



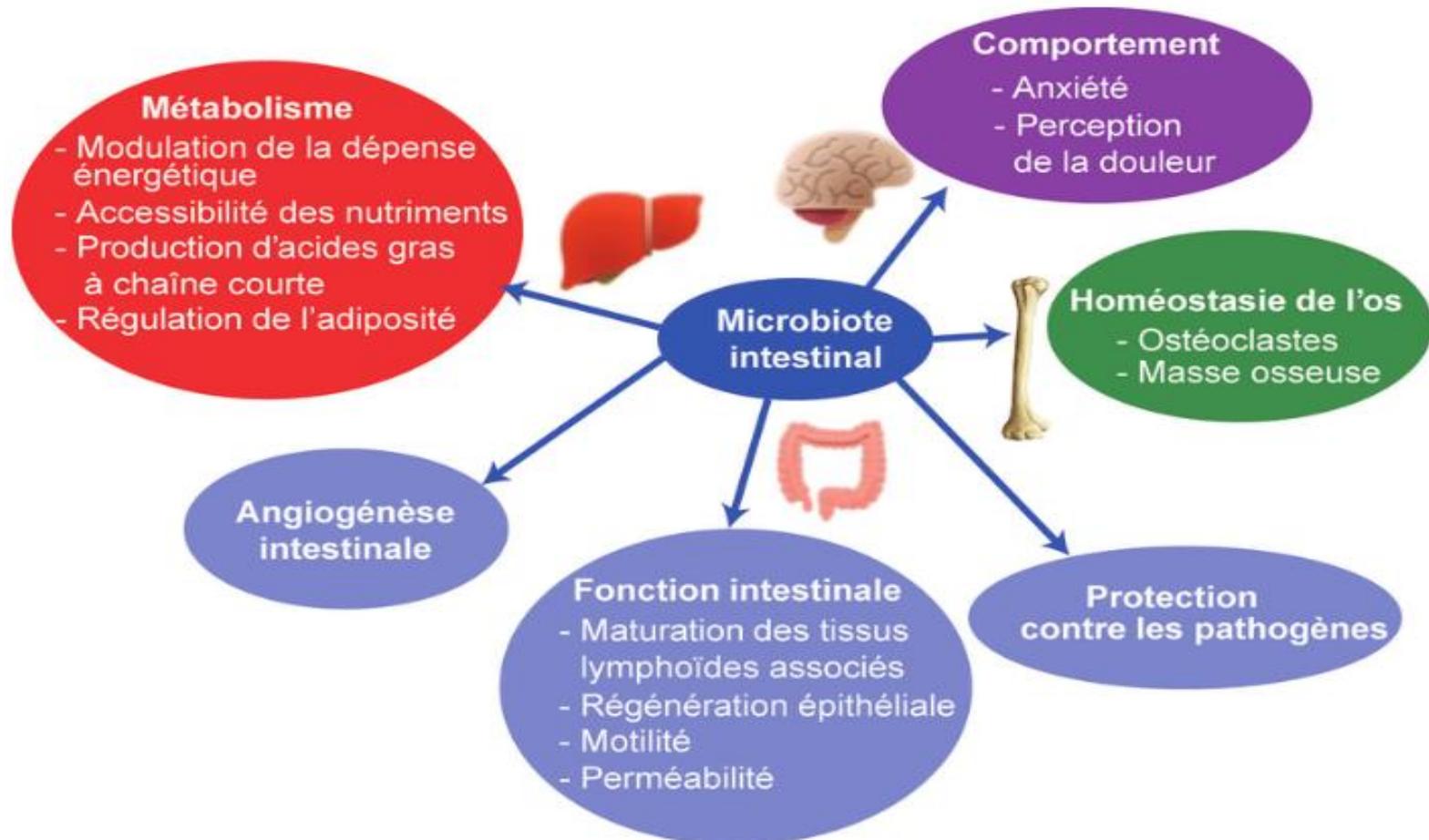
**Assistance Publique  
Hôpitaux de Marseille**

