



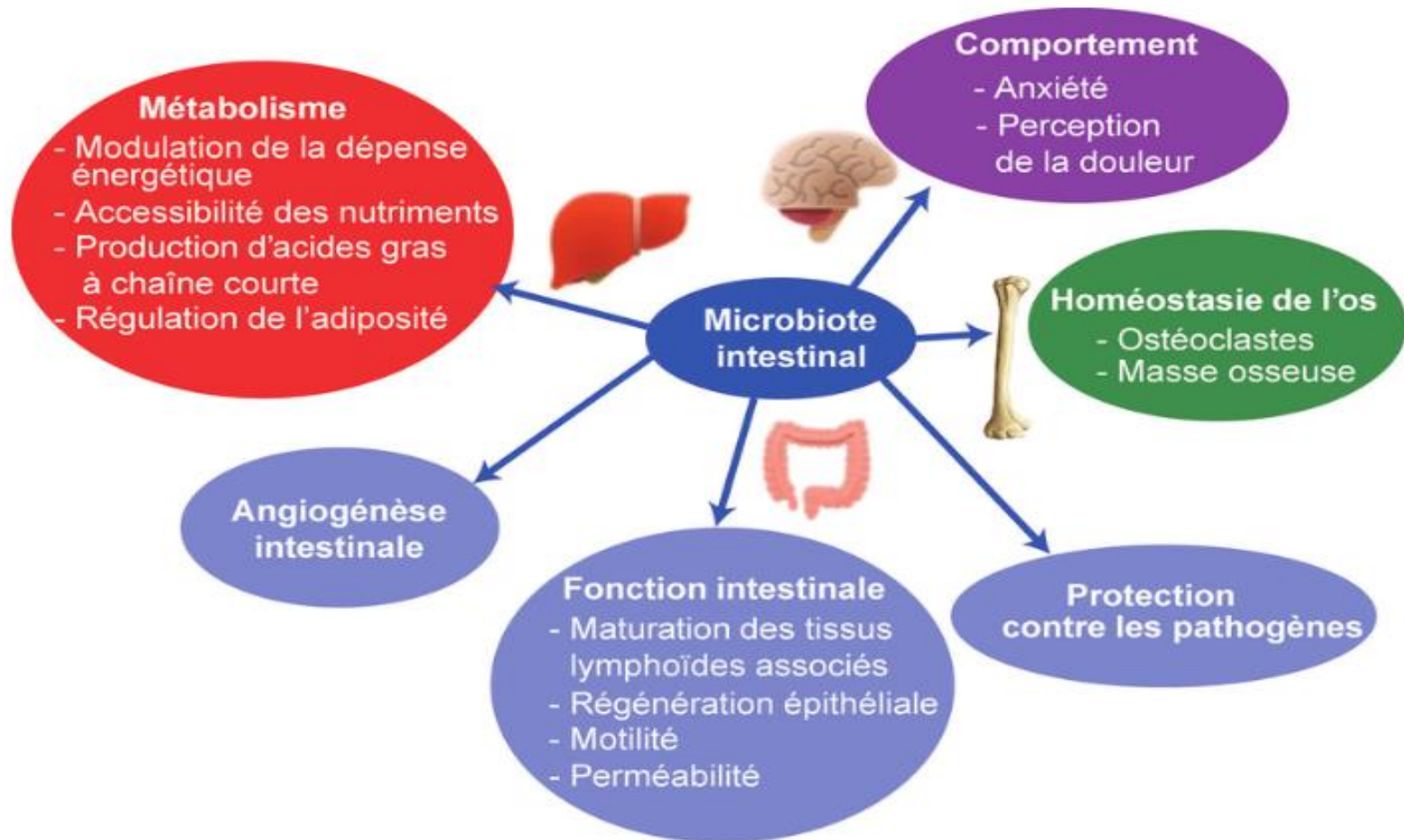
**Assistance Publique
Hôpitaux de Marseille**

