

Adaptation au froid des invertébrés et cryoconservation des œufs d'insectes aphidiphages

Étienne Branquart, Jean-Louis Hemptinne, Charles Gaspar

La lutte biologique constitue une activité en pleine expansion, principalement en horticulture protégée, en arboriculture fruitière et dans les jardins d'amateurs [1]. Dans ce secteur d'avenir, la demande, très variable selon les pays, se traduit par un nombre sans cesse accru de sociétés qui commercialisent des ennemis naturels des ravageurs de végétaux [2]. L'expansion de la lutte biologique se heurte actuellement à des problèmes classiques de production et de commercialisation des agents utilisés. Pour occuper la place qui lui revient sur le marché de la phytoprotection, cette stratégie doit pouvoir concurrencer les pesticides sur le plan de la fiabilité de l'approvisionnement et de la distribution ; il est donc important de disposer d'agents de lutte biologique en quantité suffisante au moment le plus opportun.

À titre d'exemple, la production de *Trichogramma brassicae* (plusieurs milliards d'individus produits annuellement) est parfaitement contrôlée et connaît un succès sans cesse grandissant pour lutter contre la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*. Ce succès est en grande partie lié aux possibilités de stockage des trichogrammes qui peuvent être maintenus en diapause durant près d'un an dans des œufs d'*Ephestia kuehniella*, à la tempéra-

ture de 3 °C. Le maintien en diapause de ces parasitoïdes permet l'amortissement des installations de production sur toute l'année et la distribution du produit à grande distance par la chaîne du froid [3]. Si le mode de production des trichogrammes constitue un véritable cas d'école, il est rarement aussi aisé de réguler la production d'autres ennemis naturels.

Les aphidiphages sont l'objet d'une utilisation de plus en plus répandue pour lutter contre les pucerons et la plupart des sociétés spécialisées en la matière réalisent l'élevage, la collecte et la commercialisation de prédateurs spécifiques tels que des chrysopes (*Chrysoperla carnea*) et des coccinelles (*Hippodamia convergens*, *Propylea 14-punctata*).

Les œufs et les jeunes larves de ces prédateurs constituent sans nul doute les stades les plus intéressants à produire, car leur introduction permet d'obtenir une forte efficacité prédatrice tout en limitant les coûts de production. Malheureusement, les jeunes stades de ces prédateurs ne sont généralement pas diapausants, de sorte qu'il n'est pas possible de provoquer un arrêt de leur développement en les plaçant dans les conditions microclimatiques induisant habituellement la diapause. L'élaboration d'une méthode de conservation de ces organismes au stade embryonnaire implique donc le recours à la cryoconservation.

Le présent article synthétise les données actuellement disponibles en matière de cryobiologie des embryons d'insectes. Seront envisagées successivement :

- une présentation des différentes stratégies de résistance au froid des invertébrés ;
- une synthèse des réalisations actuelles en matière de cryoconservation des invertébrés ;
- les voies de recherche pour tester les possibilités de cryoconservation des œufs d'insectes aphidiphages.

Comment les invertébrés survivent-ils au gel ?

À l'approche de l'hiver, les invertébrés des régions tempérées et boréales arrivent à une période critique de leur existence. Étant dépourvus de système de thermorégulation, ces animaux poikilothermes voient leur température corporelle descendre avec celle du milieu où ils évoluent, jusqu'à des températures avoisinant parfois les - 50 °C. À l'exception de quelques rares espèces d'insectes telles que *Cynthia cardui* ou *Episyrphus balteatus* qui peuvent effectuer des migrations de plusieurs centaines de kilomètres [4, 5], la plupart des invertébrés affrontent les rigueurs de l'hiver sur place, en cherchant des sites d'hibernation où les fluctuations de température sont moindres (litière, humus, bois mort) [6, 7]. Les invertébrés aquatiques sont généralement soumis à des stress thermiques moins importants du fait de la forte chaleur spécifique de l'eau ; en hiver, ils se réfú-

É. Branquart, J.-L. Hemptinne, C. Gaspar :
Faculté Universitaire des Sciences agronomiques, UER de Zoologie générale et appliquée, Passage des Déportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgique.

Tirés à part : É. Branquart

Summary

Cold-hardiness and cryoconservation of aphidophagous insects eggs

É. Branquart, J.-L. Hemptinne, C. Gaspar

The development of biological control of aphids would benefit from a good method of conservation of aphidophagous predators' eggs. Coccinellids, lacewings and syrphids eat mostly aphids during their larval instars. Practically, selling eggs ready to hatch to farmers is therefore an attractive method of biological control. But commercialization of eggs is virtually impossible without a conservation technique. The question is which technique of cryoconservation is suitable for that purpose. Invertebrates are poikilothermic organisms and in temperate and polar areas, they must resist temperatures below 0° C during hibernation. When body temperature gradually decreases, their activity level decreases in parallel to the physical characteristics of their haemolymph (Table 1). Afterwards, one of the following two types of cold tolerance strategies is developed, i.e. freeze intolerance or freeze tolerance.

Freeze intolerance is characterized by a "chill coma" corresponding to a large range of low temperatures. Haemolymph is maintained in a state of supercooling up to a threshold called the supercooling point (SCP) which is specific to each species. Below that point, haemolymph and extracellular water in tissues freeze and invertebrates die (Fig. 1A). In this context, cold resistance is linked to supercooling ability. In temperate areas, SCP of overwintering invertebrates are generally higher than in polar zones. Freeze intolerant species need time to acclimatize to supercooling; during that period, mechanisms of adaptation are triggered to allow the lowering of SCP (Box 1, Fig. 2).

In species belonging to the freeze tolerant group, no prevention of freezing which occurs early. As temperature goes down, cellular water diffuses to extracellular spaces, where it freezes, forming microcrystals. This is accompanied by a progressive shrinking of the cells (Fig. 3). Invertebrates developing this strategy of cold resistance are characterized by a large zone of freeze tolerance (Fig. 1B). They also need a period of time to acclimatize to negative temperatures (Box 2).

There are three main techniques of cryoconservation which aim at stopping the passage of biological time (Box 3). The first option is to store organisms in a state of supercooling at temperatures ranging from -15° C to -50°. It is useful for diapausing instars which are naturally resistant to cold. Freezing is a second possibility; it requires organisms to be protected by cryoprotectants. Cooling is achieved in two steps: a gradual reduction of temperature up to -40° C and a quick decrease to -196° C (Fig. 4). Finally, invertebrates could be vitrified by dipping in very concentrated solutions of cryoprotectants, and subsequently cooled down very rapidly. Storage takes place at -196° C.

As eggs of most of aphidophagous predators are not naturally resistant to cold, it is unlikely to store them for a long period of time using the supercooling technique. In addition, one should keep in mind that supercooling conditions are unstable. Freezing and vitrification have therefore the edge (Fig. 8). But, as the chorion of eggs is generally thick (Fig. 7) and not permeable to cryoprotectants, a method of permeation which is harmless for embryos has to be developed. Besides, the toxicity of various concentration of cryoprotectants should be tested. The last step will be to determine the most efficient combination of cooling rate and cryoprotectant concentration.

Cahiers Agricultures 1996 ; 5 : 353-65.

gient dans les sédiments et les zones profondes où ils sont le plus souvent à l'abri du gel [8].

Même s'ils passent l'hiver dans des refuges, la plupart des invertébrés terrestres des régions tempérées sont contraints d'affronter les basses températures durant au moins un stade de leur développement. En dessous de 5 °C, ils cessent progressivement toute activité de nutrition et de reproduction, entrent

alors dans un état de psychrotorpeur ou torpeur temporaire (*cold stupor*) allant de pair avec l'entrée en diapause hivernale [9-12]. Alors que la température ambiante continue à descendre, les animaux deviennent immobiles et dépourvus de toute réaction ; ils entrent alors en état de cryotorpeur ou torpeur permanente (*chill coma*).

Sachant que la formation de glace à l'intérieur des cellules animales est tou-

jours létale, provoquant une déchirure des membranes et une perturbation importante du fonctionnement cellulaire [13], on peut se demander comment ces animaux à sang froid survivent à des conditions de froid drastiques. Deux stratégies sont adoptées [14] : éviter la congélation des liquides biologiques en général (de l'hémolymph en particulier) ou mettre en œuvre un processus d'adaptation au gel.

