

Optimisation de l'isolement des champignons entomopathogènes *Metarhizium* spp. inféodés à la rhizosphère et aux insectes dans l'Ouest du Burkina Faso dans le cadre de la lutte contre le paludisme

Etienne BILGO^{1, 2*}, Doube Lucien LAMY^{1, 2, 3},
Wendinso Alphonse SAWADOGO¹, Abdoulaye DIABATE^{1, 2}

Résumé

Le paludisme est la principale cause de consultation, d'hospitalisation et de décès en Afrique. Face à la perte d'efficacité des outils de lutte actuels, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) encourage l'exploration de nouvelles méthodes alternatives, telles que la lutte biologique à travers des micro-organismes, des parasites et des prédateurs naturels des moustiques. Les champignons entomopathogènes du genre *Metarhizium* spp. se distinguent par leurs résultats prometteurs en laboratoire (BILGO *et al.*, 2018). *Metarhizium* spp. présente un double mode de vie : pathogène des insectes et endophyte des plantes. Cependant, les techniques d'isolement de ces champignons posent des défis, notamment en ce qui concerne le choix de milieux de culture optimaux. Cette étude vise à optimiser les techniques d'isolement des champignons *Metarhizium* inféodés à la rhizosphère et aux insectes dans l'Ouest du Burkina Faso. Au total 565 échantillons de rhizosphères et d'insectes ont été prélevés à Bama (11°23'N, 4°24'O), une zone de riziculture et Soumousso (11°04'N, 4°03'W), une zone de savane et de culture de maïs, tous des villages dans l'Ouest du Burkina Faso., puis cultivés sur deux milieux sélectifs enrichis d'antibiotiques à base de Potato Dextrose Agar (PDA), 'PDA + Pénicilline + Ampicilline' et 'PDA + Gentamicine + Ampicilline. Les cultures ont été incubées à 27°C ±2°C avec 70% d'humidité pendant 21 jours. Après identification macroscopique et microscopique, les colonies suspectes ont subi une amplification de la région Internal Transcribed Spacer (ITS) par PCR pour confirmation. Parmi les milieux testés, le milieu PDA + Gentamicine + Ampicilline s'est révélé le plus efficace pour l'isolement de *Metarhizium*. Selon les caractères macroscopiques et

¹ Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) Direction Régionale de l'Ouest (DRO) / CNRST, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

² Institut National de Santé Publique (INSP), Centre Muraz, Bobo Dioulasso, Burkina Faso

³ Sciences and Techniques Department, Institut du Développement Rural, Université Nazi Boni, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

*Auteur correspondant : Etienne BILGO , bilgo02@yahoo.fr, Téléphone : (+226) 71 65 61 24

microscopiques, nous avons identifié 48 et 36 souches de *Metarhizium* spp. inféodés à la rhizosphère et aux insectes respectivement. Puis, un sous-échantillon de 50 souches dont la région ITS a été amplifiée a été utilisé pour identifier 15 souches du genre *Metarhizium* inféodées aux insectes et 21 souches inféodées à la rhizosphère.

Mots-clés : *Metarhizium*, isolement, identification, PCR, paludisme, Burkina Faso.

Optimization of the isolation of entomopathogenic fungi *Metarhizium* spp. associated with the rhizosphere and insects in western Burkina Faso in the context of malaria control

Abstract

Malaria is the leading cause of consultations, hospitalizations, and deaths in Africa. Given the decreasing effectiveness of current control tools, the World Health Organization (WHO) encourages the exploration of alternative methods, such as biological control using microorganisms, parasites, and natural predators of mosquitoes. Entomopathogenic fungi of the genus *Metarhizium* spp. stand out for their promising laboratory results (BILGO *et al.*, 2018). *Metarhizium* spp. exhibit a dual lifestyle: as insect pathogens and as plant endophytes. However, isolation techniques for these fungi pose challenges, particularly in selecting optimal culture media. This study aims to optimize the isolation techniques for *Metarhizium* fungi associated with the rhizosphere and insects in western Burkina Faso. A total of 565 rhizosphere and insect samples were collected in Bama (11°23'N, 4°24'W), a rice-growing area, and Soumousso (11°04'N, 4°03'W), a savanna and maize cultivation area, both located in western Burkina Faso. These samples were cultured on two selective media enriched with antibiotics based on Potato Dextrose Agar (PDA): “PDA + Penicillin + Ampicillin” and “PDA + Gentamicin + Ampicillin.” The cultures were incubated at 27°C ± 2°C with 70% humidity for 21 days. After macroscopic and microscopic identification, suspect colonies underwent amplification of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region by PCR for confirmation. Among the media tested, PDA + Gentamicin + Ampicillin proved most effective for isolating *Metarhizium*. Based on macroscopic and microscopic characteristics, 48 and 36 *Metarhizium* spp. strains were identified from the rhizosphere and insects, respectively. A subsample of 50 strains, for which the ITS region was amplified, was used to identify 15 *Metarhizium* strains associated with insects and 21 strains associated with the rhizosphere.

Keywords: *Metarhizium*, isolation, identification, PCR, malaria, Burkina Faso.

