



Disponible en ligne sur

ASJP
Algerian Scientific Journal Platform

<https://www.asjp.cerist.dz/en/PresentationRevue/436>



ARTICLE ORIGINAL

Adaptation et évaluation d'un milieu de culture à base de levure pour *Corynebacterium diphtheriae* toxinogène

Adaptation and evaluation of a yeast-based culture medium for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*

Bouchra Imane ADJEB^{a,b}, Mohamed Safouane BENAZZOUZ^{a,b}, Isghi NAIT SAADA^c, Souad BELLACHE^c, Redouene Sidahmed BENAZZOUZ^d, Mourad ISSAD^e, Fawzi DERRAR^{e,f}.

^a Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université des Sciences de la Santé, Alger, Algérie.

^b Laboratoire des Sérums Thérapeutiques, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie.

^c Département des Réactifs de Laboratoire, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie.

^d Faculté de Médecine de Laghouat, Université Amar Telidji, Laghouat, Algérie.

^e Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie.

^f Faculté de Médecine d'Alger. Université d'Alger 1, Algérie.

MOTS CLÉS

Corynebacterium diphtheriae ;

Diphthérie ;

Milieu de culture ;

Antitoxine diphtérique.

Résumé

Introduction : La diphtérie connaît une réémergence en Algérie. Sa prise en charge repose sur l'antitoxine diphtérique (ATD), dont les contraintes d'approvisionnement soulignent la nécessité d'entreprendre sa production nationale. La culture de *Corynebacterium diphtheriae* constitue une étape clé dans la production de l'ATD, mais les milieux de culture conventionnels restent coûteux et peu accessibles.

Méthodes : Afin d'explorer et d'optimiser un milieu de culture alternatif, la souche toxigène NCTC 10648 a été cultivée dans un milieu préparé à partir d'une décoction de levure enrichie en protéose peptone et en sel marin. Après réactivation et rajeunissement, deux essais consécutifs ont été réalisés pour évaluer la capacité du milieu à soutenir la croissance bactérienne.

Résultats : Le milieu étudié a permis une croissance satisfaisante de *C. diphtheriae* NCTC 10648, comme en témoigne le développement précoce d'un voile bactérien, tant lors de l'essai préliminaire qu'en culture à plus grande échelle.

Conclusion : Les résultats de cette étude suggèrent que le milieu de culture étudié pourrait constituer une alternative prometteuse aux milieux conventionnels, tout en ouvrant des perspectives d'optimisation et de

standardisation en vue d'applications ultérieures dans la production du sérum antidiphtérique.

© 2026 Journal Algérien de Pharmacie. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Corynebacterium

diphtheriae;

Diphtheria;

Culture medium;

Diphtheria antitoxin.

Abstract

Introduction: Diphtheria is reemerging in Algeria. Its medical management relies on diphtheria antitoxin (DAT), whose supply constraints emphasize the need to establish national production. The culture of *Corynebacterium diphtheriae* is a key step in DAT production, but conventional culture media remain costly and poorly accessible.

Methods: To explore and optimize an alternative culture medium, the toxinogenic strain NCTC 10648 was grown in a medium prepared from a yeast decoction enriched with proteose peptone and sea salt. After reactivation and rejuvenation, two consecutive experiments were conducted to evaluate the medium's ability to support bacterial growth.

Results: The tested medium supported satisfactory growth of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 10648, as evidenced by the early formation of a broth turbidity, both in the preliminary experiment and in larger-scale cultures.

Conclusion: The results of this study suggest that the culture medium under investigation could represent a promising alternative to conventional media, while also opening avenues for optimization and standardization for future applications in diphtheria antitoxin production.

© 2026 Algerien Journal of Pharmacy. All rights reserved.