Éviter la congélation

La plupart des arthropodes terrestres des régions tempérées et boréales résistent au froid grâce à la propriété de surfusion des fluides qui abaisse la température de nucléation (température à laquelle se forment les cristaux de glace dans l'hémolymphe), généralement entre -10 et -40 °C [15]. Néanmoins, même s'ils résistent ainsi à des températures bien inférieures à zéro degré, ces animaux sont dits sensibles à la congélation (*freeze susceptible* ou *freeze-intolerant species*) dans la mesure où la formation de glace dans leurs tissus conduirait inexorablement à la mort. Chez les organismes sensibles à la congélation, les réactions comportementales induites par la chute de la température peuvent être reliées aux modifications des propriétés physico-chimiques de l'hémolymphe. D'un point de vue éthologique, on retiendra essentiellement quatre zones d'activités caractéristiques situées en deçà de l'optimum thermique (tableau 1) : la zone d'activité infra-optimale, les zones de torpeur temporaire et permanente et la mort. D'un point de vue physico-chimique, l'hémolymphe est à l'état liquide, entre la tem-

Tableau 1

Échelle thermobiologique des invertébrés sensibles à la congélation : correspondance entre les divers types d'activité et l'état physique de l'hémolymphe (d'après Vannier [12] et Lee [14])

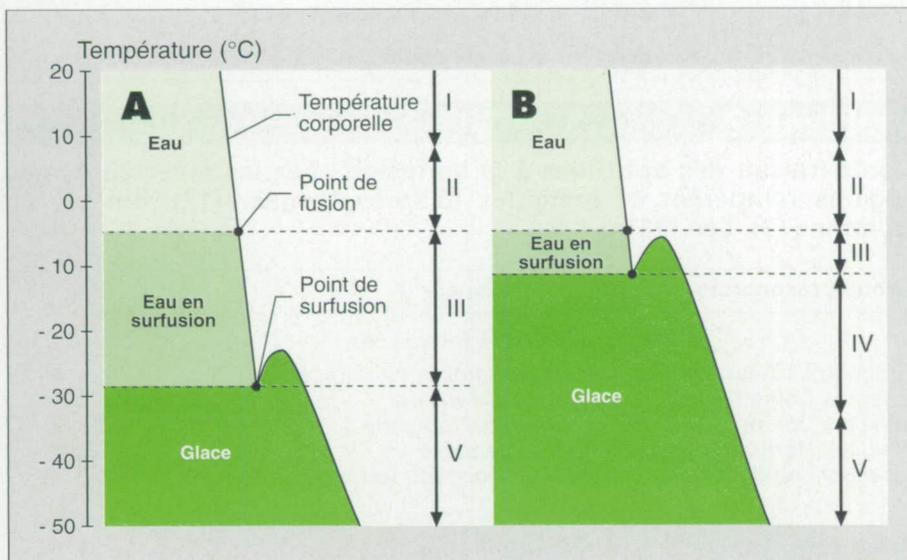
Échelle de température	Comportement (activité)	État physique de l'hémolymphe
22 °C	Optimum thermique	—
5 °C	Zone d'activité infra-optimale	Liquide
	Point de psychrotorpeur	—
- 2 °C	Zone de torpeur temporaire	Liquide
	Point de cryotorpeur	Point de fusion
- 20 °C	Zone de torpeur permanente	Surfusion
	Point léthal	Point de surfusion
	Mort	Glace

Thermobiological scale for freeze-sensitive invertebrates : relationship between activity levels and the physical state of haemolymph

pérature de fusion (*melting point*) et la température limite de surfusion (*supercooling point*). La température de fusion trouve son équivalent comportemental dans la notion de point de cryotorpeur. L'état instable de surfusion peut être maintenu tant qu'il n'y a pas formation de minuscules noyaux de cristallisation à partir desquels le front de cristallisation

pourrait se propager très rapidement dans tout le corps de l'animal. En l'absence de tels noyaux, l'hémolymphe peut être maintenue sous forme liquide, ce qui permet la survie des organismes sensibles à la congélation sans risque de lésions mécaniques par la présence de cristaux de glace.

En dessous d'une température caractéris-



zone de torpeur temporaire ; zone III = zone de torpeur permanente ou zone de prévention de la congélation ; zone V = mort de l'organisme) (d'après Vanier [12] et Lee [14]).

Figure 1. Stratégies de résistance au froid chez les invertébrés. À mesure que leur température corporelle diminue, les invertébrés deviennent de moins en moins actifs et entrent dans un état de torpeur temporaire (zone II). Ils développent ensuite un des deux types d'adaptation suivants : **A.** Stratégie de prévention de la congélation. Les invertébrés entrent dans une zone de torpeur permanente, correspondant à une large gamme de températures dans laquelle les liquides corporels sont maintenus en état de surfusion (zone III). Ces animaux sont dits « sensibles à la congélation » dans la mesure où ils meurent rapidement dès que la température chute en dessous du point de surfusion. **B.** Stratégie de résistance à la congélation. Par rapport à la stratégie de prévention de la congélation, l'amplitude de la zone de surfusion est fortement réduite et une importante zone de résistance à la congélation (zone IV) lui succède. La survie des animaux est alors possible, moyennant la formation préférentielle de microcristaux de glace à l'extérieur des cellules (zone I = zone d'activité infra-optimale ; zone II = zone de torpeur temporaire ; zone III = zone de prévention de la congélation ; zone IV = zone de résistance à la congélation ; zone V = mort de l'organisme) (d'après Vanier [12] et Lee [14]).

Figure 1. The two main survival strategies developed by invertebrates when their body temperature gradually decreases. They first show a reduction of activity, known as cold stupor (zone II), and then develop one of the following two adaptations : **A.** The freeze-avoidance strategy. Invertebrates enter a chill coma corresponding to a wide range of temperatures at which their body fluids are supercooled (zone III). They normally die at temperatures below their supercooling point (zone V). **B.** The freeze tolerance strategy. Invertebrates have a narrow supercooling zone and survive after the SCP ; they develop resistance through the formation of ice microcrystals outside their cells (zone IV) (zone I = infra-optimal zone ; zone II = cold stupor zone ; zone III = chill-coma or freeze-avoidance zone ; zone IV = freeze-tolerance zone ; zone V = death of organism).

tique, nommée point d'abaissement cryoscopique (PAC)* ou point de surfusion (*supercooling point*), l'eau en surfusion passe au stade cristallin. Le PAC étant la plus faible température à laquelle un liquide peut être maintenu en état de surfusion, on assiste, en dessous de cette valeur, à une congélation uniforme et quasi instantanée du liquide considéré. Comme la formation de cristaux de glace est exothermique, on peut déterminer expérimentalement la valeur de la température de surfusion d'un organisme en localisant le ressaut caractéristique sur la courbe de refroidissement. On nomme capacité de surfusion l'amplitude de la zone de torpeur permanente, située entre les points de fusion et de surfusion (zone III de la *figure 1A*).

Cette première stratégie de résistance au froid des invertébrés consiste donc à maintenir les liquides biologiques en surfusion jusqu'à un seuil (situé aussi bas que possible) en deçà duquel on assiste à une congélation brutale de l'hémolymphe et des liquides cellulaires, provoquant des lésions importantes et la mort de l'organisme. Les premières observations pertinentes faisant état de stratégies d'adaptation au froid fondées sur les mécanismes de surfusion furent réalisées par Réaumur au XVIII^e siècle. En plongeant des chenilles dans des mélanges cryoscopiques, il était parvenu à induire et à lever des états de cryotorpeur et soupçonnait déjà la présence de substances chimiques assurant le maintien de l'hémolymphe en état de surfusion [16].

On a souvent associé le PAC à la notion de température inférieure de survie et l'aptitude à la surfusion a été mise en parallèle avec la plus ou moins grande résistance au froid de l'organisme. Ainsi, la valeur du PAC est généralement beaucoup plus faible chez les organismes vivant en climat boréal que chez ceux qui se développent en climat tempéré : on reconnaît ainsi la valeur adaptative de la capacité de surfusion d'un organisme par rapport au climat où il se développe (*tableau 2*).

Toutefois, il existe une différence importante entre les mesures cryoscopiques réalisées au laboratoire (mesure du PAC) et les conditions rencontrées sur le terrain (survie hivernale). Si les organismes sensibles à la congélation ne survivent

* Les physiciens appellent abaissement cryoscopique ($\Delta\theta$) la différence entre la température de congélation d'une solution (θ_s) et celle du solvant (θ_0).

Encadré 1.

Comment stabiliser l'état de surfusion ?

Les liquides biologiques en surfusion correspondent à un état très instable et, à tout moment, la formation de glace peut être déclenchée de manière brutale. Dans ce contexte, l'acclimatation des organismes sensibles à la congélation se traduit par une stabilisation des liquides en surfusion et une diminution de la valeur du point d'abaissement cryoscopique, résultant de profondes modifications physiologiques, biochimiques et comportementales se produisant dans l'organisme à l'approche de l'hiver :

- Élimination des noyaux de cristallisation, c'est-à-dire des agents susceptibles d'initier la formation des microcristaux. Il peut s'agir d'agents de nucléation externes (particules minérales et matériaux organiques ingérés) ou internes (lipoprotéines extracellulaires). Des micro-organismes dits « gel-nucléants » ont été mis en évidence dans le tube digestif de certains insectes ; ils ont la propriété d'initier la formation de cristaux de glace, agissant comme autant de noyaux de cristallisation particulièrement efficaces. Ils provoquent ainsi une diminution importante de la capacité de surfusion et, partant, réduisent la résistance au froid de ces insectes [25].

- Production de protéines antigels dans l'hémolymphe freinant la croissance des microcristaux de glace par adsorption tout autour de leur surface ; ces protéines ont des propriétés d'hystérèse thermique qui permettent un abaissement de la température de nucléation tout en maintenant la température de fusion inchangée.

- Diminution de la teneur en eau de l'organisme, ce qui concentre les solutés et réduit la température à laquelle se produit la nucléation.

- Choix de sites d'hibernation suffisamment secs, évitant le contact de l'organisme et des cristaux de glace extérieurs susceptibles d'initier la formation de glace à l'intérieur de celui-ci (inoculation).