Introduction

Le paludisme reste une cause majeure de morbidité et de mortalité en Afrique subsaharienne, avec des millions de cas chaque année, ce qui met une pression énorme sur les systèmes de santé des pays touchés, notamment le Burkina Faso (Bilgo *et al.*, 2024). Les moustiques du

genre Anopheles, principaux vecteurs du paludisme, ont été ciblés par diverses stratégies de lutte telles que l'utilisation d'insecticides et de moustiquaires imprégnées. Cependant, l'apparition de résistances aux insecticides, notamment en Afrique de l'Ouest notamment au Burkina Faso, limite l'efficacité de ces méthodes conventionnelles de lutte antivectorielle (Hemingway *et al.*, 2016). Face à ce défi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) encourage vivement l'exploration de nouvelles solutions de lutte contre les moustiques, avec une préférence pour des méthodes durables comme la lutte biologique (WHO, 2022). La lutte biologique repose sur l'utilisation d'agents naturels, comme les prédateurs, les parasites ou les micro-organismes, pour réduire les populations de moustiques. Parmi les approches émergentes, les champignons entomopathogènes, en particulier ceux du genre *Metarhizium*, se révèlent très prometteurs en tant qu'alternative écologique. Ces champignons sont capables d'infecter et de tuer les moustiques tout en présentant un profil de sécurité favorable pour l'environnement et la santé humaine (SCHOLTE *et al.*, 2005 ; BILGO *et al.*, 2018). En outre, *Metarhizium* possède un mode de vie double, agissant à la fois comme pathogène des insectes et endophyte des plantes, ce qui lui confère un potentiel non seulement pour lutter contre les moustiques, mais aussi pour protéger les cultures dans les zones endémiques (SASAN *et* BIDOCHKA, 2012). Cependant, bien que les résultats en laboratoire soient encourageants (BILGO *et al.*, 2018), l'application pratique de *Metarhizium* dans le milieu naturel rencontre plusieurs défis techniques, notamment l'isolement et la culture de ces champignons. L'isolement des souches de *Metarhizium* provenant de la rhizosphère des plantes ou des insectes infectés demeure complexe en raison du manque de protocoles optimisés pour la culture, la purification et l'identification des souches (ST. LEGER *et al.*, 1992). Il est donc impératif de développer des protocoles standardisés pour améliorer l'efficacité de l'isolement des souches cultivables de *Metarhizium* spp.. Le cycle de vie diversifié de *Metarhizium* inclut la colonisation de la rhizosphère des plantes, où il agit en tant que mutualiste, améliorant la résistance des plantes aux pathogènes et la santé du sol (MAUCLINE *et al.*, 2013). En tant qu'entomopathogène, il est particulièrement efficace contre une large gamme d'insectes, y compris les moustiques Anopheles (SCHOLTE *et al.*, 2005 ; BILGO *et al.*, 2018). Des études en Afrique de l'Est ont démontré que l'infection par *Metarhizium* peut réduire significativement la durée de vie des moustiques adultes, ce qui limite leur capacité à transmettre le paludisme (SCHOLTE *et al.*, 2004). Pour maximiser l'efficacité de cette

approche sur le terrain, il est essentiel de disposer de souches locales de *Metarhizium* adaptées aux conditions écologiques spécifiques des régions cibles, comme l'Ouest du Burkina Faso. Le Burkina Faso, notamment la région de Bama, offre des conditions propices à la prolifération des moustiques grâce à ses zones rizicoles (DIABATE *et al.*, 2004). Cette étude vise donc à optimiser les techniques d'isolement des souches de *Metarhizium* à partir de la rhizosphère et des insectes dans les localités de Bama et Soumouso. Des milieux de culture enrichis en antibiotiques seront utilisés pour sélectionner les souches locales adaptées aux conditions spécifiques de ces régions (JACKSON *et al.*, 2000). Les souches obtenues seront ensuite identifiées par des techniques moléculaires telles que la PCR, garantissant une identification précise (DRIVER *et al.*, 2000). L'optimisation de ces techniques d'isolement constitue une étape essentielle pour l'utilisation future de ces champignons dans la lutte biologique contre le paludisme dans les zones rurales du Burkina Faso, où les méthodes de lutte conventionnelles ont montré leurs limites.

I. Méthodologie

I.1. Type et période d'étude

Il s'est agi d'une étude expérimentale. Elle s'est déroulée de septembre 2022 à décembre 2022, période au cours de laquelle, des échantillons ont été collectés sur le terrain, suivi de leur traitement et analyse au laboratoire.

I.2. Sites et Cadre de l'étude

La phase prospective de cette étude s'est déroulée dans les villages de la Vallée du Kou (Bama) (11°23'N, 4°24'O), une zone de riziculture et Soumouso (11°04'N, 4°03'W), une zone de savane et de culture de maïs, tous des villages dans l'Ouest du Burkina Faso (**Figure 4**). Quant à la phase expérimentale, elle s'est déroulée dans les laboratoires du Centre Muraz et de la Direction Régionale de l'Ouest de l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS/SRO).

I.3. Collecte des échantillons

Les échantillons étaient constitués d'insectes (volants et rampants) et de la rhizosphère collectée sur le terrain pour l'isolement des champignons entomopathogènes. Les échantillons de rhizosphère ont été obtenus en prélevant une partie de la racine secondaire des arbustes ou un morceau de l'écorce de la racine des arbres. Aussi, les herbacées

et les cultures comme le maïs, le mil, le riz et le haricot ont été déracinés et leurs racines coupées. Chaque échantillon a été individuellement collecté dans un tube Falcon de 50 mL contenant la terre d'où provient la racine (**Figure 1a**). Quant aux insectes, les rampants ont été capturés à l'aide de pinces, et les volants à l'aide d'un filet fauchoir, le long d'un transect d'environ 5 km sur chaque site (Figure 1b). Ils ont été placés dans des cages à insectes. Les échantillons de racines collectés sur le terrain ont été conservés dans des glacières. Quant aux insectes, ils ont été conservés dans des cages à insectes. Ceux-ci ont été transportés au laboratoire le jour même de la collecte.



(a): Opérateur collectant de la rhizosphère à partir des racines d'un arbuste. Collecte des insectes.

(b): Opérateur capturant des insectes à l'aide d'un filet fauchoir.

Figure 1 : Collecte de la rhizosphère et des insectes sur le terrain pour l'isolement des souches de *Metarhizium* spp.