# Mise au point d'une forme orale (gélule) de microbiote fécal lyophilisé

Pr Stéphane HONORE  
Service Pharmacie  
Hôpital de la Timone

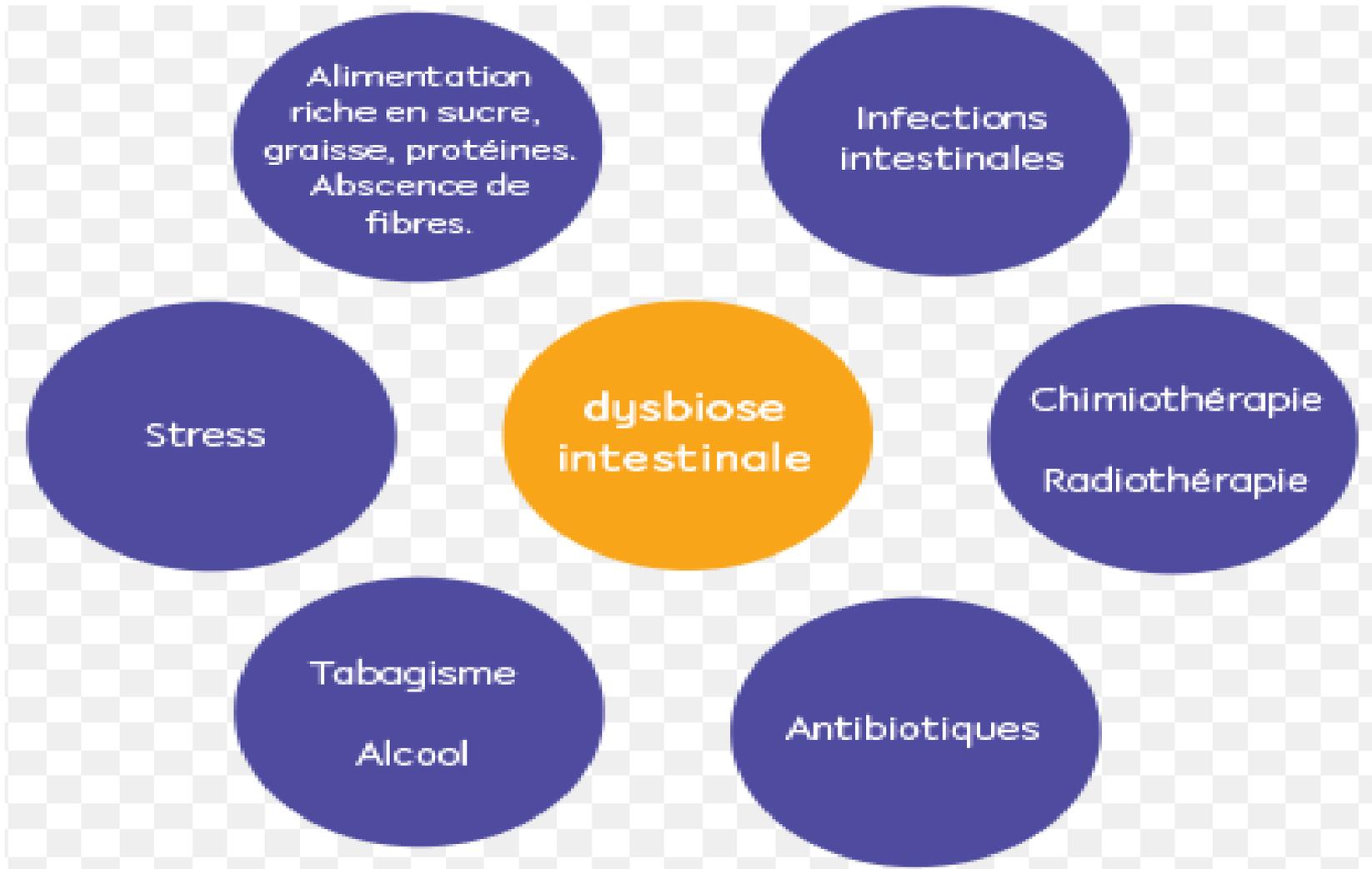
# Contexte

## Rôles du microbiote intestinal



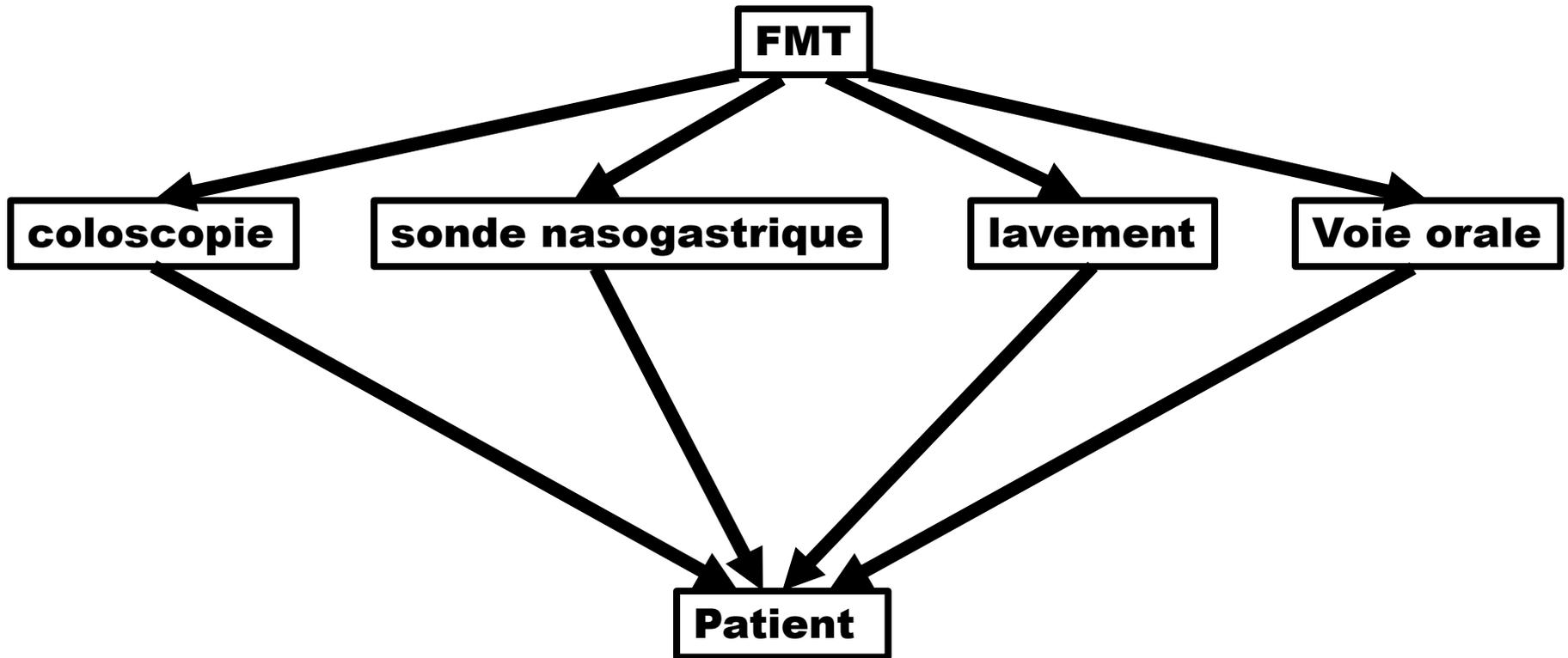
# Contexte

## La dysbiose intestinale



# Le microbiote: une thérapie médicamenteuse

Transplantation du microbiote fécal (FMT)



# Préparation du microbiote pour transplantation par voie nasogastrique ou lavement



Donneur de selles



50g de selles

Examens sur la selle  
congélation



Congélateur à -80°C

décongélation



Transplantation du microbiote fécal par sonde.



infusât de selles conditionné en seringue

mixage  
filtration



selles+NaCl

+ 250ml de NaCl 0,9%

**Dénombrement bactérien par culture**

# Objectif (s)

## **Produire des gélules de selles lyophilisées utilisables en pratique courante et dans le cadre des essais cliniques**

- Evaluation de l'impact de la congélation sur la population bactérienne dans les selles non prétraitées (pratique courante)
- Evaluation de l'impact direct de la lyophilisation sur la population bactérienne dans les selles fraîches
- Evaluation la stabilité microbienne dans les gélules de selles lyophilisées jusqu'à 30 jours dans différentes conditions de conservation: à  $-80^{\circ}\text{C}$ , à  $+4^{\circ}\text{C}$  et à la température ambiante.

# Matériels et méthodes

## **Donneurs et matière première utilisée**

Trois donneurs

Don d'aspect macroscopique normal.

Age compris entre 18 et 65 ans avec une IMC supérieur à 30.