En produisant de façon massive des molécules organiques cryoprotectrices de faible poids moléculaire comme le glycérol et le sorbitol, les invertébrés modifient les propriétés colligatives de leurs liquides biologiques et diminuent fortement leurs points de fusion et de surfusion. Ainsi, certains insectes des régions arctiques et alpines sécrètent des quantités de glycérol équivalentes à 30 % de leur propre poids corporel [26], ce qui leur permet d'éviter la congélation et de maintenir une activité à basse température.

How can the supercooling state be stabilized?

Tableau 2

Comparaison des aptitudes à la surfusion chez les invertébrés des régions tempérées et arctiques (d'après Vannier [12], Block [15], Somme [17], Lee [18])

Groupe taxonomique	Espèce	PAC
	Régions tempérées	
Arachnides Acariens	<i>Humerobates rostromellatus</i>	- 24 °C
Insectes Collembolés	<i>Orchesella villosa</i>	- 9 °C
Insectes Coléoptères	<i>Tachyporus obtusus</i>	- 15 °C
Insectes Homoptères	<i>Myzus persicae</i>	- 26 °C
Insectes Lépidoptères	<i>Papilio machaon</i> (pupe)	- 22 °C
	Régions arctiques et antarctiques	
Arachnides Acariens	<i>Alaskozetes antarcticus</i>	- 31 °C
Insectes Collembolés	<i>Anorophorus laricus</i>	- 32 °C
Insectes Coléoptères	<i>Pytho deplanatus</i>	- 54 °C
Insectes Homoptères	<i>Pterocomma smithia</i>	- 42 °C
Insectes Lépidoptères	<i>Epiblemma scudderiana</i>	- 38 °C

PAC : point d'abaissement cryoscopique.

Comparison of the supercooling abilities of invertebrates from temperate and polar areas

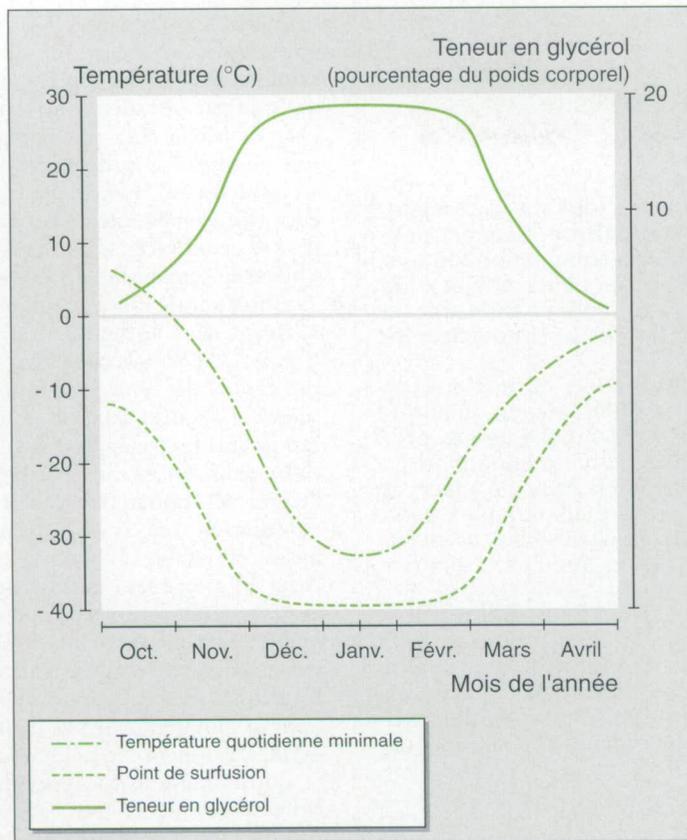


Figure 2. Mode de survie hivernale de la chenille du papillon *Epiblemma scudderiana*, parasite des galles de la verge d'or (*Solidago* sp.). À partir de l'automne, se produit une baisse du point de surfusion grâce à laquelle la formation de glace ne peut se produire au niveau des liquides corporels dans la gamme de températures ambiantes. En même temps, des quantités importantes de glycérol s'accumulent et abaissent la valeur du point de congélation (d'après Storey et Storey [13]).

Figure 2. Overwintering strategy of *Epiblemma scudderiana*, a parasite of goldenrod (*Solidago* sp.) galls. Larvae of this species overwinter in goldenrod galls. In autumn, their supercooling point decreases so that their body fluid will not freeze at ambient temperatures. Meanwhile, a large quantity of glycerol is stored, thus lowering the melting point.

pas à une température inférieure à la valeur du PAC, il importe aussi de savoir si leur mort est provoquée par la congélation des liquides biologiques ou par un autre processus [19-21]. Dans de nombreux cas, la létalité est liée à une mauvaise acclimatation ou à des processus dits de précongélation (vitesse de refroidissement trop rapide) ou, encore, à une exposition au froid de trop longue durée [18]. Dans cet esprit, on a proposé de subdiviser les organismes sensibles à la congélation en différentes sous-catégories d'après leur degré de résistance au froid et d'après le décalage éventuel entre le PAC et la température létale [22]. Pour un même organisme, la résistance au froid, variable dans le temps, nécessite

généralement une phase d'acclimatation (*acclimation*, *acclimatization* ou *hardening*) qui se marque essentiellement par un abaissement marqué du point de surfusion (*encadré 1*). Résistance au froid et diapause coïncident souvent dans le temps et sont induites par le même type de stimuli (baisse de la température ou modification de la photopériode) [9, 23, 24]. Parmi les organismes qui évitent la congélation par abaissement de leur point de surfusion, la chenille du papillon *Epiblemma scudderiana*, a été la plus étudiée. Durant l'hiver, elle parasite les galles de la verge d'or (*Solidago* sp.) produites par le Diptère, *Eurosta solidaginis*. *E. scudderiana* est exposé à des températures pouvant descendre jusqu'à

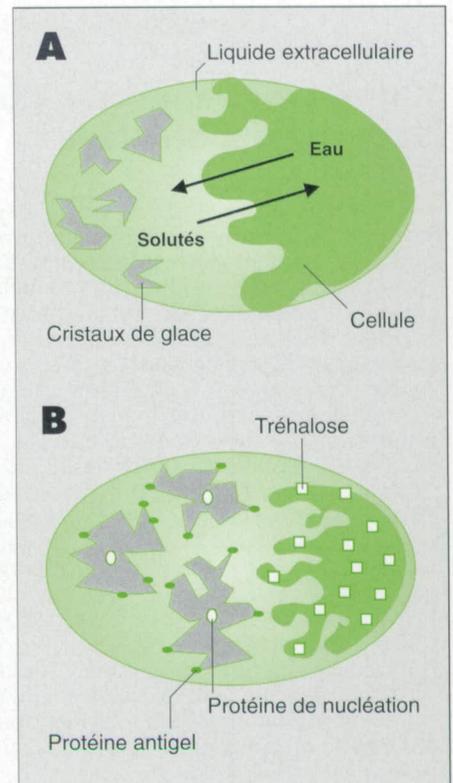


Figure 3. Réactions physiologiques d'une cellule à la congélation. A. Mouvements des liquides et des solutés nécessaires au maintien de l'équilibre osmotique ; B. Mécanismes de protection de la cellule chez les organismes résistants au gel (en blanc, espace extracellulaire ; en grisé, espace intracellulaire : cytosol) (d'après Storey et Storey [13]).

Figure 3. Physiological reaction of a freezing cell. A. Movements of liquids and solutes required to maintain the osmotic balance ; B. Mechanisms of freeze tolerance (Open area, extracellular compartment ; stippled area : cytosol).

-30 °C ; et sa survie résulte simultanément d'un abaissement du point de surfusion et de la production massive de glycérol [13] (*figure 2*).

Contrôler la congélation

La deuxième stratégie de résistance au froid s'exprime dans un ensemble de conditions qui permettent la congélation des liquides biologiques tout en préservant l'intégrité biologique des cellules et des tissus de l'organisme. Les espèces qui présentent cette stratégie de défense sont dites

Comment supporter sans dommages les cristaux de glace ?

Près de 70 % des liquides biologiques des organismes tolérant la congélation peuvent être solidifiés sans dommage pour l'organisme. Ceci est possible moyennant différentes adaptations favorisant une congélation lente et progressive des liquides extracellulaires (formation de petits cristaux de glace à l'extérieur de la cellule), tout en maintenant un volume suffisant de cytosol à l'état liquide. Ces conditions sont réalisées *via* la production de trois types de molécules [13, 27] :

- des protéines de nucléation qui favorisent la formation de cristaux de glace dans les liquides extracellulaires et limitent les phénomènes de surfusion à une gamme de températures très restreinte. La synthèse de ces protéines est régulée par des stimuli extérieurs ainsi que par voie endocrine ;
- des protéines antigels qui recouvrent la surface des cristaux de glace et limitent leur extension ; la glace est ainsi réduite à de petits cristaux sans danger pour les cellules. Ces protéines se retrouvent aussi bien chez les organismes qui favorisent les phénomènes de surfusion que chez ceux qui les évitent ;
- des substances cryoprotectrices qui s'accumulent à l'intérieur des cellules, limitent la sortie de l'eau par osmose lors de la congélation et, partant, la diminution du volume cellulaire et stabilisent, en outre, la structure des membranes cellulaires. Ces substances sont des molécules organiques de faible poids moléculaire telles que les polyols (glycérol et sorbitol) et les sucres (e.g. tréhalose), produites à partir des réserves en glycogène de l'organisme.

