon/5566>

Gourieroux AM, McCully ME, Holzappel BP, Scollary GR et Rogiers SY. 2016. Flowers regulate the growth and vascular development of the inflorescence rachis in *Vitis vinifera* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108 : 519-529.

Gouvernement du Canada. 2011 (mis à jour le 2017-10-10). Normales et moyennes climatiques. Consulté le 3 décembre 2017,  
[http://climat.meteo.gc.ca/climate\\_normals/results\\_1981\\_2010\\_f.html?stnID=5889&autofwd=1](http://climat.meteo.gc.ca/climate_normals/results_1981_2010_f.html?stnID=5889&autofwd=1)

Gouvernement du Québec. 2016. Monographie de l'industrie du bleuet sauvage au Québec. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), communications Dd, Québec, 22 p.

Grave M-J. 2011. Statistiques agricoles 2010 de la région Saguenay-Lac-Saint-Jean. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Saguenay-Lac-Saint-Jean Drd, 18 p.

Guy C, Kaplan F, Kopka J, Selbig J et Hinch DK. 2008. Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum*, 132 : 220-235.

Guy CL, Huber JLA et Huber SC. 1992. Sucrose Phosphate Synthase and Sucrose Accumulation at Low Temperature. *Plant Physiology*, 100 : 502-508.

Hopkins WG. 2003a. *Physiologie végétale*. De Boeck, Bruxelles, xvii, 514 p., [514] p. de pl. p.

Hopkins WG. 2003b. *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.

Institut de la statistique Québec. (mis à jour le 20 octobre 2017). Indicateurs sur l'état des cultures au Québec au cours de la saison 2017. Consulté le 1 novembre 2017, <http://www.stat.gouv.qc.ca/statistiques/agriculture/etat-cultures/octobre2017/bleuets.htm>

Kader SA et Proebsting EL. 1992. Freezing behavior of *Prunus*, subgenus *Padus*, flower buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117 : 955-960.

Kalberer SR, Wisniewski M et Arora R. 2006. \*\*Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: Current understanding and emerging concepts. *Plant Science*, 171 : 3-16.

Kasuga J, Arakawa K et Fujikawa S. 2007. High accumulation of soluble sugars in deep supercooling Japanese white birch xylem parenchyma cells. *New Phytologist*, 174 : 569-579.

Kaur J, Percival D, Hainstock LJ et Privé J-P. 2012. Seasonal growth dynamics and carbon allocation of the wild blueberry plant (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Canadian Journal of Plant Science*, 92 : 1145-1154.

Keller M. 2015. *The science of grapevines: anatomy and physiology*. Academic Press.

Klotke J, Kopka J, Gatzke N et Heyer AG. 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation – evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell & Environment*, 27 : 1395-1404.

Krasensky J et Jonak C. 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63 : 1593-1608.

Kuprian E, Munkler C, Resnyak A, Zimmermann S, Tuong TD, Gierlinger N, Müller T, Livingston DP et Neuner G. 2017. Complex bud architecture and cell-specific chemical patterns enable supercooling of *Picea abies* bud primordia. *Plant, Cell & Environment*, 40 : 3101-3112.

Lambers H, Chapin III FS et Pons TL. 2008. *Plant physiological ecology*. Springer Science & Business Media.

Larcher W. 2003. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media.

Lee JH, Yu DJ, Kim SJ, Choi D et Lee HJ. 2012. Intraspecies differences in cold hardiness, carbohydrate content and beta-amylase gene expression of *Vaccinium corymbosum* during cold acclimation and deacclimation. *Tree Physiol*, 32 : 1533-1540.

Lee JL, J. I.) ; Yu, DJ (Yu, D. J.); Lee, JH (Lee, J. H.); Kim, SJ (Kim, S. J.) ; Lee, HJ (Lee, H. J.). 2013. Comparison of mid-Winter cold-hardiness and soluble sugars contents in the shoots of 21 highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars. *JOURNAL OF HORTICULTURAL SCIENCE & BIOTECHNOLOGY*, 88 : 727-734.