* Auteur correspondant : Bouchra Imane ADJEB

Adresse e-mail : adjebbouchraimane31@gmail.com (B.I. ADJEB)

Introduction

La diphtérie est une maladie infectieuse aiguë et contagieuse, causée principalement par des souches toxigènes de *Corynebacterium diphtheriae*, capables de produire la toxine diphtérique (DTx), responsable des formes graves de la maladie [1-4]. Bien que largement contrôlée par la vaccination, la diphtérie connaît une réémergence préoccupante dans plusieurs régions du monde, y compris en Algérie, où plus de 900 cas suspects et 119 décès ont été recensés dans le Sud du pays en 2024, tandis qu'en octobre 2025, 8 cas confirmés et 2 décès ont été signalés parmi 13 cas suspects dans la wilaya de Skikda [5]. La sérothérapie antidiphtérique représente l'élément majeur du traitement curatif de la diphtérie [6]. Cependant, le sérum antidiphtérique (SAD), systématiquement importé en Algérie, reste coûteux, et parfois difficilement accessible en situation d'urgence, en raison de sa disponibilité limitée à l'échelle mondiale, avec un nombre restreint de fabricants et des ruptures d'approvisionnement signalées dans plusieurs pays [7-9], ce qui souligne la nécessité de renforcer les capacités nationales de production.

La culture de *Corynebacterium diphtheriae* représente une étape clé dans toute stratégie visant le développement d'un sérum antidiphtérique. Classiquement, elle repose sur des milieux

complexes d'origine biologique, souvent obtenus par digestion enzymatique de tissus animaux et enrichis par des facteurs de croissances essentiels [10]. Bien que ces milieux permettent une croissance satisfaisante, leur composition non définie, leur variabilité, la multiplicité des étapes de préparation, ainsi que le coût et la disponibilité restreinte de certains composants, limitent leur accessibilité, leur standardisation et leur reproductibilité. Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté l'utilisation de milieux semi-synthétiques, incluant des hydrolysats protéiques standardisés, tels que N-Z Amine ou N-Z-Case Plus, enrichis en maltose, lactate de sodium, L-cystine, sulfate de fer ainsi que le facteur de croissance de Mueller. Ces formulations ont permis d'obtenir une croissance bactérienne satisfaisante tout en améliorant la standardisation des conditions de culture [11-13]. Toutefois, ces milieux demeurent souvent coûteux et dépendent de composants importés, ce qui constitue également une contrainte majeure, en particulier dans des contextes à ressources limitées ou en phase de recherche.

Dans ce contexte, le présent travail visait à explorer et optimiser un milieu de culture alternatif, économiquement accessible et facilement reproductible, apte à soutenir efficacement la croissance des souches toxigènes de *Corynebacterium diphtheriae*, tout en réduisant la

dépendance aux milieux coûteux importés et aux composants d'origine animale.

Matériel et méthodes

Préparation du milieu de culture

Le bacille diphtérique a été cultivé dans un milieu à base de levure, préparé selon la méthode décrite par Spronck [14]. Pour ce faire, 250 g de levure de boulangerie sèche active instantanée (*Saccharomyces cerevisiae*) ont été pesés puis dissous dans 2,5 litres d'eau distillée. Le mélange a été porté à ébullition pendant 20 minutes sous agitation continue à l'aide d'un agitateur magnétique chauffant.

La décoction obtenue a ensuite été versée dans un Erlenmeyer, puis laissée au repos pendant 24 heures. Au terme de ce temps, la levure s'est déposée au fond du récipient, tandis qu'un liquide trouble est resté en surface ; ce dernier a été décanté. À ce liquide trouble ont été ajoutés, par litre, 5 g de sel marin et 20 g de protéose peptone (Oxoid, LP0085).

Le milieu a été neutralisé à l'aide d'une solution normale de soude (NaOH à 40 g/L), puis 7 mL de cette solution ont été ajoutés par litre pour atteindre un pH final avoisinant 7,4, conformément aux données de la littérature [14,16,17]. Il a ensuite été légèrement chauffé à 38 °C pendant 5 minutes, puis filtré à l'aide d'un papier filtre de porosité 0,45 µm. Le milieu filtré a été réparti dans des flacons de 500 mL, à raison de 200 mL par flacon, ainsi que dans des tubes à vis, à raison de 10 mL par tube, puis stérilisé à 120 °C pendant 20 minutes à l'autoclave.

Évaluation de la toxinogénèse de la souche *C. diphtheriae* NCTC 10648

Un test d'Elek (technique d'immunodiffusion) a été réalisé, conformément au protocole du Laboratoire de bactériologie médicale et de surveillance de la résistance aux antibiotiques de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), afin d'évaluer la toxinogénèse de la souche *C. diphtheriae* NCTC 10648 (biotype gravis). Ce test repose sur une réaction d'immunoprécipitation entre la toxine diphtérique produite par la souche toxigène et l'antitoxine diphtérique diffusée à partir d'un disque central sur gélose d'Elek. Après incubation à 37 °C pendant 24 à 48 h, l'apparition d'une ligne de précipitation témoigne de la production de toxine [15].