How can ice-crystal damage be avoided?

tolérantes ou résistantes à la congélation (*freeze-tolerant species*). Beaucoup moins nombreuses que les espèces qui résistent au froid par surfusion, elles se rencontrent chez les Mollusques, les Tardigrades, chez les insectes (Lépidoptères, Diptères, Coléoptères et Hyménoptères) ainsi que chez plusieurs espèces de batraciens vivant dans le grand Nord Canadien [13-15].

Quand un organisme est exposé au froid, la formation de cristaux commence généralement dans les liquides extracellulaires (*figure 3A*) ; elle s'accompagne d'une augmentation de la concentration en substances dissoutes dans le compartiment extracellulaire, par rapport à la concentration cellulaire. Une redistribution de l'eau et des substances en solution se produit alors au travers de la membrane cellulaire et rétablit l'équilibre osmotique : l'eau diffuse vers l'extérieur de la cellule et les solutés vers l'intérieur. Il s'ensuit une déshydratation et une réduction parfois drastique du volume de la cellule.

En dehors de tout mécanisme de protection, la congélation et la déshydratation rapides rompent l'équilibre osmotique, ce qui entraîne le collapsus des cellules, la lésion des membranes cellulaires et des troubles métaboliques importants. La formation de cristaux de grande taille provoque la destruction des connexions entre les cellules, lesquelles meurent finalement suite à leur pénétration par la glace [13]. Chez les organismes résistants à la congélation, les phénomènes de surfusion concernent une gamme de températures très étroite, ce qui crée un début de cristallisation à des températures légèrement inférieures à 0 °C. Différentes adaptations favorisent la formation de glace, spécifiquement dans les liquides extracellulaires (*encadré 2*). La formation de cristaux s'y déroule très lentement, permettant une redistribution lente et continue de l'eau et des solutés. Lorsque la concentration des substances en solution est telle que la formation de nouveaux cristaux ne peut plus se faire à température ambiante, on atteint un état d'équilibre stable (*figure 3B*). Chez les organismes concernés, il existe donc un intervalle de températures situé en deçà du PAC et dans lequel la formation de cristaux extracellulaires est compatible avec la vie : c'est la zone de tolérance à la congélation (zone IV de la *figure 1B*). Malgré leurs nombreux mécanismes de protection, les organismes résistants à la congélation ne peuvent rester indéfiniment « gelés » [23] : à mesure que le temps s'écoule, la proportion de glace

Tableau 3

Synthèse des traits adaptatifs relatifs aux deux principaux mécanismes adoptés par les invertébrés pour s'adapter au froid

Sensibles à la congélation

Insensibles à la congélation

Caractéristiques générales

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Abaissement du point de surfusion - Le point de surfusion correspond à la température minimale de survie - La formation de glace extra ou intracellulaire est toujours létale | <ul style="list-style-type: none"> - Faible capacité de surfusion - La température minimale de survie est bien inférieure au point de surfusion - Capacité de survie à la formation de glace dans l'espace extracellulaire |
|---|---|

Mécanismes d'acclimatation

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Production de protéines « antigels » qui stabilisent l'état de surfusion et freinent la croissance de microcristaux - Production de polyols qui abaissent la température de nucléation - Élimination des noyaux de cristallisation et vidange du tube digestif | <ul style="list-style-type: none"> - Production de protéines « antigels » qui recouvrent la surface et limitent la taille des microcristaux de glace - Production de polyols qui limitent les pertes d'eau par osmose (cryoprotection) - Production de protéines de nucléation qui limitent les phénomènes de surfusion |
|--|--|

Review of adaptive traits concerning the two main invertebrate cold-tolerance mechanisms

augmente dans les liquides biologiques et la déshydratation des cellules va en s'accroissant, provoquant des lésions au niveau des membranes cellulaires. Les troubles métaboliques liés aux fortes concentrations de substances dans les cellules, à l'anaérobiose prolongée et à l'accumulation de déchets toxiques se manifestent également après une période d'exposition au froid variant entre quelques semaines et quelques mois, selon le type d'organisme.

Le *tableau 3* synthétise les principaux traits adaptatifs relatifs aux deux grandes stratégies d'adaptation des animaux au gel. On notera que, quel que soit le type de stratégie adopté dans la nature, on observe toujours une phase d'acclimatation préalable au grand froid au cours de laquelle se déroulent d'importantes modifications biochimiques qui préparent le processus de cryorésistance.

Cryobiologie et techniques de conservation des invertébrés au froid

La cryoconservation connaît un regain d'intérêt depuis quelques années, surtout

chez les chercheurs anglo-saxons, parallèlement au développement des techniques de conservation au froid, lesquelles s'inspirent le plus souvent des mécanismes naturels de résistance des invertébrés à la congélation. En particulier, le nombre d'articles publiés annuellement sur les mécanismes de tolérance des insectes au froid est en constante augmentation depuis 1950 [28].

Arrêtant le temps biologique, la congélation permet la préservation, durant de longues périodes, de cellules et de tissus, voire d'organismes entiers [29].

La cryoconservation possède donc un vaste champ d'applications :

- le stockage au froid de cellules germinales qui permettent la sélection et l'amélioration de souches particulières d'insectes : par exemple pour l'insémination artificielle des abeilles [30]. Ce type de stockage est également utilisé pour conserver des parasitoïdes qui se développent aux dépens des œufs d'invertébrés [31] ;

- le maintien de lignées d'insectes indispensables pour les recherches en génétique des populations. Dans un avenir proche, la cryopréservation des œufs permettra l'élaboration de véritables banques d'embryons [32] ;

- les programmes de lutte biologique qui requièrent la mise au point d'élevages industriels de prédateurs ou de parasitoïdes contre les ravageurs des cultures.

Dans ce contexte, la préservation en masse de ces organismes sur des périodes allant de 6 mois à 1 an permettrait une meilleure gestion du stock disponible ainsi qu'un étalement de la production sur une plus longue période.

Réactions physiologiques des cellules au froid

Le stockage des cellules à des températures inférieures à $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ garantit le plus souvent leur conservation à l'échelle de plusieurs années. Aux températures inférieures à ce seuil thermique, il ne subsiste presque plus d'eau liquide dans la cellule et l'ensemble des réactions physico-chimiques est bloqué. L'eau se trouve dès lors sous forme cristalline ou amorphe (eau « vitreuse »), rendant toute diffusion impossible : le temps biologique ne s'écoule plus.

Dans la mesure où la congélation perturbe fortement la structure cellulaire et les réactions biochimiques qui s'y déroulent, la cryoconservation d'organismes vivants constitue un incroyable défi ! Le véritable problème n'est pas tant la résistance des cellules aux ultrabasses températures que leur survie pendant le processus de refroidissement, dans la gamme de températures comprises entre -15 et $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il importe donc de contrôler parfaitement les phases de refroidissement et de réchauffement de l'organisme que l'on veut conserver lorsque la gamme de températures critiques sera traversée.

Suite aux phénomènes de surfusion et aux propriétés colligatives des liquides biologiques, la formation de glace ne commence généralement qu'en dessous de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. De -5 à $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, la glace se forme essentiellement dans le milieu extracellulaire alors que le cytosol se maintient dans un état de surfusion. Suite au développement d'un gradient de potentiel chimique, l'eau diffuse de la cellule vers le milieu extracellulaire où se forment des cristaux de glace tandis que la cellule se déshydrate progressivement. Le devenir des cellules dépend alors essentiellement de la vitesse de refroidissement, qui constitue par ailleurs le principal paramètre qui distingue entre elles les différentes techniques de cryoconservation [29] (*encadré 3*).

Encadré 3.

La vitesse de refroidissement caractéristique des techniques de cryoconservation

- Cas n° 1. Pour une faible vitesse de refroidissement ($V_{\text{refr}} < 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), un équilibre osmotique est maintenu entre la cellule et le milieu extracellulaire. En conséquence, le contenu cellulaire se déshydrate au fur et à mesure que la température diminue et la glace ne se forme jamais à l'intérieur de la cellule.

- Cas n° 2. Pour un taux de refroidissement plus élevé ($10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min} < V_{\text{refr}} < 100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), la vitesse de diffusion de l'eau hors de la cellule est insuffisante pour maintenir l'équilibre osmotique. En conséquence, des cristaux de glace se forment également à l'intérieur de la cellule ; en grandissant progressivement, ils endommagent et, finalement, tuent la cellule.

- Cas n° 3. Lorsque le refroidissement est encore plus rapide ($V_{\text{refr}} > 100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), la taille des cristaux qui se forment dans la cellule tend à diminuer pour devenir inframicroscopique. À la limite, on atteint un état amorphe qui se traduit par une élévation considérable de la viscosité du liquide (vitrification) qui conserve intacte la structure cellulaire. Toutefois, les tissus ou organismes vitrifiés devront être réchauffés très rapidement sous peine de provoquer des phénomènes de recristallisation susceptibles de détruire complètement la cellule.