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

Pr Stéphane HONORE
Service Pharmacie
Hôpital de la Timone

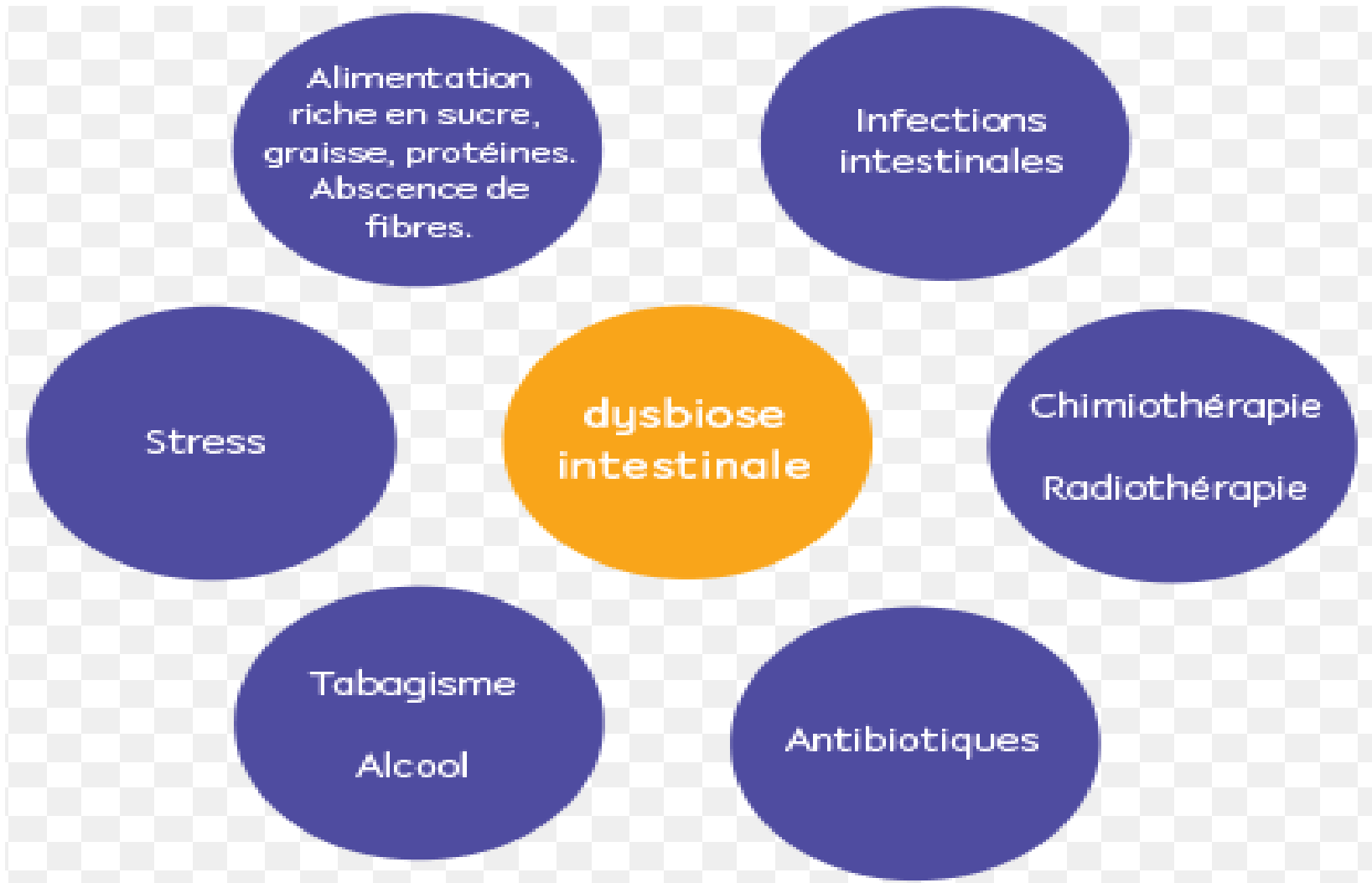
Contexte

Rôles du microbiote intestinal



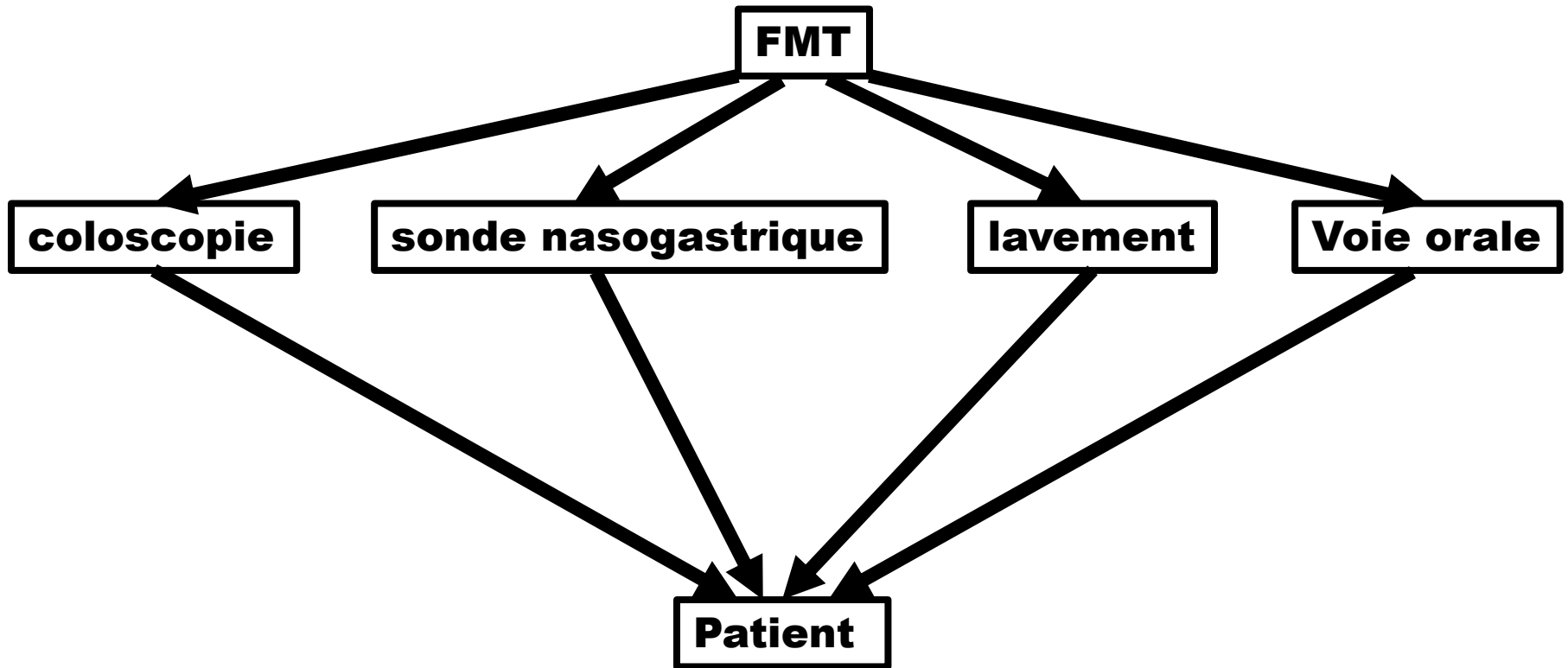
Contexte

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°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 CaCl₂ ; 0,01% de MgCl₂ ; 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 methylcellulose (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^e 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

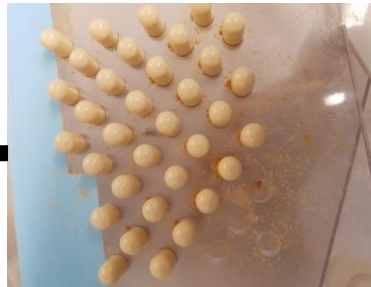
culot +milieu
nutritif/cryop
rotecteur



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	10,5	9,1	6,43	6,3

-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 ⁹	10 ¹⁰	4*10 ⁹	5,3*10 ⁹	-20%	-46,70%	80%	53,30%	0,72g
Selle2	4*10 ⁷	9*10 ⁹	3*10 ⁷	4*10 ⁹	-25,0%	-55,60%	75%	44,40%	0,07g
Selle3	1,7*10 ⁷	4*10 ⁹	10 ⁷	1,7*10 ⁹	41,00%	-57,70%	59%	42,50%	0,04g
Selle4	10 ⁸	1,7*10 ⁹	8,7*10 ⁷	10 ⁹	13,3%	-41,18%	86,7%	58,8%	0,08g
Moyenne	1,3*10⁹	6,2*10⁹	1,1*10⁹	3*10⁹	24,8%	-50,30%	75,1%	49,70%	0,23g
Taux Global bactérie	7,5*10⁹		4,7*10⁹		37,5		62,4		

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 ⁹	10 ¹⁰	2,7*10 ⁹	4*10 ⁹	-47%	60%	53%	40%	0,72g
Selle2	4*10 ⁷	9*10 ⁹	1,7*10 ⁷	3,3*10 ⁹	-57,5%	-63,30%	42,5%	36,70%	0,07g