I.4. Isolement des champignons

I.4.1. Traitement des échantillons

Chaque échantillon de racine a été traité individuellement. Ce traitement a consisté à laver les racines des plantes avec de l'eau distillée afin d'enlever l'excès de terre. Les racines ont été ensuite découpées à l'aide d'une paire de ciseaux stériles en petits morceaux et mises dans un tube Eppendorf de 1,5 ml auquel ont été ajoutés 750 µl

d'eau distillée. Lors du découpage, pour passer d'un échantillon à l'autre, la paire de ciseaux a été désinfectée avec de l'alcool 70%. Les échantillons ainsi découpés ont été broyés à l'aide d'un broyeur mécanique Qiagen tissue Lyser II à la fréquence de 4000 Hz pendant 4 minutes. Quant aux insectes, ils ont été gardés dans les cages en attendant la mise en culture.

I.4.2. Préparation des milieux de culture

Pour l'isolement des champignons, le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) a été utilisé. Afin de le rendre sélectif, des antibiotiques tels que la pénicilline, la gentamicine et l'ampicilline ont été ajoutés au PDA. En effet, les antibiotiques inhibent la croissance des bactéries sur le milieu de culture. Le choix porté sur ces trois antibiotiques est notamment dû à leur large spectre d'action sur les bactéries. Le PDA est composé à 86 % d'infusion de pomme de terre, à 8% de dextrose et à 6% d'agar. Pour préparer le milieu PDA sélectif, tout d'abord, 42g de milieu PDA ont été suspendus dans 1 l d'eau distillée. Ensuite, le mélange a été homogénéisé. Le milieu a été autoclavé à 121 °C pendant 15 minutes. Le milieu est ensuite laissé refroidir puis 2 combinaisons d'antibiotiques ont été ajoutées.

La combinaison utilisée était Ampicilline + Gentamicine et Ampicilline + Pénicilline (**Figure 2**). Chaque flacon d'antibiotique de 5 grammes a été mélangé avec 5 ml d'eau distillée par inversion. La moitié de chaque flacon, c'est-à-dire 2,5 millilitres de chaque antibiotique a été prélevé à l'aide d'une seringue et ajouté à 1 litre du milieu PDA après refroidissement. Pendant le refroidissement, le milieu est constamment agité par inversion afin d'éviter qu'il se prenne en masse dans le flacon. Le milieu ainsi préparé a été distribué dans des boîtes de pétri et laissé en repos sous une hotte de sécurité microbiologique (**Figure 2**). Les milieux de culture ainsi préparés sont prêts pour l'ensemencement et l'isolement des colonies fongiques.

I.4.3. Mise en culture

Les broyats obtenus après broyage des échantillons de rhizosphère ont été homogénéisés à l'aide d'un agitateur vortex pendant 30 secondes. Puis 100 µl du broyat ont été immédiatement prélevés à l'aide d'une micropipette et ensemencés sur les milieux de culture préparés au préalable. Quant aux insectes, chaque insecte a été déposé sur le milieu de culture de façon étalée (**Figure 3**). Les boîtes de pétri ainsi ensemencées ont été scellées à l'aide de parafilm afin d'éviter toute

contamination et mises en incubation à l'abri de la lumière à 27 ± 2 C, sous une humidité relative de 70% pendant 21 jours.

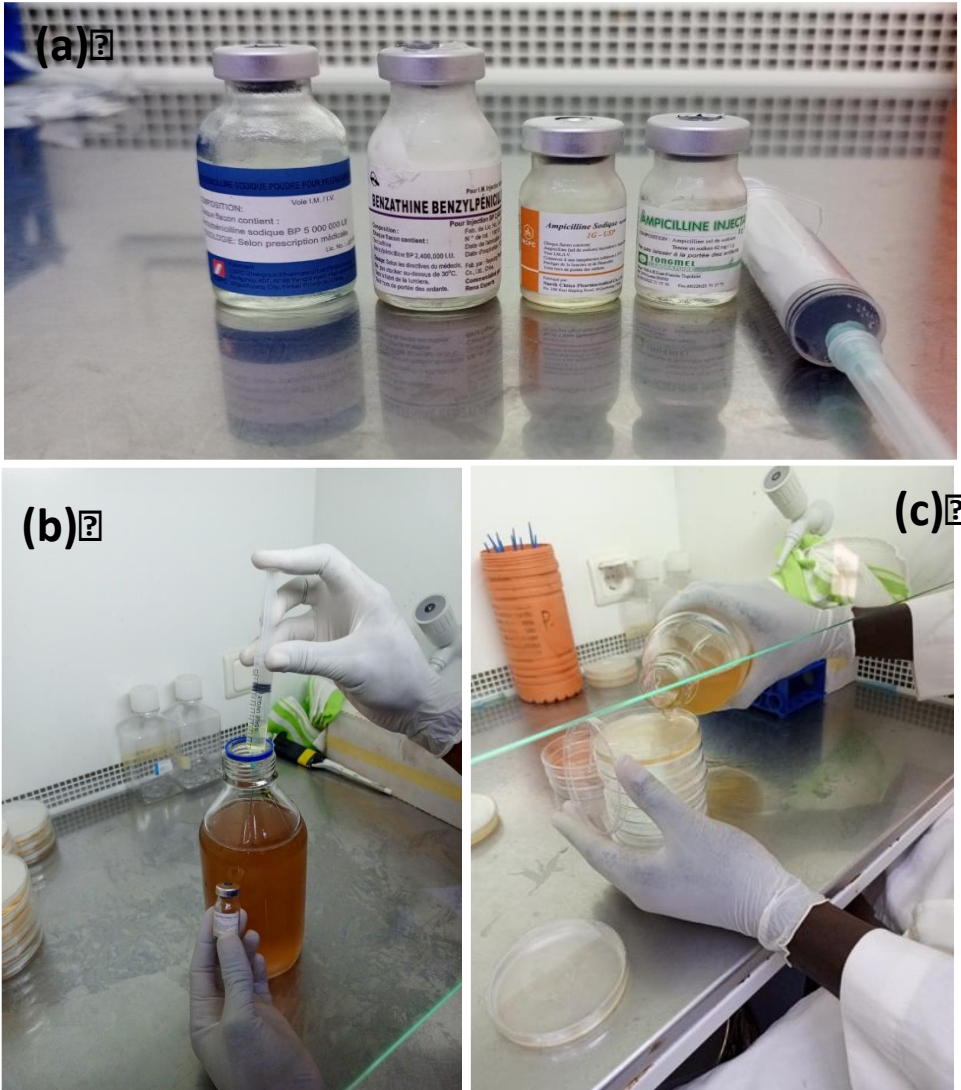


Figure 2 : Préparation des milieux de culture sélectifs pour l'isolement des champignons *Metarhizium* spp.