Characterization of the cryoconservation techniques to the cooling rate

Tableau 4

Caractéristiques des trois principales techniques de cryoconservation

Type de technique	État physique de l'eau	Durée du stockage	Vitesse de refroidissement	Température de stockage
Surfusion	Liquide	Moyen terme	< 10 °C/min	- 15 à - 50 °C
Congélation	Glace	Long terme	< 10 °C/min	< - 130 °C
Vitrification	Amorphe	Long terme	> 100 °C/min	< - 130 °C

Characteristics of the three main cryoconservation techniques

Les principales techniques de cryoconservation des invertébrés

Les techniques de cryoconservation diffèrent essentiellement en fonction de la température de stockage de l'organisme et de la vitesse de refroidissement choisie pour atteindre celle-ci (tableau 4).

• Le stockage en surfusion

De nombreux organismes, les insectes en particulier, survivent en état de surfusion aux faibles températures hivernales [17]. Souvent, seul le stade diapausant (selon l'espèce, il s'agit de l'œuf, de la larve, de la nymphe ou de l'imago) tolère le froid. Le stockage en état de surfusion constitue, *a priori*, un moyen de conservation idéal et a été utilisé avec succès pour la conservation de cellules individuelles ou de stades diapausants d'insectes dispersés dans un milieu dépourvu de noyau de cristallisation (huile minérale ou silicone) [23, 33, 34]. Les cellules ou les insectes peuvent de la sorte être amenés progressivement en état de surfusion et stockés à court ou moyen terme sous cette forme. Toutefois, pour des durées de conservation supérieures à un an, le maintien en état de surfusion pose problème. En effet, la probabilité qu'un système biologique en surfusion gèle spontanément augmente avec la durée d'exposition et l'abaissement de la température [35]. Par ailleurs, aux températures utilisées pour le stockage en état de surfusion, la plupart des réactions physico-chimiques ne sont pas complètement inhibées et continuent à se dérouler à très faible vitesse. Enfin, des dommages importants peuvent se produire lorsque la température de stockage approche la valeur du point

de surfusion ; l'organisme est alors susceptible de subir un coup de froid (*cold shock*) qui peut endommager les membranes cellulaires et bouleverser le métabolisme.

Le maintien d'organismes en état de surfusion est donc délicat et demande à la

fois le contrôle précis de la température ambiante, l'élimination des traces d'eau extérieures ainsi que des noyaux de cristallisation, la réduction de la quantité d'eau congelable, l'abaissement de la valeur des points de fusion et de surfusion et l'addition de substances cryoprotectrices [31, 36]. Les trois derniers points relèvent des mécanismes d'acclimatation et peuvent être induits par des stimuli extérieurs, tels que la diminution de la photopériode et de la température ou la modification du régime alimentaire. La mesure du point d'abaissement cryoscopique permet de quantifier la capacité de surfusion d'un organisme et de connaître la température minimale de stockage à laquelle on peut le placer. Pour ce faire, l'organisme est placé dans une chambre isolée dont on descend progressivement la température à raison de 1 °C par minute. Parallèlement, l'évo-

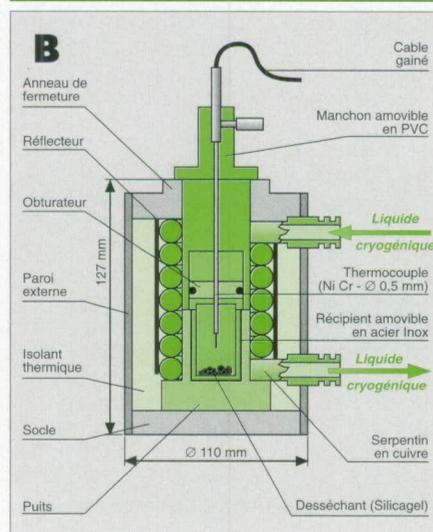
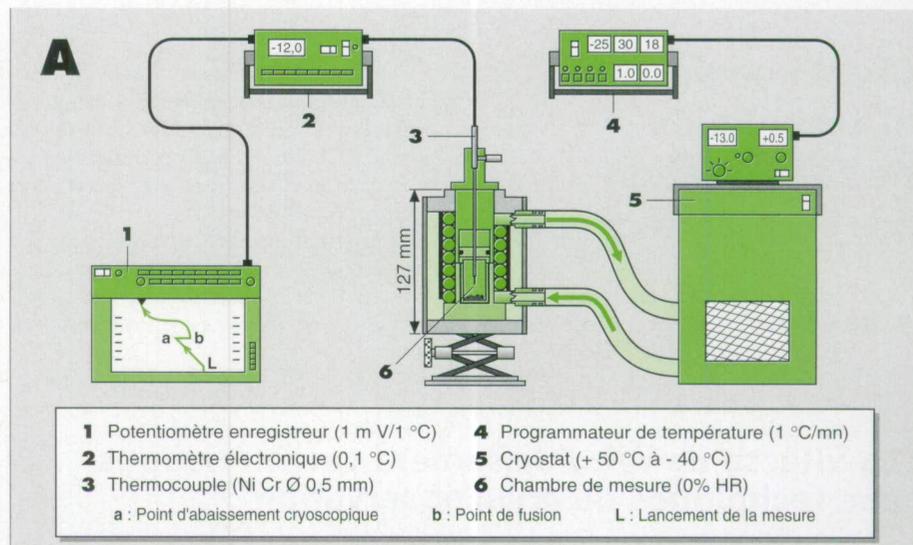


Figure 4. A. Chaîne de mesure permettant la détermination du point d'abaissement cryoscopique chez les invertébrés terrestres ; B. Cryomètre à circulation de liquide cryogénique. Détail de construction de la chambre de mesures cryoscopiques (d'après Vernon et Vannier [37]).

Figure 4. A. Setup to measure the supercooling point of terrestrial invertebrates ; B. Cryometer with circulation of cryogenic liquid. Detail of the cryogenic measurement chamber.

lution de la température de l'organisme est suivie par l'intermédiaire d'un thermocouple à réponse rapide (figure 4). Le tracé de la courbe de refroidissement correspondante permet la localisation du ressaut ou rebond caractéristique du point de surfusion correspondant à la libération de la chaleur latente de cristallisation [37].

• Stockage par congélation

Le stockage par congélation constitue la méthode classique de cryoconservation. Même si elle ne requiert qu'un bref passage par l'état instable de surfusion, elle n'en reste pas moins une opération délicate. En particulier, la formation de cristaux de glace devra être contrôlée et orientée vers le milieu extracellulaire. Cette technique requiert l'utilisation d'agents perméabilisants et cryoprotecteurs (APC) dont le rôle est d'augmenter la concentration cytoplasmique, de réduire la déshydratation cellulaire, et donc, de ralentir la formation de glace au niveau intra et extracellulaire. Ces agents agissent essentiellement au niveau des propriétés colligatives des fluides. La mise en œuvre de cette technique de cryoconservation requiert le passage par la séquence suivante (figure 5) : immersion de l'organisme dans un APC comme le glycérol ou le dyméthylsulfoxyde (DMSO) ; refroidissement très progressif de l'organisme jusqu'à une température intermédiaire proche de -40°C ; refroidissement rapide et stockage à -196°C dans l'azote liquide.

L'étape la plus délicate de la congélation consiste à réduire la quantité d'eau congelable dans les cellules en optimisant le taux de refroidissement de l'organisme et la concentration en APC. Pour chaque type de cellule, il existe un taux de refroidissement optimal compris entre 0,1 et 10°C par minute, qui doit être à la fois suffisamment bas pour maintenir l'équilibre osmotique et éviter la formation de glace dans le cytoplasme et suffisamment rapide pour éviter une déstabilisation des membranes biologiques [29]. Après congélation, le réchauffement de l'organisme devra se faire aussi rapidement que possible, pour éviter la recristallisation en milieu intracellulaire. La plupart des résultats probants de cryoconservation classique concernent la préservation de stades de développement d'invertébrés naturellement résistants à la congélation. Des cellules isolées ou des tissus ont également été conservés de la sorte (tableau 5).

• Stockage par vitrification

Très récente, la vitrification est une technique prometteuse pour la conservation des invertébrés ; c'est actuellement la seule méthode qui permette la cryopréservation des embryons de drosophiles [32, 41]. La technique de vitrification est fondée sur l'utilisation de solutions aqueuses très concentrées en APC, qui peuvent rester en surfusion jusqu'à de très basses températures et devenir tellement visqueuses qu'elles se solidifient sans former de cristaux. Cette technique permet l'utilisation de taux de refroidissement ultrarapides qui réduisent fortement le risque de dommage cellulaire. Une contrainte majeure à son utilisation est la sensibilité des organismes aux concentrations multimolaires d'APC. Les recherches actuelles sur la vitrification accordent beaucoup d'intérêt à la sélection d'APC qui soient nantis de propriétés à la fois vitrifiantes et non toxiques pour les organismes vivants.