Lévesque J-A. 2019. Compréhension de l'écologie du bleuet nain (*Vaccinium Angustifolium* Ait.) cultivé pour améliorer sa production au Saguenay-Lac-Saint-Jean. Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, 59 p.

Levitt J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Academic Press.

Lineberger RD et Steponkus PL. 1980. Cryoprotection by glucose, sucrose, and raffinose to chloroplast thylakoids [Spinach leaves]. *Plant Physiology*, 65 : 298-304.

MacNeill GJ, Mehrpouyan S, Minow MA, Patterson JA, Tetlow IJ, Emes MJ et Raines C. 2017. Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. *Journal of Experimental Botany*, 68 : 4433-4453.

Mahajan S et Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444 : 139-158.

Malone SR et Ashworth EN. 1991. Freezing stress response in woody tissues observed using low-temperature scanning electron microscopy and freeze substitution techniques. *Plant Physiology*, 95 : 871-881.

Man R, Lu P et Dang Q-L. 2017. Cold hardiness of white spruce, black spruce, jack pine, and lodgepole pine needles during dehardening. *Canadian journal of forest research*, 47 : 1116-1122.

Man R, Colombo S, Lu P et Dang Q-L. 2015. Effects of winter warming on cold hardiness and spring budbreak of four boreal conifers. *Botany*, 94 : 117-126.

Mancuso S, Paolo Nicese F, Masi E et Azzarello E. 2004. Comparing fractal analysis, electrical impedance and electrolyte leakage for the assessment of cold tolerance in *Callistemon* and *Grevillea* spp. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79 : 627-632.

MAPAQ. 2017 (mis à jour le 31-08-2018). Culture du bleuet. Consulté le 15-02-2019

Massicotte E, Senechal A, Roy A-M, Grand J-J et Keable S. 2017. Profil sectoriel de l'industrie bioalimentaire au Québec. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Institut de la statistique du Québec et Ministère de l'Agriculture d'EdlAdQ, 124 p.

Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, 11 : 15-19.

Modlibowska I. 1957. Le problème des gelées printanières et la culture fruitière, 87 Congrès Pomologique International.

Morin X, Améglio T, Ahas R, Kurz-Besson C, Lanta V, Lebourgeois F, Miglietta F et Chuine I. 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology*, 27 : 817-825.

Moyen P. 2012. Surfusion. Consulté le 13 mai 2019, <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/surfusion/>

Muldrew K, Acker JP, Elliott JA et McGann LE. 2004. The water to ice transition: implications for living cells. Dans : *Life in the frozen state*. CRC Press, p. 93-134.

Nishizawa-Yokoi A, Yabuta Y et Shigeoka S. 2008. The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. *Plant signaling & behavior*, 3 : 1016-1018.

Nouveau Brunswick Canada. 2010a. Croissance & développement du bleuet sauvage Feuille de renseignements sur le bleuet sauvage.

Nouveau Brunswick Canada. 2010b. Aperçu sur l'industrie du bleuet sauvage au Nouveau-Brunswick. Feuille de renseignements sur le bleuet sauvage.

Oliveira CM et Priestley CA. 1988. Carbohydrate reserves in deciduous fruit trees. *Horticultural reviews*, 10 : 403-430.

Palacio S, Lenz A, Wipf S, Hoch G et Rixen C. 2015. Bud freezing resistance in alpine shrubs across snow depth gradients. *Environmental and Experimental Botany*, 118 : 95-101.

Palonen P. 1999. Relationship of seasonal changes in carbohydrates and cold hardiness in canes and buds of three red raspberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124 : 507-513.

Palonen P et Junttila O. Carbohydrates and winter hardiness in red raspberry. Dans : *VIII International Rubus and Ribes Symposium 585*, 2001. p. 573-577.

Palonen P, Buszard D et Donnelly D. 2000. Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. *Physiologia Plantarum*, 110 : 393-401.