Les donneurs des professionnels hospitaliers

Le don de matière fécale est validé après examen de différents paramètres : co-morbidités, traitements médicamenteux, situation à risque de contamination, contamination par des agents infectieux. La positivité d'un seul paramètre exclut automatiquement le don (et le donneur)

# Dépistage d'agents infectieux

Le dépistage d'agents infectieux se fait dans les selles et dans le sang du donneur.

Le dépistage se fait essentiellement par sérologie (VIH, Hépatite B et C), coproculture standard et orientée (*Clostridium difficile*, *Salmonella*..) et par PCR (Adénovirus, Astrovirus, parasites..).

Liste établie par l'ANSM

# Matériel et préparation du don

- Sous PSM dédié
- Après pesée, le don de matières fécales (30g) est homogénéisé dans **200 ml de NaCl 0,9%**, mixé avec un mixeur SEB® ULTRACOMPACT 450V et filtré 2 fois. Une fois avec un tamis grossier (avec pores de 2 mm) et une fois avec une passoire à thé.
- Après filtration, l'échantillon a été centrifugé à **5000g pendant 15 min**, le culot était alors conservé.
- Le culot est resuspendu dans un **milieu nutritif et protecteur** contenant 0,01% de CaCl<sub>2</sub> ; 0,01% de MgCl<sub>2</sub> ; 0,1% d'acide ascorbique ; 0,01 % de glutathion ; 10% de sucrose ; 5% de tréhalose ; 10% de lait en poudre pharmaceutique. Le pH du milieu a été ajusté à pH 7,3±0,2.
- Composés inscrits à la pharmacopée

# Lyophilisation

La suspension obtenue à partir du mélange culot-milieu nutritif/protecteur était répartie dans des pots à urine et petites fioles avant **d'être congelée à -80°C pendant 5 heures puis placée dans le lyophilisateur (DELTA 1-24 LSC-CHRIST) pour un cycle de 12h à 0°C puis 3h à +30°C en dessiccation primaire.**

**Poudre à l'aspect sec** permettant une **répartition optimale du lyophilisat dans les gélules** et dans l'objectif d'atteindre un nombre minimal de gélules pour 30g de selles fraîches.



# Mise en gélules

Le cycle de lyophilisation terminé, le lyophilisat est homogénéisé au mortier/pilon sous PSM

Le lyophilisat de 7g environ a ensuite été répartis dans **35 gélules de taille N°00, gastro résistantes, en hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC) de chez APPROPHARM®**

Gélulier manuel.

Conditionnement en pilulier

3 conditions de stockage distinctes : température ambiante, au réfrigérateur à +4 C° et au congélateur à -80°C.

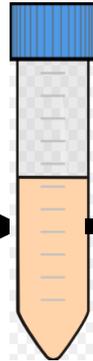
# Culture bactérienne

- Dénombrement bactérien par culture
- En *triplicata*
- Dilutions en cascade au 1/10<sup>e</sup> dans PBS sur 15 tubes (15x) à partir de l'échantillon original.
- Inoculation sur gélose COS (10 ul)
- Incubation aérobie et anaérobie à l'étuve à 37°C pd 48h
- Lecture

# Synthèse

30g de selles Fraiche +  
200ml de NaCl 0,9%

mixage  
filtration



centrifugation  
5000g/15min

culot +milieu  
nutritif/cryop  
rotecteur



Lyophilisation

7g de lyophilisat  
environ

Dénombrement  
bactérien par culture  
après 0, 15 et 30  
jours



0,07g environ

Dénombrement  
bactérien par culture

# Résultats

La congélation des selles fait perdre environ 95% des anaérobies

Dénombrement bactérien en log CFU/mL

	Anaérobies selle fraiche	Anaérobies selle décongelé	Aérobies selle fraiche	Aérobies selle décongelé
Selle A	9,3	9	6,2	6
Selle B	10	9	6,8	6,6
Selle C	11	9,3	6,3	6,3
Moyenne	<b>10,5</b>	<b>9,1</b>	<b>6,43</b>	<b>6,3</b>

-Perte de 1,4 log CFU/mL de bactéries anaérobies=95% environ  
-Les patients guérissent avec 5% des bactéries anaérobies