Cryoconservation des œufs de prédateurs aphidiphages

Malgré leur utilisation croissante en lutte biologique, les insectes aphidiphages (*Coccinellidae*, larves de *Syrphinae* et de *Chrysopidae*) n'ont retenu que peu

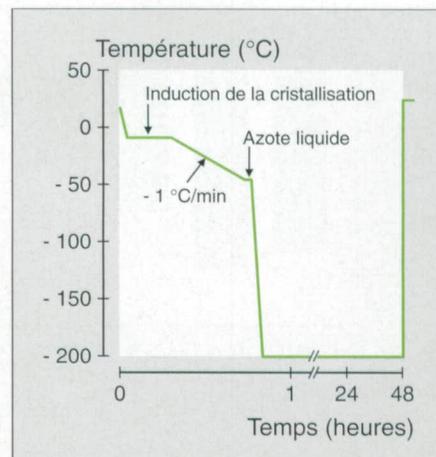


Figure 5. Courbes de congélation et de décongélation (méthode classique de cryoconservation). Après avoir induit artificiellement la cristallisation, on réduit la température suivant un taux de refroidissement de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à la température de -50°C , puis on plonge l'organisme dans l'azote liquide, à -196°C (d'après Kusuda *et al.* [38]).

Figure 5. Freezing and thawing curves (standard cryoconservation method). After artificial induction of crystallization, the temperature is gradually reduced at a rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to -50°C . The organism is then dipped into liquid nitrogen at -196°C .

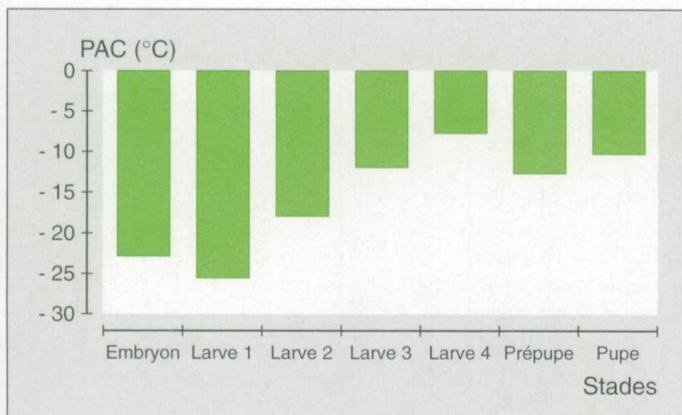
l'attention des cryobiologistes. Leur stade hivernant est le plus souvent imaginal, la séquence d'événements liés à la venue de l'hiver étant la suivante. Durant l'automne, la diminution de la photopériode et la chute de température provoquent une inhibition de la production de certaines

Tableau 5

Exemples d'application des techniques de cryoconservation aux embryons et aux cellules d'insectes

Type de cellule	Références	Agent cryoprotecteur	Taux de refroidissement	Taux de réchauffement
Cryoconservation conventionnelle				
Embryons de <i>Blatella germanica</i>	Heacox et Leopold [39]	DMSO (1 M)	$1^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$900^{\circ}\text{C}/\text{min}$
Ovaires de <i>Bombyx mori</i>	Kusuda <i>et al.</i> [38]	Glycérol (1,5 M)	$1^{\circ}\text{C}/\text{min}$	$500^{\circ}\text{C}/\text{min}$
Spermatozoïdes d' <i>Apis mellifera</i>	Kaftanoglu et Peng [30]	DMSO (10 % vol)	$1^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Rapide
Cryoconservation par vitrification				
Embryons de <i>Drosophila sp.</i>	Steponkus <i>et al.</i> [40]	Éthylène glycol (8,5 M)	$> 10\,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Rapide

Examples of the use of cryoconservation techniques on insect embryos and cells



larval stages and pupae of the lacewing *Nineta pallida*. Embryos and the first two larval instars that grow during the coldest months of the year have the lowest supercooling point.

hormones, plus particulièrement l'hormone juvénile. La diminution du taux d'hormones dans l'hémolymphe induit une migration avec rassemblement d'individus dans des sites d'hibernation spécifiques [9, 10]. Le taux d'hormones continuant à décroître, la diapause hivernale s'installe et se marque par l'arrêt de la vitellogenèse [42]. Il se produit en même temps un mécanisme d'acclimatation lié à la production massive de sucres et de polyols antigels ainsi que de protéines cryoprotectrices, ce qui abaisse le point de surfusion [16, 17, 20]. Les œufs des prédateurs concernés, étant généralement pondus en été, ne sont nullement prédisposés à résister aux températures inférieures à 0 °C. Il est donc, *a priori*, peu probable qu'ils possèdent une capacité suffisante pour pouvoir être stockés en état de surfusion.

En revanche, il existe quelques cas de diapause hivernale embryonnaire chez d'autres insectes. Dans ce cas, la diapause hivernale débute généralement au terme d'une première différenciation embryonnaire (stade post-blastodermique), souvent caractérisée par une modification de coloration de l'œuf. Elle se marque par un ralentissement très net, voire un arrêt complet du développement embryonnaire qui entraîne une augmentation importante de la période d'incubation [43]. Cette diapause est précédée par une période durant laquelle l'embryon accumule des molécules cryoprotectrices et est suivie par une reprise du développement embryonnaire qui va de pair avec la dégradation ou la consommation de ces substances [9].

Dans le cas de *Nineta pallida*, un *Chrysopidae* non encore utilisé en lutte biologique qui hiberne sous forme embryonnaire

ou à l'état de très jeune larve, il apparaît que ce sont précisément les stades de développement présentant les plus faibles valeurs du PAC qui résistent le mieux aux basses températures [44] (figure 6).

La cryopréservation des œufs diapausants d'insectes ne pose guère de problèmes technologiques, du fait des processus naturels d'acclimatation. On connaît ainsi plusieurs cas où des œufs ont été conservés durant près d'un an sans diminution apparente de leur potentiel d'éclosion. La température de conservation idéale est alors située aux alentours de -5 °C. Si elle est inférieure, on enregistre des mortalités importantes dues à l'instabilité de l'état de surfusion ; en

revanche, si on se rapproche trop de 0 °C, on assiste à des phénomènes d'intoxication provoqués par une accumulation de métabolites toxiques, souvent dérivés des substances cryoprotectrices [45, 46].

La mise au point d'une technique de conservation des œufs en état de surfusion est loin d'être aussi aisée du fait de la grande sensibilité au froid des embryons [21, 32, 40]. Dans ce cadre, un nouveau mécanisme d'adaptation au froid susceptible de déboucher sur de nouvelles techniques de cryoconservation a été récemment mis en évidence [47]. Il s'agit d'un mécanisme d'acclimatation rapide d'insectes non diapausants lié à une accumulation de glycérol permettant l'abaissement du point de surfusion.

Ceci étant, les seules techniques de cryoconservation d'insectes non diapausants ayant fait leurs preuves à l'heure actuelle sont fondées sur le stockage à très faible température.

Conservation au froid des œufs et embryons d'insectes non diapausants

Le développement d'une méthode de cryoconservation des invertébrés qui ne

Figure 6. Valeurs du point d'abaissement cryoscopique (PAC) des différents stades préimaginaux du chrysope *Nineta pallida*. L'embryon et les deux premiers stades larvaires, qui se développent durant les mois les plus froids de l'année, présentent les plus faibles valeurs du PAC (d'après Canard et Vannier [44]).

Figure 6. Supercooling points for the

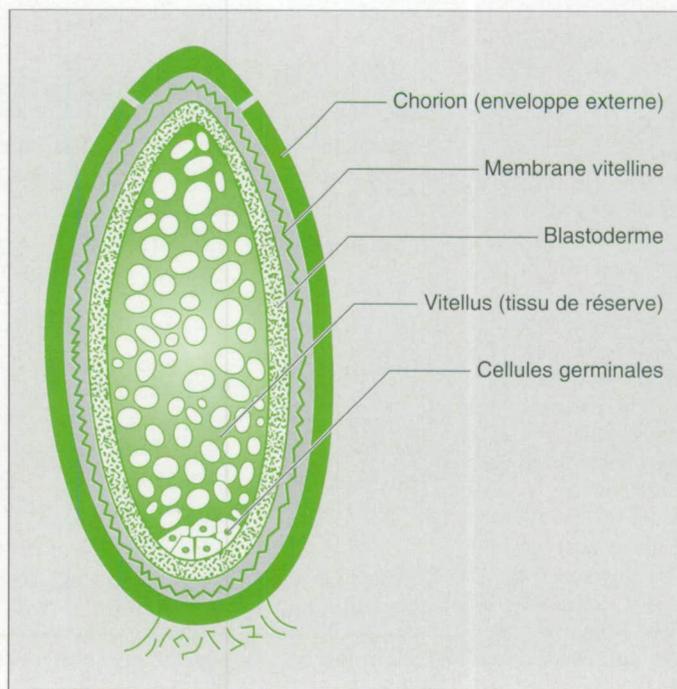


Figure 7. Structure générale d'un embryon d'insecte au stade blastoderme. Représentation des différentes enveloppes de l'œuf, des cellules en voie de différenciation (cellules germinales) et des réserves vitellines.