(a) Antibiotiques utilisés pour la préparation des milieux sélectifs ; (b) Ajout d'antimitotiques au milieu PDA pour la préparation des milieux sélectifs ; (c) Opérateur coulant le milieu PDA sélectif dans les boîtes de pétri sous une hotte microbiologique de classe 2.

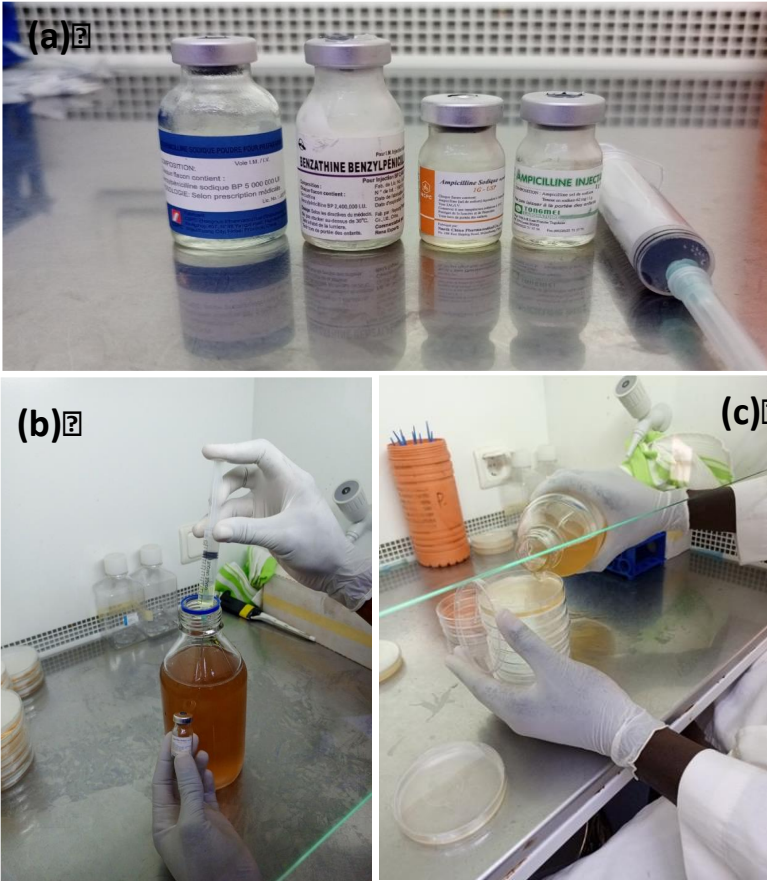


Figure 3 : Ensemencement des homogénats de la rhizosphère et d’insectes morts pour l’isolement des champignons *Metarhizium* spp.

(a) Opérateur ensemençant de l’homogénats de la rhizosphère sur un milieu de culture sélectif, (b) Papillon et (c) Libellule sur milieux de culture sélectif

I.4.4. Purification des isolats de champignons

Après les 21 jours d’incubation, les boîtes de pétri ont été ouvertes. Une partie de chaque colonie pure obtenue dont les caractéristiques macroscopiques et microscopiques ressemblent à celles du *Metarhizium* a été prélevée et ensemencée à nouveau, mais cette fois sur du PDA ordinaire (sans antibiotiques) et misent en incubation dans les mêmes conditions que précédemment. La purification a pour but d’obtenir une seule colonie par milieu de culture.

I.4.5. Identification des isolats

L'identification des colonies pures de champignons a été réalisée en trois étapes successives : d'abord une identification macroscopique puis une identification microscopique et enfin une identification moléculaire faite par la PCR. Les deux premières identifications ont concerné toutes les colonies pures obtenues. Cependant la troisième n'a concerné que les colonies répondant aux critères macroscopiques et microscopiques du *Metarhizium spp.*

I.4.6. Identification morphologique macroscopique et microscopique des isolats de *Metarhizium spp.*

L'identification morphologique macroscopique est basée sur des caractéristiques telles que la couleur blanche du mycélium et la couleur verte des colonies au stade mature. Les isolats répondant aux caractères macroscopiques du *Metarhizium spp.* ont été dans un second temps identifiés par la microscopie. Cette seconde identification s'est basée sur la forme allongée des conidies (forme de grain de riz) avec des terminaisons arrondies et la position apicale de son noyau. Pour cela, quelques conidies ont été montées entre lame et lamelle dans une goutte d'eau distillée et observées à l'objectif 40X du microscope optique.

I.4.7. Identification moléculaire

Les échantillons répondant aux critères macroscopique et microscopique du genre *Metarhizium* ont été amenés au laboratoire de biologie moléculaire pour l'identification moléculaire des espèces de *Metarhizium*. Pour extraire l'ADN fongique, 60 µl de Buffer 1X ont été ajoutés dans chaque tube Eppendorf contenant un échantillon. Ensuite, les échantillons ont été broyés à la fréquence de 4000 Hertz pendant 5 minutes au broyeur mécanique Qiagen tissueLyser II, puis centrifugés à 12000 rpm pendant 1 mn. Après cela, les échantillons ont été incubés à 95°C à l'aide d'une plaque chauffante pendant 5mn, puis centrifugés à 14000 rotations par minute pendant 5 minutes. Le surnageant, qui contient l'ADN fongique a été recueilli dans d'autres tubes Eppendorf et conservé à 4°C pour usage immédiat en PCR. Après extraction, l'ADN a été quantifié pour évaluer sa pureté au Nanodrop. Les échantillons, après dosage et dilution, ont ensuite été soumis à une PCR pour amplifier le locus Espaceur Interne Transcrit (ITS : Internal Transcribed Spacer). Pour l'amplification du locus visé, les amorces **ITS1** (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et **ITS4** (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') spécifiques au genre

Metarhizium sp. ont été utilisés. Le mix réactionnel ayant servi à la réalisation de la PCR est consigné dans le **tableau I**.