Moyenne	2,52*10 ⁹	9,5*10 ⁹	1,4*10 ⁹	3,7*10 ⁹	52,00%	61,6%	48%	38,3%	0,395g
Taux global bactéries	6,01*10 ⁹		2,55*10 ⁹		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 ⁹	10 ¹⁰	2*10 ⁹	3*10 ⁹	60,0%	70,00%	40%	30,00%	0,72g
Taux global bactéries	6,01*10 ⁹		2,5*10 ⁹		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 ⁹	10 ¹⁰	1,7*10 ⁹	2*10 ⁹	67%	80%	33%	20%	0,72g
Selle 2	4*10 ⁷	9*10 ⁹	1*10 ⁷	1*10 ⁹	-75,0%	-88,90%	25%	11,10%	0,07g
Moyenne	2,52*10 ⁹	9,5*10 ⁹	8,6*10 ⁸	10 ⁹	71,00%	84,00%	29%	15,55%	0,395g
Taux global bactérie	6,01*10 ⁹		9,3*10 ⁸		77,50%		22,28%		

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	
Selle 1	5*10 ⁹	10 ¹⁰	7*10 ⁸	1,3*10 ⁹	86,0%	87,00%	14%	13,00%	0,72g
Tx global bactéries	6,01*10 ⁹		10 ⁹		86,5%		13,5%		

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 ⁹	10 ¹⁰	5*10 ⁸	7*10 ⁸	90,0%	93,00%	10%	7,00%	0,72g
Selle2	4*10 ⁷	9*10 ⁹	1*10 ⁶	1*10 ⁸	97,5%	-98,90%	2,5%	1,1%	0,07g
Moyenne	2,5*10 ⁹	9,5*10 ⁹	2,5*10 ⁸	4*10 ⁸	93,75%	95,95%	6,25%	4,05%	0,395g
Tx global bactéries	6,01*10 ⁹		3,25*10 ⁸		94,85%		5,15%		

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 ⁹	10 ¹⁰	1,3*10 ⁷	1,3*10 ⁷	99,7%	99,87%	0,26%	0,13%	0,72g
Tx global bactéries	6,01*10 ⁹		1,3*10 ⁷		99,8%		0.2%		

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