Figure 7. General structure of the blastoderm stage of an insect embryo. The different egg envelopes, differential cells (germinal cells) and vitellus are presented.

résistent pas naturellement au froid représente un véritable défi technologique difficile à relever [23, 31, 39]. Deux techniques ont fourni des résultats probants à cet égard : la congélation, par abaissement progressif de la température et la méthode de vitrification, par utilisation de refroidissements ultrarapides. Afin de prévenir la formation de cristaux de glace dans le cytosol, ces deux techniques demandent l'utilisation d'APC comme le DMSO, l'éthylène glycol, le propylène glycol ou le glycérol, après perméabilisation des enveloppes protectrices. Des difficultés majeures se posent à ce niveau. Il est en effet nécessaire de perméabiliser ou d'éliminer le chorion et la membrane vitelline qui entourent l'embryon (figure 7), sans pour autant endommager ce dernier. Les étapes de perméabilisation pratiquées le plus couramment consistent à éliminer le chorion à l'aide d'une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium et à extraire la couche de cire associée à la membrane vitelline par un lavage à l'octane ou à l'hexane. Ces opérations sont particulièrement délicates et constituent parfois un obstacle insurmontable pour la cryoconservation d'embryons de grande taille, tels les blastodermes d'insectes [31]. De plus, les embryons d'insectes sont très riches en vitellus et les complexes lipoprotéiques qui constituent ce tissu de réserve sont très vite dénaturés durant le refroidissement et la congélation de l'embryon. Le risque de perturbation de l'embryogenèse après congélation est donc assez élevé [48]. Enfin, les très jeunes embryons présentent une sensibilité exacerbée à la congélation, très probablement liée au fait que l'exposition au froid des embryons en voie de différenciation cellulaire provoque un arrêt définitif des divisions mitotiques [49].

Perspectives de cryoconservation des œufs non diapausants d'insectes aphidiphages

Au vu des moyens financiers et humains qui ont été nécessaires à la mise au point d'une méthode de congélation des embryons de *Drosophila melanogaster* [32], il ne fait aucun doute que le développe-

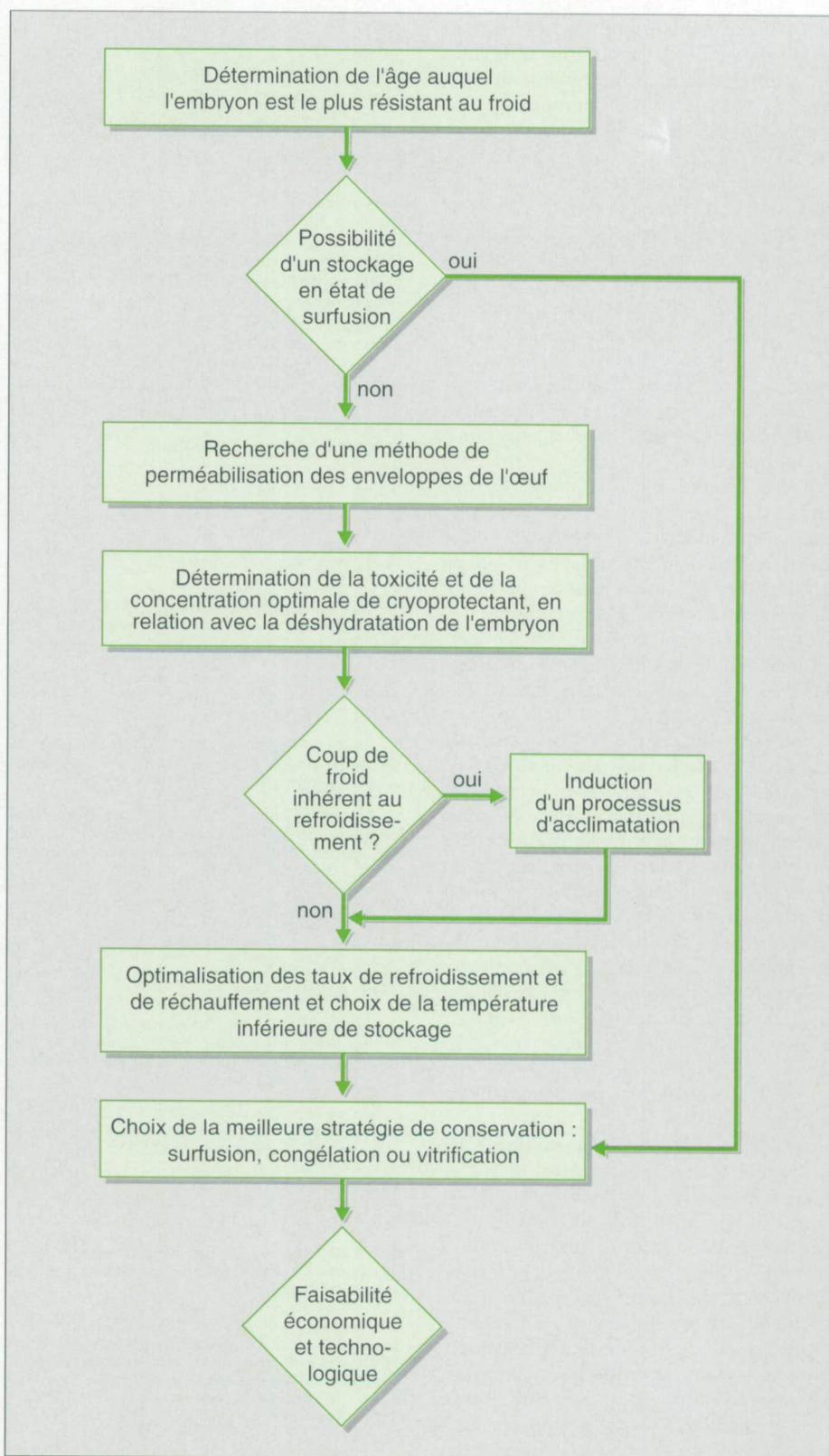


Figure 8. Recherches à effectuer en vue de mettre au point une stratégie de cryoconservation des embryons d'insectes aphidiphages.

Figure 8. Research to be carried out to develop an embryo cryoconservation strategy for aphidiphagous insects.

ment d'une méthode de cryopréservation d'embryons non diapausants d'insectes aphidiphages ne sera possible que moyennant la réalisation d'un important programme de recherche (figure 8).

La première étape consistera à tester les possibilités de conservation en état de surfusion. En effet, il n'est pas exclu que les embryons d'insectes aphidiphages puissent se comporter comme les insectes non diapausants étudiés par Lee, Chen et Denlinger [47], qui développent un mécanisme de tolérance au froid par abaissement du point de surfusion au terme d'une brève période d'acclimatation. Après avoir déterminé le moment où les embryons sont les plus tolérants à la congélation (en terme de nombre d'heures écoulées après la ponte), l'hypothèse de l'induction d'un mécanisme rapide d'acclimatation pourra être testée en déterminant les valeurs du PAC et du pourcentage d'éclosion d'œufs ayant subi différentes séquences d'acclimatation.

Les autres possibilités de cryoconservation sont le stockage des œufs à très faible température par congélation classique ou par vitrification. Quelle que soit l'option envisagée, il y a lieu de mettre au point une méthode qui permette de perméabiliser les membranes protectrices des œufs, afin d'assurer une bonne pénétration des solutions cryoprotectrices. Le problème est particulièrement aigu pour les œufs de coccinelles qui sont pourvus d'un chorion très développé [50]. Il importe donc de mettre au point une méthode qui soit à la fois suffisamment agressive pour éliminer cette enveloppe et suffisamment douce pour éviter de blesser l'embryon. Une fois ce problème résolu, il s'agira de trouver un APC qui soit à la fois efficace et peu toxique pour les embryons.

Le développement de la méthode de cryoconservation passera ensuite par la recherche de la courbe de refroidissement optimale. On déterminera la séquence d'acclimatation destinée à induire la production naturelle de cryoprotectants, le nombre de paliers et de séquences de refroidissement ainsi que le choix de la pente de ces différentes séquences (taux de refroidissement).

La mise au point de ces paramètres ainsi que le choix de la stratégie de cryoconservation (congélation *versus* vitrification) dépendront notamment de la nature des dommages causés par le refroidissement, de la variation du coefficient de perméabilité hydrique de l'embryon avec la température, de la température caracté-

ristique de nucléation ainsi que de la sensibilité de l'embryon aux fortes concentrations en APC ■

Remerciements

Ce travail a été partiellement subventionné par la Région Wallonne (Direction Générale des Technologies, de la Recherche et de l'Énergie).

Nous remercions le Dr Richard E. Lee du Département de Zoologie de l'Université de Miami, les Drs Guy Vannier et Philippe Vernon, chercheurs CNRS et Jacques Mignon pour les publications qu'ils nous ont fait parvenir ainsi que pour leur lecture critique du manuscrit. Notre reconnaissance va à Benoît Adam pour son inlassable assistance technique.