Tableau I : Volume réactionnel pour la PCR des espèces de *Metarhizium* spp.

	MIX x1	MIX x15
H₂O	10,44 µl	156,6 µl
TP 10X	2,6 µl	39 µl
dNTPs	2,6 µl	39 µl
MgCl²	3 µl	45 µl
ITS 1	1,6 µl	24 µl
ITS 4	1,6 µl	24 µl
Taq Pol	0,16 µl	2,4 µl
Volume Total mix	22 µl	
ADN	3 µl	
Volume réactionnel	25 µl	

Un volume de 22 µl du mix PCR a été distribué dans les puits de la plaque PCR. Un volume de 3 µl d'ADN de chaque échantillon a été ajouté par puits. Pour vérifier le bon déroulement de la PCR, un témoin négatif dans lequel l'ADN est remplacé par de l'eau et deux témoins positifs où l'ADN provenait de souches locales de *Metarhizium pingshaense* dont l'identité a été préalablement confirmée par séquençage, ont été ajoutés dans 3 puits de la plaque PCR. Les puits de la plaque PCR ont été fermés à l'aide d'un film PCR puis scellés et la plaque a été introduite dans le Thermocycleur. La PCR s'est déroulée selon le programme décrit dans la figure 4. Après amplification, les appliqueurs ont été déposés dans les puits du gel suivant l'ordre. Puis, 7 µl de marqueur de poids moléculaire de 100 pb a été mis dans un des puits afin de permettre de déterminer la taille des bandes à l'électrophorèse. A la fin de l'électrophorèse, le gel d'agarose a été retiré de la cuve et placé dans un dispositif de révélation muni d'une source de rayons Ultra-Violet pour permettre la visualisation des bandes d'ADN de *Metarhizium* spp.

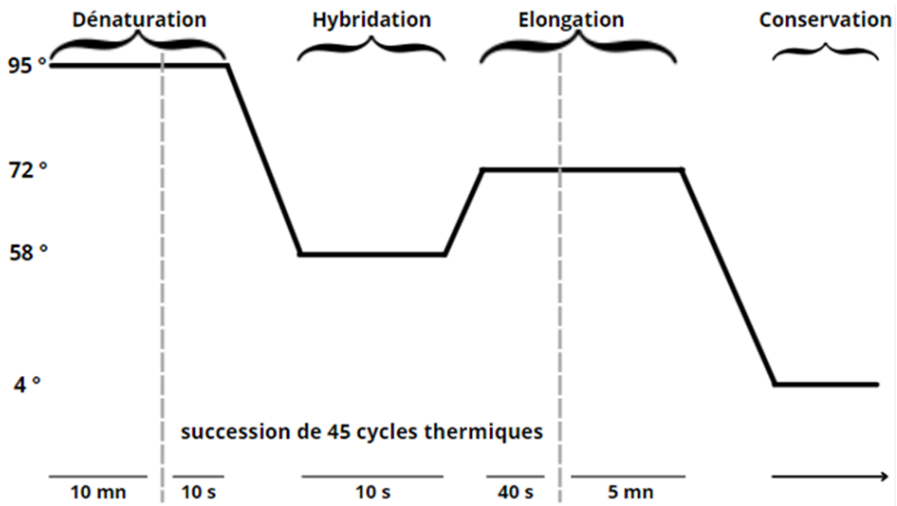


Figure 4: Paramètres du cycle de la PCR

I.5. Traitement des données

La saisie et l'analyse de nos données ont été respectivement effectuées avec le tableur Microsoft Excel 2013 et avec le logiciel R version 4.2.1. Nous avons utilisé le "Fisher Exact Test" comme test statistique. Le seuil de significativité était fixé à 5%. Les données de cette étude ainsi que les scripts des analyses se trouvent dans le répertoire GitHub au lien suivant : <https://github.com/EtienneBilgo/Bilgo-et-al - Revue SNA CNRST>

II. Résultats

II.1. Efficacité des milieux de culture pour l'isolement de *Metarhizium spp.*

Au cours de cette étude, 2 milieux de culture sélectifs ont été utilisés pour l'isolement des champignons : "PDA + Pénicilline + Ampicilline" et "PDA + Gentamicine + Ampicilline". Il en est ressorti que le milieu "PDA + Gentamicine + Ampicilline" a été plus efficace dans la répression de la croissance bactérienne sur les cultures ($p = 1,169e-07$). En effet, plus de 80% des échantillons ensemencés sur ce milieu de culture étaient exempts de bactéries contre moins de 60% pour la combinaison "PDA + Pénicilline + Ampicilline" (Figure 5).