Pareek A, Sopory SK et Bohnert H. 2009. *Abiotic stress adaptation in plants*. Springer.

Patten K, Neuendorff E, Nimr G, Clark JR et Fernandez G. 1991. Cold Injury of Southern Blueberries as a Function of Germplasm and Season of Flower Bud Development. 26 : 18.

Rached-Kanouni M. 2013. Adaptation du chêne liège (*Quercus suber* L.) aux conditions extrêmes de température. Université Constantine 1

Rakitina Z. 1970. Effect of ice crust on gas composition of the interior atmosphere of winter wheat. *Fiziologiya Rastenii*, 17 : 907-912.

Raven PH, Eichhorn SE, Evert RF et Bouharmont J. 2014. *Biologie végétale*. De Boeck Supérieur.

Rodrigo J. 2000. Spring frosts in deciduous fruit trees—morphological damage and flower hardiness. *Scientia Horticulturae*, 85 : 155-173.

Rossi S, Deslauriers A, Anfodillo T et Carraro V. 2007. Evidence of threshold temperatures for xylogenesis in conifers at high altitudes. *Oecologia*, 152 : 1-12.

Ruan Y-L, Jin Y, Yang Y-J, Li G-J et Boyer JS. 2010. Sugar Input, Metabolism, and Signaling Mediated by Invertase: Roles in Development, Yield Potential, and Response to Drought and Heat. *Molecular Plant*, 3 : 942-955.

Ruelland E, Vaultier M-N, Zachowski A et Hurry V. 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in botanical research*, 49 : 35-150.

Sakai A. 1978. Low temperature exotherms of winter buds of hardy conifers<sup>1</sup>. *Plant and Cell Physiology*, 19 : 1439-1446.

Sakai A et Larcher W. 2012. *Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress*. Springer Science & Business Media.

Schwartz MD. 2003. *Phenology: an integrative environmental science*. Springer.

Smith AM, Zeeman SC et Smith SM. 2005. Starch degradation. *Annu Rev Plant Biol*, 56 : 73-98.

Spann TM, Williamson JG et Darnell RL. 2004. Photoperiod and temperature effects on growth and carbohydrate storage in southern highbush blueberry interspecific hybrid. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129 : 294-298.

Sprenger N et Keller F. 2000. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. *The Plant Journal*, 21 : 249-258.

Steponkus PL. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35 : 543-584.

Sulpice R, Pyl E-T, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F et Piques MC. 2009. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 : 10348-10353.

Takeda F et Phillips J. 2011. Horizontal cane orientation and rowcover application improve winter survival and yield of trailing 'Siskiyou' blackberry. *HortTechnology*, 21 : 170-175.

Tarpley L et Sassenrath G. 2006. Carbohydrate profiles during cotton floral bud (square) development. *Journal of agronomy and crop science*, 192 : 363-372.

Theocharis A, Clément C et Barka EA. 2012. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*, 235 : 1091-1105.

Tompkins D, Ross J et Moroz D. 2004. Effects of ice cover on annual bluegrass and creeping bentgrass putting greens. *Crop science*, 44 : 2175-2179.

Uemura M et Steponkus PL. 1999. Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *Journal of Plant Research*, 112 : 245-254.

Uemura M, Tominaga Y, Nakagawara C, Shigematsu S, Minami A et Kawamura Y. 2006. Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum*, 126 : 81-89.

Wahid A, Gelani S, Ashraf M et Foolad MR. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61 : 199-223.

Wildung DK et Sargent K. The effect of snow depth on winter survival and productivity of Minnesota blueberries. Dans : *IV International Symposium on Vaccinium Culture* 241, 1988. p. 232-237.

Xin Z et Browse J. 2000. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell & Environment*, 23 : 893-902.

Yann E, Armando E et Christian E. 2014. The interaction between freezing tolerance and phenology in temperate deciduous trees. *Frontiers in Plant Science*, 5.

Yuanyuan M, Yali Z, Jiang L et Hongbo S. 2009. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *African Journal of Biotechnology*, 8.