Références

1. Van Lenteren JC, Woets J. Biological and integrated pest control in greenhouses. *Ann Rev Entomol* 1988 ; 33 : 239-69.
2. Anonyme. Directory of producers of natural enemies of common pests. *IPM Practitioner* 1992 ; 14 : 8-18.
3. Hawlitzky N. La lutte biologique à l'aide de Trichogrammes. *Le courrier de la cellule environnement Inra* 1992 ; 16 : 9-26.
4. Aubert J, Aubert JJ, Goeldlin P. Douze ans de captures systématiques de Syrphides au col de Bretolet (Alpes valaisannes). *Bull Soc Entom Suisse* 1976 ; 49 : 115-42.
5. Gillard M. Les papillons migrants en Belgique. *Insectes* 1991 ; 83 : 21-2.
6. Danks HV. Modes of seasonal adaptation in the insects. I. Winter survival. *Can Entomol* 1978 ; 110 : 1167-205.
7. Danks HV. Winter habitats and ecological adaptations for winter survival. In : Lee RE, Denlinger DL, eds. *Insects at low temperature*. New York : Chapman & Hall, 1991 : 231-59.
8. Moore MV, Lee RE Jr. Surviving the big chill : overwintering strategies of aquatic and terrestrial insects. *Am Entomol* 1991 ; 37 : 111-8.
9. Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. *Seasonal adaptations of insects*. Oxford : Oxford University Press, 1986 ; 411 p.
10. Danks HV. *Insect dormancy : an ecological perspective*. Ottawa : Biological Survey of Canada, 1987 ; 403 p.
11. Lee RE, Denlinger DL, Chen CP. Insect cold-hardiness and diapause regulatory relationships. In : Sehnaal F, et al., eds. *Endocrinological frontiers in physiological insect ecology*. Wrocław : Wrocław Technical University Press, 1988 : 243-62.
12. Vannier G. The thermobiological limits of some freezing intolerant insects : the supercooling and thermostupor points. *Acta Oecol* 1994 ; 15 : 31-42.
13. Storey KB, Storey JM. Comment les animaux survivent au gel. *La Recherche* 1989 ; 208 : 332-41.

14. Lee RE Jr. Insect cold-hardiness : to freeze or not to freeze. *Bioscience* 1989 ; 39 : 308-13.

15. Block W. Cold-hardiness in invertebrate poikilotherms. *Comp Biochem Physiol* 1982 ; 73A : 581-93.

16. Vannier G. Accroissement de la capacité de surfusion chez les adultes de *Chrysoperla carnea* entrant en diapause hivernale. *Neuropt Intern* 1986 ; 4 : 71-82.

17. Sømme L. Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comp Biochem Physiol* 1982 ; 73A : 519-44.

18. Lee RE Jr. Principles of insect low temperature tolerance. In : Lee RE, Denlinger DL, eds. *Insects at low temperature*. New York : Chapman & Hall, 1991 : 17-46.

19. Bale JS. Insect cold-hardiness : freezing and supercooling. An ecophysiological perspective. *J Insect Physiol* 1987 ; 33 : 899-908.

20. Bennett LE, Lee RE. Simulated winter to summer transition in diapausing adults of the lady beetle *Hippodamia convergens* : supercooling point is not indicative of cold-hardiness. *Physiol Entomol* 1989 ; 14 : 361-7.

21. Strong-Gunderson JM, Leopold RA. Cryobiology of *Musca domestica* : supercooling capacity and low temperature tolerance. *Envir Entomology* 1989 ; 18 : 756-62.

22. Bale JS. Classes of insect cold-hardiness. *Funct Ecol* 1993 ; 7 : 751-3.

23. Ring RA. Insects and their cells. In : Ashwood-Smith MJ, Farrant J, eds. *Low temperature preservation in medicine and biology*. Tunbridge Wells : Pitman medical, 1980 : 187-217.

24. Denlinger DL. Relationship between cold-hardiness and diapause. In : Lee RE, Denlinger DL, eds. *Insects at low temperature*. New York : Chapman & Hall, 1991 : 174-98.

25. Lee RE, Lee MR, Strong-Gunderson JM. Insect cold-hardiness and ice nucleating active microorganisms including their potential use for biological control. *J Insect Physiol* 1993 ; 39 : 1-12.

26. Sømme L, Block W. Adaptations to alpine and polar environments in insects and other terrestrial arthropods. In : Lee RE, Denlinger DL, eds. *Insects at low temperature*. New York : Chapman & Hall, 1991 : 318-59.

27. Duman JG, Wen Wu D, Xu L, Tursman D, Olsen TM. Adaptations of insects to subzero temperatures. *Quart Rev Biol* 1991 ; 66 : 387-410.

28. Baust JG, Lee RE, Ring RA. The physiology and biochemistry of low temperature tolerance in insects and other terrestrial arthropods : a bibliography. *Cryo-Letters* 1982 ; 3 : 191-212.

29. Mazur P. Freezing of living cells : mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984 ; 247 : 125-42.

30. Kaftanoglu O, Peng YS. Preservation of honeybee spermatozoa in liquid nitrogen. *J Apic Res* 1984 ; 23 : 157-63.

31. Leopold RA. Cryopreservation of insect germplasm : cells, tissues and organisms. In : Lee RE, Denlinger DL, eds. *Insects at low temperature*. New York : Chapman & Hall, 1991 : 379-407.

32. Steponkus PL, et al. Cryobiology of *Drosophila melanogaster* embryos. In : Lee RE, Denlinger DL, eds. *Insects at low temperature*. New York : Chapman & Hall, 1991 : 408-23.

33. Franks F, Mathias SF, Galfre P, Webster SD, Brown D. Ice nucleating and freezing in undercooled cells. *Cryobiol* 1983 ; 20 : 298-309.
34. Mathias SF, Fanks F, Hatley RHM. Preservation of viable cells in the undercooled state. *Cryobiol* 1985 ; 22 : 537-46.
35. Salt RW. Relation between time of freezing and temperature in supercooled larvae of *Cephus cinctus* Nort. *Can J Zool* 1966 ; 44 : 947-52.
36. Storey KB, Storey JM. Freeze tolerance in animals. *Physiol Rev* 1988 ; 68 : 27-84.
37. Vernon P, Vannier G. Étude expérimentale de la tolérance au froid chez les adultes d'un diptère subantarctique : *Anatalanta aptera* Eaton (Spaeroceridae). CNFRA (Paris) 1987 ; 58 : 151-67.
38. Kusuda J, Noguchi T, Onimaru K, Yamashita O. Maturation and hatching of eggs from silkworm ovaries preserved in liquid nitrogen. *J Insect Physiol* 1985 ; 31 : 963-7.
39. Heacox AE, Leopold RA. Optimizing conditions for cryopreservation of an insect cell line. *Cryobiol* 1984 ; 21 : 435-42.
40. Steponkus PL, et al. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature* 1990 ; 345 : 170-2.
41. James ER, et al. The essential role of vitrification in cryopreservation of parasitic helminths. *Cryobiol* 1989 ; 26 : 575.
42. Hemptinne JL, Naisse J. Life cycle strategy of *Adalia bipunctata* (L.) in a temperate country. In : Niemczyk E, Dixon AFG, eds. *Ecology and effectiveness of aphidophaga*. The Hague : SPB Academic Publishing, 1988 : 71-8.
43. Nilssen A, Tenow O. Diapause, embryo growth and supercooling capacity of *Epirrita autumnata* eggs from northern Fennoscandia. *Entomol Exp Appl* 1990 ; 57 : 39-55.
44. Canard M, Vannier G. Adaptations of pre-maginal stages of *Nineta pallida* (Schneider) to frost and heat (Insecta : Neuroptera : Chrysopidae). In : Canard M, et al., eds. *Proc 4th Intern Symp Neuropt*. Toulouse, 1992 : 75-85.
45. Way MJ. The effects of freezing temperatures on the developing eggs of *Leptohylemyia coarctata* Fall. (Diptera : Muscidae) with special reference to diapause development. *J Insect Physiol* 1960 ; 4 : 92-101.
46. Strathdee AT, Howling GG, Bale JS. Cold-hardiness of overwintering aphid eggs. *J Insect Physiol* 1995 ; 41 : 653-7.
47. Lee RE, Chen CP, Denlinger DL. A rapid cold-hardening process in Insects. *Science* 1987 ; 238 : 1415-7.
48. Lovelock JE. The denaturation of lipid protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc R Soc [B101]* 1957 ; 147 : 427.
49. Callaini G, Marchini D. Abnormal centrosomes in cold-treated *Drosophila* embryos. *Exp Cell Res* 1989 ; 184 : 367-74.
50. Majerus MEN. *Ladybirds*. London : Harper Collins Publishers, 1994 ; 367 p.

Résumé

L'utilisation d'œufs de prédateurs aphidiphages (Coccinellidae, Chrysopidae ou Syrphidae) prêts à éclore constitue un moyen de lutte biologique particulièrement efficace pour lutter contre les pucerons. Malheureusement, il n'existe pas à l'heure actuelle de procédé permettant la conservation à long terme de ces œufs en vue d'en assurer une distribution optimale. Les techniques de cryoconservation pourraient contribuer à résoudre ce problème. Il existe deux grands modes de résistance au froid chez les invertébrés, selon qu'ils sont sensibles ou résistants à la congélation. Largement inspirées de ces deux stratégies, trois techniques ont été développées en matière de cryoconservation : le stockage en état de surfusion, la congélation et la vitrification. L'application de ces différents procédés à la conservation des œufs d'insectes prédateurs de pucerons est mise en rapport avec les caractéristiques biologiques des différentes espèces concernées et avec le type de diapause hivernale qu'elles adoptent. Les techniques de cryoconservation les plus efficaces sont la congélation et la vitrification.