La souche de référence NCTC 10648, utilisée comme témoin positif au laboratoire, a été testée parallèlement à une souche non toxigène (NCTC 10356, biotype belfanti) et à deux souches cliniques isolées de patients diphtériques, afin de confirmer la conservation de son pouvoir

toxigène à l'issue des cycles de décongélation des suspensions bactériennes cryoconservées.

Inoculation et incubation du bacille diphtérique

Un essai préliminaire a été réalisé afin d'évaluer la capacité de *Corynebacterium diphtheriae* à se développer dans le milieu de culture étudié et de valider les conditions expérimentales avant une mise en culture à plus grande échelle. La souche NCTC 10648, conservée sous forme de suspension cryogénique, a été réactivée sur milieu de Loeffler et incubée à 35 °C pendant 24 h, puis rajeunie par repiquage sur sérum coagulé et incubée à 37 °C pendant 18 h afin d'obtenir une culture jeune et métaboliquement active (figure 1) [14].



Figure 1. Aspect macroscopique des colonies de *C. diphtheriae* NCTC 10648 sur sérum coagulé (18 h, 37 °C).

Une anse prélevée à partir de cette culture a été inoculée dans 10 mL de décoction de levure peptonisée (figure 2), puis incubée à 35 °C pendant 24 h dans des tubes maintenus entrouverts pour assurer une aération adéquate [14, 16, 17].

Parallèlement, la souche non toxigène *C. diphtheriae* NCTC 10356 a été cultivée selon le même protocole, et un tube témoin contenant 10 mL de ce milieu a été incubé sans inoculum afin de vérifier la stérilité et l'absence de toute croissance non spécifique.

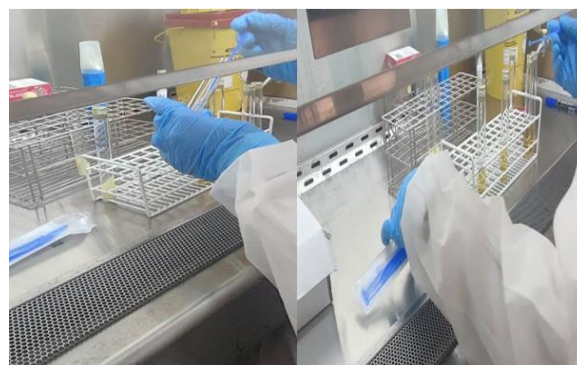


Figure 2. Repiquage de *C. diphtheriae* NCTC 10648 à partir de sérum coagulé sur le milieu de culture testé.

Dans le cadre de l'essai principal, la culture de *C. diphtheriae* NCTC 10648 obtenue après 24 h d'incubation lors de l'essai préliminaire a servi d'inoculum pour la mise en culture à plus grande échelle. Après homogénéisation de la suspension bactérienne, 0,4 mL ont été transférés dans des tubes coniques stériles de 50 mL contenant chacun 40 mL de décoction de levure peptonisée stérile. Les tubes ont été laissés entrouverts et incubés à 35 °C pendant six jours [14, 17].

Contrôles *in process* de la pureté des cultures

La pureté des cultures a été vérifiée en préparant des plaques d'agar à partir de chaque tube de culture. Une anse de culture a été transférée sur le milieu d'agar, puis les plaques ont été incubées à 35 °C pendant 40 h [17].

Les cultures étaient considérées pures lorsque toutes les colonies présentaient l'aspect attendu pour des bacilles de diphtérie toxigènes. L'apparition de colonies présentant forme, couleur ou taille différentes indiquait une contamination [16].

Résultats

Évaluation de la toxinogénèse de la souche *C. diphtheriae* NCTC 10648

Le test d'Elek a révélé une formation nette de lignes de précipitation à l'interface entre la toxine produite par la souche NCTC 10648 et l'antitoxine diphtérique. Les deux souches cliniques provenant de patients diphtériques ont également montré ces lignes caractéristiques, tandis que la souche non toxigène NCTC 10356, témoin négatif, n'en a présenté aucune (figure 3).