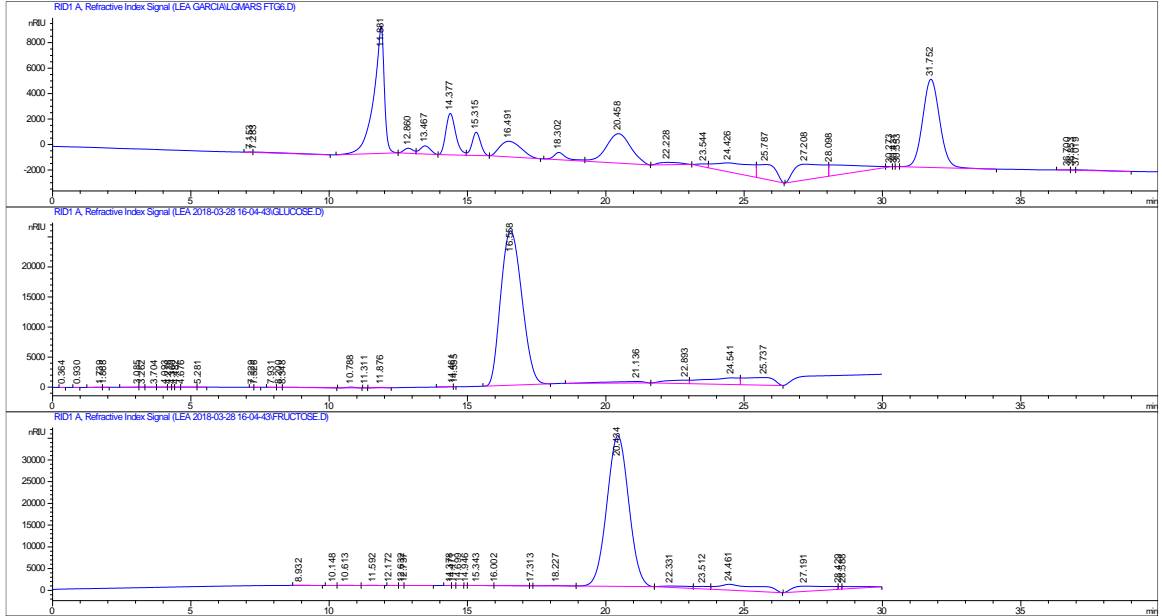
Zuther E, Büchel K, Hundertmark M, Stitt M, Hinch DK et Heyer AG. 2004a. The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 576 : 169-173.

Zuther E, Buchel K, Hundertmark M, Stitt M, Hinch DK et Heyer AG. 2004b. The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 576 : 169-173.