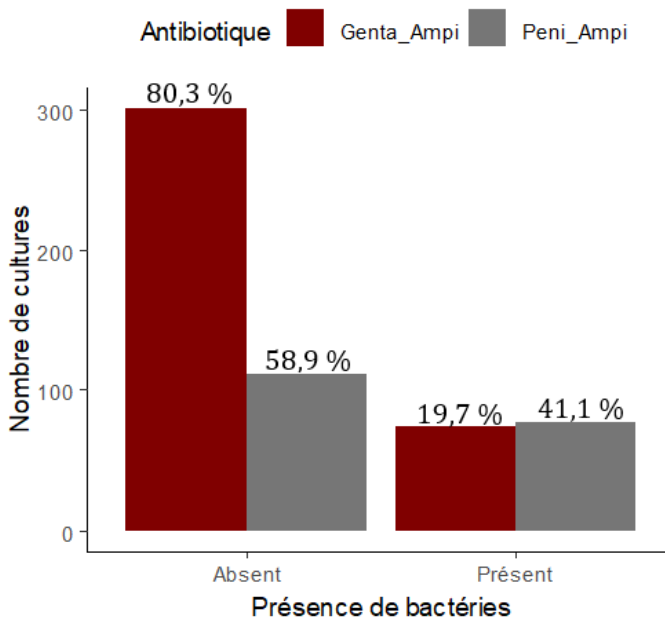


Figure 5 : Répartition des cultures en fonction de la présence de bactéries et des combinaisons d’antibiotiques utilisés

Avec le milieu de culture ‘‘PDA + Gentamicine + Ampicilline’’, nous avons obtenu en moyenne plus d’Unités Formatrices de Colonies (CFU) de champignon (10,61 CFU) que sur le milieu ‘‘PDA + Pénicilline + Ampicilline’’ (9,15 CFU) ($p=1,328 \times 10^{-7}$). La **figure 6** présente le nombre de colonies observées en fonction de la combinaison d’antibiotiques utilisée.

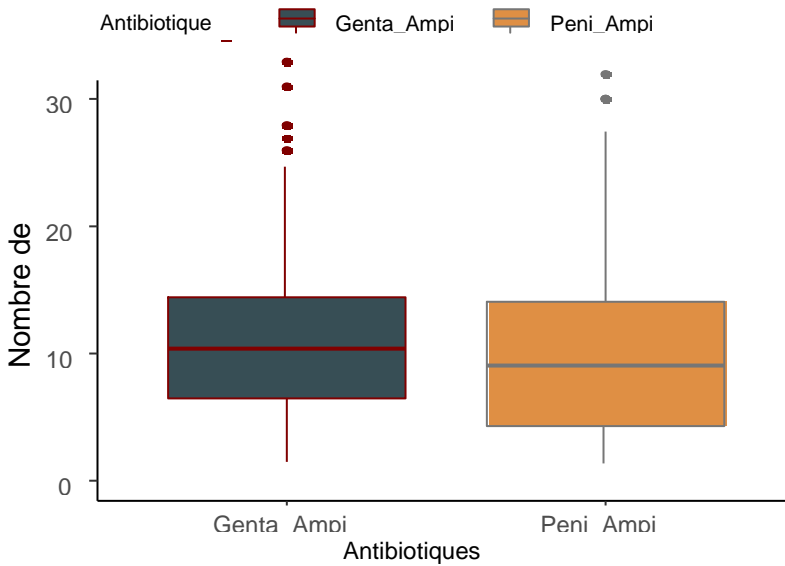


Figure 6 : Nombre moyen de CFU en fonction des combinaisons d'antibiotiques utilisés

II.2. Identification microscopique des colonies pures isolées

Les résultats de l'identification microscopique des colonies sont présentés par la figure 7. L'analyse microscopique des colonies, nous avons obtenu des colonies dont les caractéristiques microscopiques s'identifient aux champignons du genre *Metarhizium*. En comparant la proportion de colonies de *Metarhizium spp.* isolées, nous avons constaté qu'avec le milieu de culture "PDA + Gentamicine + Ampicilline", nous avons obtenu plus de colonies par microscopie (93,1% ; 349/375) comparativement au milieu "PDA + Pénicilline + Ampicilline" (65,3% ; 124/190) (**p-value = 2,2e-16**).

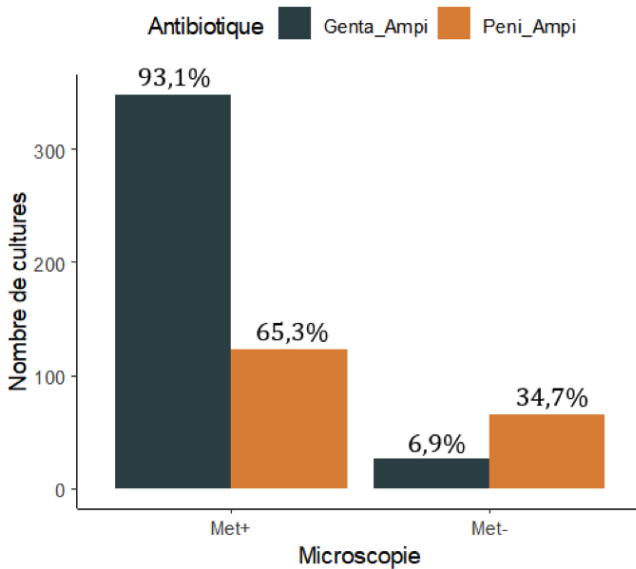
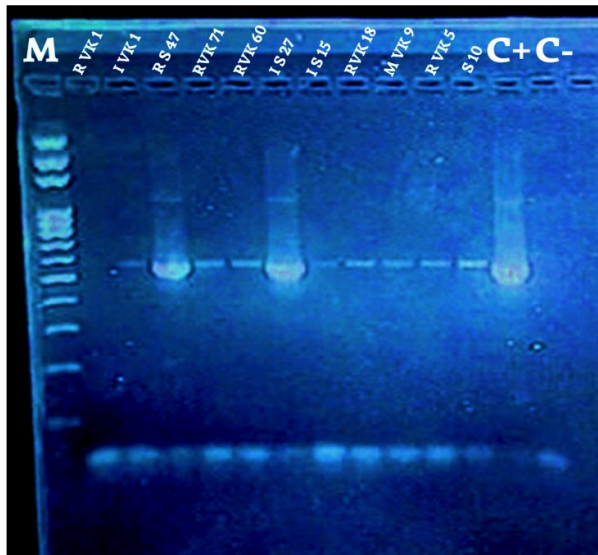


Figure 7 : Nombre d'isolats de *Metarhizium* spp. obtenu par identification microscopique en fonction du milieu sélectif utilisé.