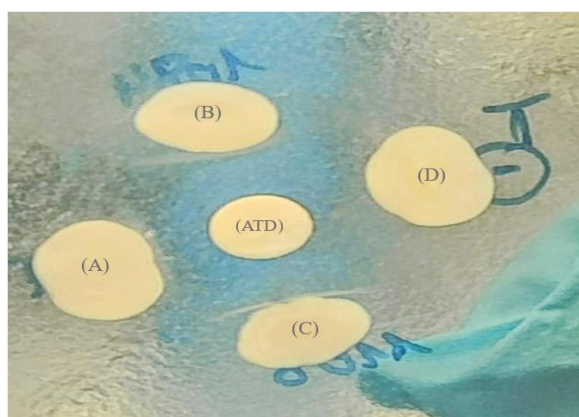


Figure 3. Résultats du test d'Elek

(A) Souche toxigène *C. diphtheriae* NCTC 10648. (B, C) Deux souches cliniques provenant de patients diphtériques. (D) Souche non toxigène *C. diphtheriae* NCTC 10356. (ATD) Antitoxine diphtérique.

Évaluation de la croissance de *C. diphtheriae* dans le milieu de culture testé

À l'issue de l'essai préliminaire, un voile bactérien a été observé à la surface du milieu dans les tubes inoculés avec la souche NCTC 10648. En revanche, les tubes contenant la souche NCTC 10356 ont présenté un trouble du milieu sans formation de voile bactérien. Le tube témoin stérile est resté limpide durant toute la période d'incubation (figure 4).

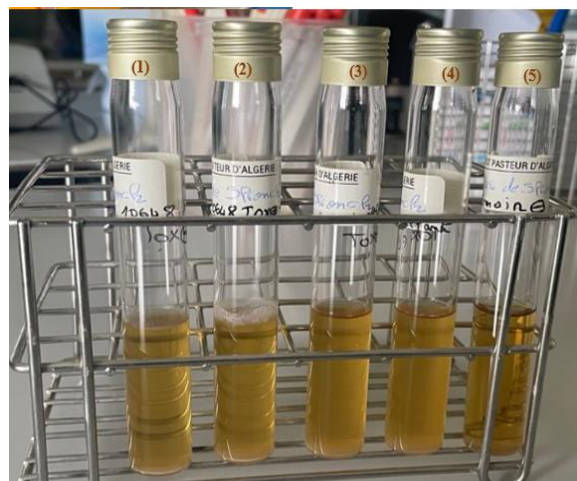


Figure 4. Aspects macroscopiques du milieu de culture après 24 h d'incubation à 35 °C, avec ou sans inoculum.

Tubes 1–2 : souche toxigène *C. diphtheriae* NCTC 10648 ; 3–4 : souche non toxigène *C. diphtheriae* NCTC 10356 ; 5 : milieu stérile sans inoculum.

Lors de l'essai principal réalisé à plus grande échelle, un voile bactérien a également été observé dès les premières 24 heures d'incubation dans l'ensemble des tubes inoculés avec la souche *C. diphtheriae* NCTC 10648 (figure 5).

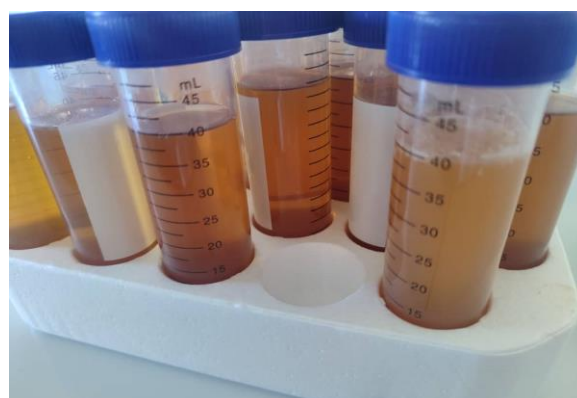


Figure 5. Aspect macroscopique des cultures de *C. diphtheriae* NCTC 10648 après 24 h d'incubation à 35 °C.

Discussion

Les résultats de cette étude permettent d'évaluer la validité des approches expérimentales adoptées ainsi que la capacité du milieu étudié à soutenir la

croissance de *Corynebacterium diphtheriae*, en comparaison avec les données de la littérature.