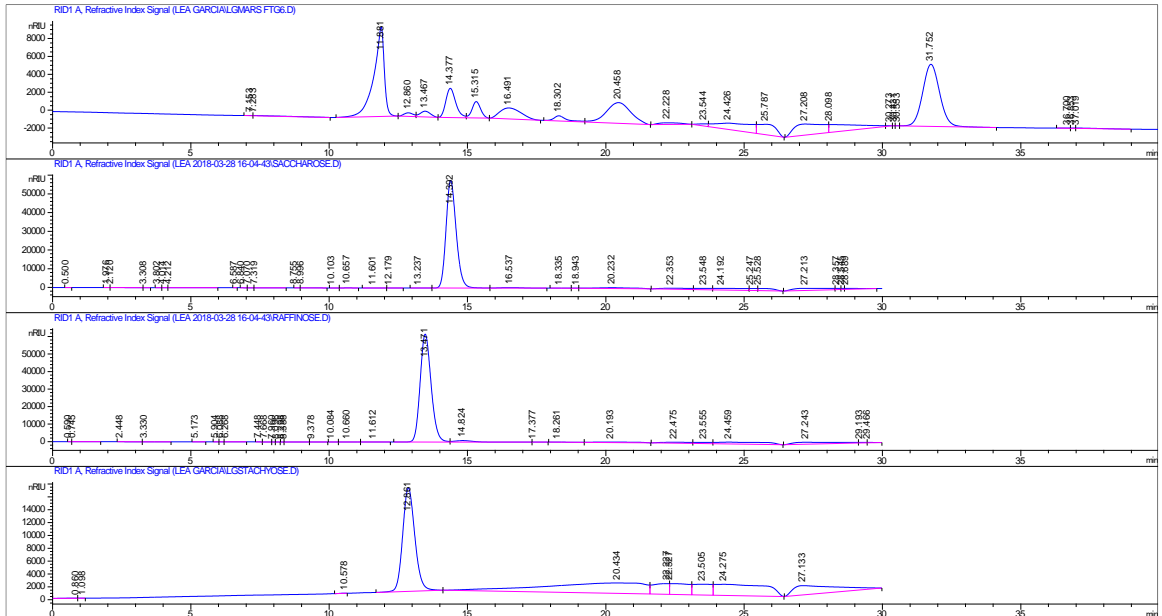
# ANNEXE 1

Identification des sucres débit 0,5 ml/min.

Chromatogramme dans l'ordre : extrait, témoin de glucose et de fructose

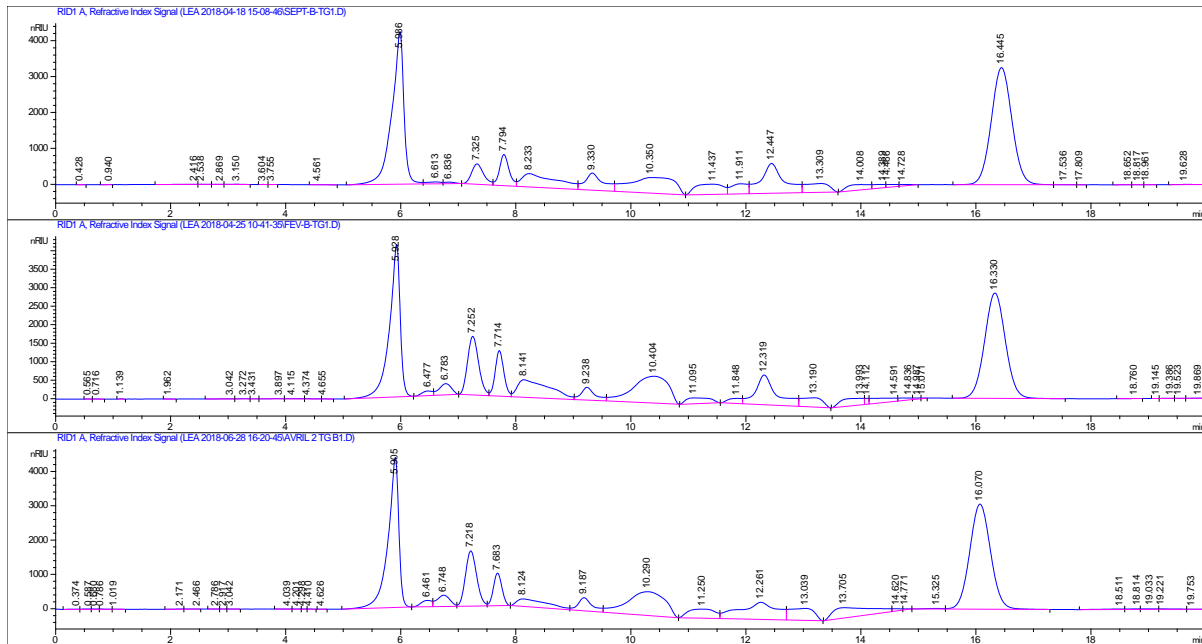


Chromatogramme dans l'ordre : Extrait, témoin de saccharose, de raffinose et de stachyose



## ANNEXE 2

Chromatogrammes de la tige pour différents mois dans l'ordre suivant : septembre, février et avril.



Chromatogrammes du mois de février pour les différents organes dans l'ordre suivant : tige, bourgeons végétatifs et bourgeons floraux.