II.3. Identification moléculaire des champignons du genre *Metarhizium* spp. isolés de la rhizosphère et des insectes

Pour un total de 50 échantillons de champignons présentant les caractéristiques microscopiques du *Metarhizium* spp. soumis à l'analyse PCR, nous avons obtenu 36 isolats positifs à l'amplification de la région ITS, soit une prévalence du genre *Metarhizium* de 72 %. La taille des bandes était attendue à 550 paires de bases. La répartition en fonction du type d'échantillon a été comme suit : 42% (15/36) pour les insectes et 58% (21/36) pour la rhizosphère. La **figure 8** illustre le profil d'amplification de la région ITS des échantillons présentant les caractéristiques microscopiques de *Metarhizium* spp..



(M) Marqueur de poids moléculaire de 100 pb, (C+) Contrôle positif et (C-) Contrôle négatif

Figure 8 : Profil d'amplification de la région ITS de 11 isolats de *Metarhizium sp.*

III. Discussion

Performance des milieux sélectifs pour l'isolement des champignons *Metarhizium spp.*

Le milieu "PDA + Gentamicine + Ampicilline" était le milieu le plus efficace dans l'inhibition de la croissance bactérienne. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les antibiotiques combinés aient des spectres d'action différents ce qui aurait eu pour effet un élargissement des groupes de bactéries ciblées par la combinaison. La Gentamicine est un antibiotique bactéricide de la famille des aminoglycosides ou aminosides de même que la streptomycine. Cette famille d'antibiotiques est efficace contre les bacilles Gram négatif, les bacilles Gram positif et les staphylocoques méticilline-sensibles (YALA *et al.*, 2001). Par contre, l'ampicilline est un antibiotique de la famille des Bêta-lactamines de même que la pénicilline. Le spectre d'action des Bêta-lactamines est étroit et inclut les cocci gram positif, les cocci gram négatif et quelques bacilles gram négatif (YALA *et al.*, 2001). L'efficacité moindre du milieu PDA + Pénicilline + Ampicilline pourrait être dû au fait que les 2 antibiotiques soient de la même famille (celle des Bêta-lactamines), donc ayant approximativement le même

spectre d'action ; ce qui rend leur combinaison sans valeur ajoutée car le spectre d'action reste le même au lieu de s'étendre à d'autres groupes de bactéries. L'utilisation d'antibiotiques pour l'isolement des champignons n'est pas une pratique nouvelle et les auteurs ne tarissent pas d'idées pour tenter de réprimer la croissance bactérienne. Ainsi, (BENSERRADJ *et al.* MIHOUBI, 2014), pour l'isolement de *Metarhizium* spp. ont additionné de la streptomycine aux milieux de culture à une concentration de 50 µg/l afin d'inhiber la croissance bactérienne. Aussi, WYREBEK *et al.* (2011), pour l'isolement de *Metarhizium* spp. ont additionné du chloramphénicol aux milieux de culture à une concentration de 0,2g/l. En plus, Bilgo *et al.*, en 2018 ont isolé les souches fongiques sur milieu sélectif PDA + CTAB + Chloramphénicol. Bien qu'ayant utilisé des antibiotiques différents des nôtres pour la préparation de leurs milieux de culture sélectifs, BENSERRADJ *et al.* MIHOUBI, 2014 ; WYREBEK *et al.*, 2011 et BILGO *et al.*, 2018 ont réussi à inhiber la croissance bactérienne.

Identification microscopique des colonies pures de champignon

Par microscopie, nous avons obtenu un total de 473 isolats de *Metarhizium* spp. provenant à la fois des échantillons de la rhizosphère et des insectes. Bien que le *Metarhizium* soit un champignon abondant et ubiquitaire, ce nombre est tout de même élevé au regard de la taille de notre échantillon. La non spécificité de la méthode microscopique pour l'identification de ce champignon pourrait en être la raison. En effet, le *Metarhizium* présente de nombreuses similitudes morphologiques avec d'autres genres de champignons tels que le *Fusarium*, le *Trichoderma*. Ces champignons sont morphologiquement proches du *Metarhizium* ; leur distinction par la microscopie nécessite un microscopiste expérimenté. D'autre part, les caractéristiques morphologiques des spores de *Metarhizium* peuvent varier dépendamment des conditions environnementales et physiologiques auxquelles ils sont soumis (BISCHOFF *et al.*, 2009).

Identification moléculaire des isolats de *Metarhizium* spp. en fonction des hôtes

L'amplification de la région ITS des échantillons nous a permis d'obtenir 36 isolats de *Metarhizium* spp.. Ce résultat confirme que la région ITS est une région conservée dans le règne des fungi. En mycologie, la région ITS de l'unité de répétition ribosomique nucléaire est la région la plus couramment séquencée pour les requêtes de taxonomie au niveau du genre et de l'espèce (FELINER *et al.* ROSSELO

2007), cela pour sa très grande spécificité. KOUADIO *et al.* (2018), pour l'isolement d'échantillons de *Metarhizium spp.* collectés dans les bananerais dans le Sud de la Côte d'Ivoire ont utilisé les amorces universelles ITS1 et ITS4 pour amplifier la même région de l'Espaceur Transcriptionnel Interne. Aussi, la différence des proportions d'isolats issus des insectes et de la rhizosphère n'était pas statistiquement significative. Les champignons du genre *Metarhizium spp.* sont présents aussi bien chez les insectes que dans la rhizosphère à des proportions comparables. Cela confirme que les champignons du genre *Metarhizium spp.* mènent deux modes de vie et qu'ils n'ont pas de mode de vie préférentiel. En effet ils sont soit des pathogènes d'insectes ou des endophytes bénéfiques des plantes.