Le test d'Elek a permis de confirmer le caractère toxinogène de la souche *C. diphtheriae* NCTC 10648. L'apparition de lignes de précipitation nettes dans la zone d'interaction entre la toxine produite et l'antitoxine diphtérique indique une expression active de la DTx. Ce résultat est conforme aux caractéristiques attendues d'une souche toxinogène, justifie son emploi dans un protocole expérimental de biosynthèse et concorde avec les données de la littérature, qui décrivent la fiabilité du test d'Elek comme méthode de référence pour la détection qualitative de la toxine diphtérique [15].

Les résultats de l'essai préliminaire ont permis de confirmer la stérilité du milieu et la fiabilité des conditions expérimentales, comme l'indique la limpidité du tube témoin. Le trouble du liquide observé pour la souche non toxinogène NCTC 10356, sans formation de voile bactérien, reflète une croissance limitée, suggérant que le milieu testé est préférentiellement favorable aux souches toxinogènes.

La croissance satisfaisante de *C. diphtheriae* NCTC 10648 dans le milieu expérimental à base de levure *Saccharomyces cerevisiae* confirme l'efficacité de ce support nutritif, tel que décrit dans le protocole de Spronck [14]. Le développement précoce d'un voile bactérien à la surface du milieu, dès les premières 24 heures, aussi bien lors des essais préliminaires qu'en culture à plus grande échelle, est en accord avec les observations classiques décrites dans les protocoles de production de toxine [14, 17]. Ces résultats indiquent une bonne adaptation de la souche toxinogène testée aux conditions expérimentales et suggèrent que ce milieu pourrait constituer une alternative intéressante aux milieux conventionnels, plus coûteux, notamment pour des essais à échelle expérimentale ou dans des contextes de ressources limitées.

Toutefois, dans une perspective d'optimisation et de standardisation, l'intégration d'une évaluation quantitative de la croissance bactérienne par des méthodes spectrophotométriques, telles que celles rapportées par Koneru et Settaluri [11], constituerait un complément pertinent à l'approche macroscopique.

Il est également important de souligner qu'une croissance abondante de *C. diphtheriae* ne garantit pas nécessairement une production élevée de toxine, comme l'ont montré Park et Williams [17]. Dans ce contexte, la littérature préconise le recours aux bioréacteurs pour optimiser les paramètres déterminants de la production de DTx, notamment l'aération, l'agitation, le pH et la température [10,13,22]. Dans la présente étude, l'absence de tels

systèmes n'a pas permis un contrôle précis de ces paramètres, limitant ainsi la probabilité d'une production significative de toxine.

En conséquence, l'évaluation *in vivo* du pouvoir létal chez le cobaye [14,16,18], ainsi que le titrage *in vitro* par le test de floculation (titrage de Ramon) [11,19-21], n'étaient pas envisageables à ce stade de l'étude, en raison de conditions de culture sous-optimales et de contraintes matérielles.

Ces résultats suggèrent que des travaux ultérieurs, réalisés dans des conditions de fermentation mieux contrôlées, seraient utiles pour optimiser la production et la caractérisation de la toxine diphtérique.

Conclusion

Face à la réémergence préoccupante de la diphtérie en Algérie, l'antitoxine diphtérique demeure le traitement de référence. Toutefois, sa dépendance à l'importation rend son approvisionnement coûteux et parfois tardif.

La mise au point d'un milieu de culture performant pour *Corynebacterium diphtheriae* constitue un prérequis essentiel à la production d'un sérum antidiphtérique. Les résultats de cette étude montrent que le milieu de culture évalué permet une croissance satisfaisante de *Corynebacterium diphtheriae* toxinogène, suggérant qu'il pourrait constituer une alternative pertinente aux milieux conventionnels.

Néanmoins, son optimisation et sa standardisation nécessitent des investigations complémentaires, intégrant des approches quantitatives de la croissance bactérienne, le recours à des systèmes de fermentation contrôlés, ainsi qu'une évaluation qualitative et quantitative de la production de la toxine.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt.

Remerciements

L'ensemble du matériel utilisé dans le cadre de cette étude a été fourni par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

Les travaux ont été réalisés au sein du Département des Réactifs de Laboratoire et du Laboratoire de Bactériologie Médicale et de Surveillance de la Résistance aux Antibiotiques de l'IPA, où la collaboration scientifique du Pr H. Tali Maamar, Cheffe de service dudit laboratoire, ainsi que l'assistance technique de l'ensemble de l'équipe du laboratoire, sont vivement reconnues.