# Résultats

Conservation de 62,4% de bactéries après lyophilisation

	Avant lyophilisation		Après lyophilisation						
	Nombre de bactéries par culot (30g de selles fraîches)		Nombre de bactéries par lyophilisat		% de perte bactéries par lyophilisat		% conservation de bactéries		poids du lyophilisat
	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	
Selle 1	5*10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	4*10 <sup>9</sup>	5,3*10 <sup>9</sup>	-20%	-46,70%	80%	53,30%	0,72g
Selle2	4*10 <sup>7</sup>	9*10 <sup>9</sup>	3*10 <sup>7</sup>	4*10 <sup>9</sup>	-25,0%	-55,60%	75%	44,40%	0,07g
Selle3	1,7*10 <sup>7</sup>	4*10 <sup>9</sup>	10 <sup>7</sup>	1,7*10 <sup>9</sup>	41,00%	-57,70%	59%	42,50%	0,04g
Selle4	10 <sup>8</sup>	1,7*10 <sup>9</sup>	8,7*10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	13,3%	-41,18%	86,7%	58,8%	0,08g
<b>Moyenne</b>	<b>1,3*10<sup>9</sup></b>	<b>6,2*10<sup>9</sup></b>	<b>1,1*10<sup>9</sup></b>	<b>3*10<sup>9</sup></b>	<b>24,8%</b>	<b>-50,30%</b>	<b>75,1%</b>	<b>49,70%</b>	<b>0,23g</b>
<b>Taux Global bactérie</b>	<b>7,5*10<sup>9</sup></b>		<b>4,7*10<sup>9</sup></b>		<b>37,5</b>		<b>62,4</b>		

Conservation de 75,1% des bactéries aérobies et 49,70% des anaérobies

# Résultats

Conservation de 43,1% de bactéries 15 jours après lyophilisation à -80C°

	Avant lyophilisation		15 jours après lyophilisation						poids du lyophilisat
	Nombre de bactéries par culot (30g de selles fraîches)		Nombre de bactéries par lyophilisat		% de perte bactéries par lyophilisat		% conservation de bactéries		
	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobique	Aérobie	Anaérobie	
Selle 1	5*10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	2,7*10 <sup>9</sup>	4*10 <sup>9</sup>	-47%	60%	53%	40%	0,72g
Selle2	4*10 <sup>7</sup>	9*10 <sup>9</sup>	1,7*10 <sup>7</sup>	3,3*10 <sup>9</sup>	-57,5%	-63,30%	42,5%	36,70%	0,07g
Moyenne	2,52*10 <sup>9</sup>	9,5*10 <sup>9</sup>	1,4*10 <sup>9</sup>	3,7*10 <sup>9</sup>	52,00%	61,6%	48%	38,3%	0,395g
Taux global bactéries	6,01*10 <sup>9</sup>		2,55*10 <sup>9</sup>		56,8%		43,1%		

Conservation de 48% des bactéries aérobies et 38,3% des anaérobies

# Résultats

Conservation de 35% de bactéries 30 jours après lyophilisation à -80C°

	Avant lyophilisation		30 jours après lyophilisation						poids du lyophilisat
	Nombre de bactéries par culot ( 30g de selles fraîches)		Nombre de bactéries par lyophilisat		% de perte bactéries par lyophilisat		% conservation de bactéries		
	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	
Selle 1	5*10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	2*10 <sup>9</sup>	3*10 <sup>9</sup>	60,0%	70,00%	40%	30,00%	0,72g
Taux global bactéries	6,01*10 <sup>9</sup>		2,5*10 <sup>9</sup>		65%		35%		

Conservation de 40% des bactéries aérobies et 30% des anaérobies

## Conservation des bactéries 15 jours après stockage au réfrigérateur à +4 C°.

	Avant lyophilisation		15 jours après lyophilisation						
	Nombre de bactéries par culot (30g de selles fraîches)		Nombre de bactéries par lyophilisat		% de perte bactéries par lyophilisat		% conservation de bactéries		poids du lyophilisat
	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	
Selle 1	5*10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	1,7*10 <sup>9</sup>	2*10 <sup>9</sup>	67%	80%	33%	20%	0,72g
Selle 2	4*10 <sup>7</sup>	9*10 <sup>9</sup>	1*10 <sup>7</sup>	1*10 <sup>9</sup>	-75,0%	-88,90%	25%	11,10%	0,07g
Moyenne	2,52*10 <sup>9</sup>	9,5*10 <sup>9</sup>	8,6*10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	71,00%	84,00%	<b>29%</b>	<b>15,55%</b>	0,395g
Taux global bactérie	6,01*10 <sup>9</sup>		9,3*10 <sup>8</sup>		77,50%		<b>22,28%</b>		