Conclusion

Notre étude avait pour but l'optimisation de la technique d'isolement des champignons entomopathogènes du genre *Metarhizium* inféodés à la rhizosphère et aux insectes dans l'Ouest du Burkina. Au terme de cette étude, nous avons isolé 15 isolats de *Metarhizium* inféodés aux insectes et 21 isolats inféodés à la rhizosphère dans 2 localités à savoir Bama et Soumousso. Il ressort aussi que le milieu sélectif " PDA + Gentamicine + Ampicilline" est le plus adapté pour l'isolement de ces champignons. La combinaison de l'identification macroscopique, microscopie et moléculaire s'avère nécessaire dans le processus d'isolement des champignons entomopathogènes du genre *Metarhizium*. En perspectives, nous envisageons : de déterminer la diversité en termes d'espèces de *Metarhizium* en fonction de l'hôte (rhizosphère et insectes) pour les 36 isolats obtenus au cours de cette étude ; de caractériser la présence des gènes MAD1 et MAD2 qui sont des gènes grâce auxquels les champignons *Metarhizium spp.* adhèrent respectivement à la cuticule des insectes et aux racines des plantes. De comparer la pathogénicité des espèces exprimant les gènes MAD1 et MAD2, contre les vecteurs du paludisme ; d'évaluer la pathogénicité des espèces exprimant les gènes MAD1 et MAD2 en synergie avec un insecticide chimique utilisé en lutte Antivectorielle, « la deltaméthrine ».

Remerciement

Cette étude a été financée par la subvention Wellcome Trust, réf. 218771/Z/19/Z, dans le cadre du Partenariat NIHR-Wellcome pour la recherche en santé mondiale, ainsi que par la subvention ARISE PP-

FA-143, financée par l'Union européenne et mise en œuvre par l'Académie Africaine des Sciences en partenariat avec la Commission de l'Union Africaine et la Commission européenne.

Conflit d'intérêt

Tous les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt.

Contribution des auteurs

E.B. et A.D. ont conçu l'étude. D.L.L., W.A.S. et E.B. ont mené les expériences. D.L.L., W.A.S. et E.B. ont analysé les données. E.B. a obtenu le financement et dirigé le projet. Tous les auteurs ont rédigé le manuscrit. Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale du manuscrit.

Références bibliographiques

BENSERRADJ, O., & MIHOUBI I. 2014. Larvicidal Activity of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* Against Mosquito Larvae in Algeria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(1): 54-62.

BILGO E. 2024. The Unseen Battle: Interpreting the 2023 World Malaria Report from Burkina Faso's Frontlines. *Malaria Journal* 23(1): 191.

BILGO E., LOVETT B., ST LEGER R.J., SANON A., DABIRÉ R.K., & DIABATÉ A., 2018. Native Entomopathogenic *Metarhizium* spp. from Burkina Faso and Their Virulence Against the Malaria Vector *Anopheles coluzzii* and Non-target Insects. *Parasites and Vectors* 11(1): 209.

BISCHOFF J.F., REHNER S.A. & HUMBER R.A., 2009. A Multilocus Phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* Lineage. *Mycologia* 101(4): 512-530.

DIABATE A., YARO A.S., DAO A., DIALLO M., HUESTIS D.L. & LEHMANN T., 2011. Spatial Distribution and Male Mating Success of *Anopheles gambiae* Swarms. *BMC Evolutionary Biology* 11: 184.

DRIVER F., MILNER R.J. & TRUEMAN J.W.H., 2000. A Taxonomic Revision of *Metarhizium* Based on a Phylogenetic Analysis of rDNA Sequence Data. *Mycological Research* 104(2): 134-150.

FELINER G.N. & ROSSELO J.A., 2007. Better the Devil You Know? Guidelines for the Use of nrDNA ITS in Species-level Evolutionary Studies in Plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44(2): 911-919.

HEMINGWAY J. RANSON H., MAGILL A., KOLACZINSKI J., FORNADEL C., GIMNIG J., COETZEE M., SIMARD F., DABIRE K.R., HINZOUNBE C.K., PICKETT J., SCHELLENBERG D., GETHING P., HOPPÉ M. & HAMON N., 2016. Averting a Malaria Disaster: Will Insecticide Resistance Derail Malaria Control? *The Lancet* 387(10029): 1785-1788.

JARONSKI S.T., & JABBOUR R., (2000). Optimizing Nutritional Conditions for Production of the Insect-pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(3): 425-430.

KOUADIO D.L.M., ABY N., ABO K., KOUADJO C.Z., KOBENAN K., TRAORE S. & GNONHOURI P., 2018. Characterisation of Local Isolates of *Metarhizium* spp., an Entomopathogenic Fungus of *Cosmopolites sordidus* Germar, Isolated from Banana Plantations in Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal* 14(21): 73-73..

MAUCLINE T.H., MALONE J.G., KIRBY J.R. & LLOYD D.G. 2013. Rhizosphere Signalling: *Metarhizium* as a Model System. *Advances in Microbial Physiology* 62: 77-114.

SASAN R.K. & BIDOCHKA M.J. 2012. The Insect-pathogenic Fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an Endophyte that Stimulates Plant Root Development. *American Journal of Botany* 99(1): 101-107.

SCHOLTE E.J., KNOLS B.G., SAMSON R.A. & TAKKEN W. 2004. Entomopathogenic Fungi for Mosquito Control: A Review. *Journal of Insect Science* 4: 19..

ST LEGER, R.J., FRANK D.C., ROBERTS D.W. & STAPLES R.C., 1992. Molecular Cloning and Regulatory Analysis of the Cuticle-degrading Protease Structural Gene from the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *European Journal of Biochemistry* 204(3): 991-1001.

WORLD MALARIA Report 2022. World Health Organization. Retrieved from: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022> (10 December 2022).

WYREBEK M., HUBER C., SASAN R.K. & BIDOCHKA M.J., 2011. Three Sympatrically Occurring Species of *Metarhizium* Show Plant Rhizosphere Specificity. *Microbiology* 157(10): 2904-2911.

YALA D., MERAD A.S., MOHAMEDI D. & OUAR KORICH M.N., 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques, *Médecine du Maghreb* n°91.

ZIMMERMANN G., 2007. Review on Safety of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 17(9): 879-920.