Références bibliographiques

1. HCSP. Conduite à tenir lors de l'apparition d'un cas de diphtérie : rapport du groupe de travail [Internet]. Paris : Haut Conseil de la santé publique; 2011 Mar 4 [cité 2025 Jun 15]. Available from: <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportdomaine?clefr=215>.
2. Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, Tzinslering VA, Yakovlev AA. The pathology of diphtheria. *J Infect Dis.* 2000;181(Suppl 1):S116–S120.
3. Zakikhany K, Efstratiou A. Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future Microbiol.* 2012;7(5):595–607.
4. Ilyas S, Yousafzai ZA, Khan I, Amin QK, Bilal M. The dual threat of diphtheria: increasing awareness of cardiac complications for better intervention. *Cureus.* 2024;16(3):e56093.
5. World Health Organization. Disease Outbreak News: Diphtheria – African Region (AFRO) [Internet]. 2025 Nov 21 [cited 2026 Jan 19]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/DON588>
6. Keller M, Stiehm ER. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):602–14.
7. Institut Pasteur d'Algérie. Avis d'Appel d'Offres International Ouvert avec Exigence de Capacités Minimales N°10/2021 NIF: 000016001381120 [Internet]. 2021 [cited 2026 Jan 19]. Available from: <https://www.pasteur.dz/fr/appels-d-offres-pasteur-algerie/396-avis-d-appel-d-offres-international-ouvert>
8. World Health Organization. Diphtheria vaccines: WHO position paper – August 2017. *Weekly Epidemiological Record* [Internet]. 2017 Aug 4 [cited 2025 Jul 11];92(31):417–36. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/diphtheria-vaccines-who-position-paper-august-2017>
9. Prygiel M, Mosiej E, Wdowiak K, Zasada AA. Immunisation passive dans le traitement des maladies infectieuses liées à des toxines bactériennes très puissantes. *Biomedicines.* 2024;12(12):2920.
10. Sundaran BS, Rao YUB, Boopathy R. Process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation. *J Biosci Bioeng.* 2001;91(2):123–128.
11. Koneru RK, Settaluri VS. Optimization of semisynthetic media components for intensive *Corynebacterium Diphtheriae* growth and toxin production. *Current Trends Biotechnol Pharm.* 2023;17(4):1438–1447.
12. Mueller JH, Miller PA. Production of diphtheric toxin of high potency (100 Lf) on a reproducible medium. *J Immunol.* 1941;40:21–32.
13. Chung YJ, Lee JA, Jung MY, Lee SM, Kim TY, Choe YK, Kim IH. Optimization of diphtheria toxin production by *Corynebacterium diphtheriae* using a casein-based medium in a fermenter. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2016;21(4):537–543.
14. Spronck CHH. Préparation de la toxine diphtérique : suppression de l'emploi de la viande [communication présentée au Congrès international d'hygiène et de démographie, Madrid, avril 1898]. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1898;12:701–4.
15. Sharma NC, Efstratiou A, Mokrousov I, Mutreja A, Das B, Ramamurthy T. Diphtheria. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5:81.
16. Le Minor L, Véron M. *Corynebacterium diphtheriae*. In: *Bactériologie médicale*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 1982. p. 644–655.
17. Park WH, Williams AW. The production of diphtheria toxin. *J Exp Med.* 1896;1(1):164–85.
18. Duclaux E. Toxines et antitoxines. Constitution et mode d'union : Aperçu des recherches classiques sur la toxine et l'antitoxine diphtériques. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1930 Sep;44:341–6.
19. Coombes L, Rigsby P, Sesardic D, Stickings P. Collaborative study for the calibration of a replacement International Standard for diphtheria toxoid for use in flocculation test. *Biologicals.* 2016;44(6):556–66.
20. Duclaux E. Toxines et antitoxines. Constitution et mode d'union : Le phénomène de la flocculation dans les mélanges de toxine et d'antitoxine. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1930 Sep;44:346–64.
21. Bayne Jones S. The titration of diphtheria toxin and antitoxin by Ramon's flocculation method. *J Immunol.* 1924;9(6):481–504.
22. Dehottay PMH, Dessoy S, Laloux OMSG, Orval MRF. Fermentation process for the production of diphtheria toxin. [patent]. Washington, DC: United States Patent and Trademark Office; 2008. US20080193475A1.