## Conservation des bactéries 30 jours après stockage au réfrigérateur à +4 C°.

	Avant lyophilisation		30 jours après lyophilisation						
	Nombre de bactéries par culot ( 30g de selles fraîches)		Nombre de bactéries par lyophilisat		% de perte bactéries par lyophilisat		% conservation de bactéries		poids du lyophilisat
	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	
<b>Selle 1</b>	5*10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	7*10 <sup>8</sup>	1,3*10 <sup>9</sup>	86,0%	87,00%	<b>14%</b>	<b>13,00%</b>	0,72g
<b>Tx global bactéries</b>	6,01*10 <sup>9</sup>		10 <sup>9</sup>		86,5%		<b>13,5%</b>		

## Conservation des bactéries 15 jours après stockage à TA

	Avant lyoph		15 jours après lyophilisation						
	Nombre de bactéries par culot (30g de selles fraîches)		Nombre de bactéries par lyophilisat		% de perte bactéries par lyophilisat		% conservation de bactéries		pois du lyophilisat
	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	
Selle 1	5*10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	5*10 <sup>8</sup>	7*10 <sup>8</sup>	90,0%	93,00%	10%	7,00%	0,72g
Selle2	4*10 <sup>7</sup>	9*10 <sup>9</sup>	1*10 <sup>6</sup>	1*10 <sup>8</sup>	97,5%	-98,90%	2,5%	1,1%	0,07g
Moyenne	2,5*10 <sup>9</sup>	9,5*10 <sup>9</sup>	2,5*10 <sup>8</sup>	4*10 <sup>8</sup>	93,75%	95,95%	<b>6,25%</b>	<b>4,05%</b>	0,395g
Tx global bactéries	6,01*10 <sup>9</sup>		3,25*10 <sup>8</sup>		94,85%		<b>5,15%</b>		

## Conservation des bactéries 30 jours après stockage à TA

	Avant lyophilisation		30 jours après lyophilisation						
	Nombre de bactéries par culot (30g de selles fraîches)		Nombre de bactéries par lyophilisat		% de perte bactéries par lyophilisat		% conservation de bactéries		poids du lyophilisat
	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	
Selle 1	5*10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	1,3*10 <sup>7</sup>	1,3*10 <sup>7</sup>	99,7%	99,87%	<b>0,26%</b>	<b>0,13%</b>	0,72g
Tx global bactéries	6,01*10 <sup>9</sup>		1,3*10 <sup>7</sup>		99,8%		<b>0.2%</b>		

# Nombre de gélules minimum pour une greffe

La greffe fécale procure la guérison aux patients avec 5% des bactéries anaérobies.

4 gélules lyophilisées contiennent environ 5% des anaérobies.

Le pourcentage des anaérobies conservées dans les gélules à -80 C° sur une période de 15 jours est de 38,35%. En appliquant le raisonnement ci-dessus, le nombre des gélules à remettre aux patients est minimum de 5.

Le pourcentage des bactéries anaérobies conservées dans les gélules à -80 C° sur une période de 30 jours est de 30%. En appliquant le raisonnement ci-dessus, le nombre des gélules à remettre aux patients est minimum de 6.

# Conclusions

- La congélation des selles fraîches non traitées conserve seulement 5% des bactéries anaérobies
- La lyophilisation des selles fraîches conserve 62,4% de bactéries dont 49,7% des anaérobies.
- Le processus de lyophilisation semble être moins agressif que la congélation sur la population microbienne. Cela peut être dû aux **cryoprotecteurs utilisés.**
- La mise au point des gélules de selles lyophilisées **est faisable**
- Les gélules sont sécurisées (fabriquées sous contrôle pharmaceutique)
- Les gélules conservent un nombre de bactéries nécessaires pour le traitement et donc potentiellement efficaces et **peuvent être conservées à -80 C° pendant un mois.**

# Perceptives

- **Augmentation du nombre d'échantillon**
- **Amélioration des conditions de filtration**
- **Tests de désagrégation de gélules et d'uniformité de masse**
- **Essai clinique sur les patients présentant des troubles dépressifs majeurs**
- **Démarrage pour les patients en routine (les moins grave)**

Merci pour votre attention