

**SECURITE ET EFFICACITE DE LA LACTOFERINE PAR RAPPORT AU SULFATE FERREUX DANS LE  
TRAITEMENT DE LA CARENCE EN FER ET DE L'ANEMIE, DES CARENCES EN FER DANS LA THROMBOPHILIE  
HEREDITAIRE CHEZ LES FEMMES ENCEINTES.**

Rosalba Paesano • Enrica Pacifici • Samanta Benedetti • Francesca Berlutti • Alessandra Frioni • Antonella Polimeni • Piera Valenti  
Biometals (2014) 27:999–1006

**OBJECTIF :**

Evaluer la sécurité et l'efficacité de la lactoferine bovine (bLf) face à l'intervention standard avec sulfate ferreux dans le traitement de la carence en fer (ID) et de l'anémie ferriprive (AF) chez les femmes enceintes affectées par la thrombophilie héréditaire (HT).

Cette étude a été réalisée dans des hôpitaux de niveau II pour des grossesses compliquées, à Rome.

**INTRODUCTION :**

Les troubles d'hémostasie ferreuse comme ID et AF affectent les femmes enceintes causés par une augmentation significative des besoins en fer pendant le 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre de gestation (de 1-2 à 4 et 8mg/jour, respectivement)(Bothwell 2000) aussi bien que pour le volume de sang accru et le développement de l'unité fœto-placentaire (*Umbreit 2005 et Scholl 2005*).

ID/AF associés à la grossesse augmentent les risques de santé maternelle, les accouchements prématurés, les retards de croissance des fœtus, les poids de naissance bas et la santé néonatale inférieure à la normale.

Heureusement, le degré de l'ID fœtale n'est pas toujours aussi grave que cela chez la mère puisque le transfert du fer de la mère au fœtus est régulé via les récepteurs transferrine, situés dans le côté apical syncytiotrophoblaste placentaux, ce qui augmente la déficience en fer (*Bradley et al.2004 ; Bastin et al.2006*).

L'absorption de fer maternel se fait dans le duodénum où il est retenu dans le cytoplasme de l'entérocyte exporté par la ferritine puis par la ferroportine (Fpn), le seul distributeur des cellules dans le sang (*Abboud et Haile 2000*).

Fpn a aussi été trouvé dans des hépatocytes excrété dans l'urine et le sang (*Ganz 2005*). Des érythroblastes (Zhang et al.2011), des cellules du placenta (Bastin et al.2006) et des macrophages qui recyclent chaque jour 20mg de fer à partir de « lyse d'érythrocytes » (*Donovan et al.2005*).

Un autre composant de « l'hémostasie du fer » est l'hepcidine, un peptide synthétisé par des hépatocytes, excrétés dans l'urine et le sang qui régule l'entrée du fer dans le plasma (*Park et al.2001 ; Nicolas et al.2001, 2002*).

La fixation de l'hepcidine à Fpn induit l'internalisation et la dégradation de Fpn, bloquant ainsi le fer des cellules dans le sang (*Nemeth et al.2004 ; Qiao et al.2012*).

La synthèse d'hepcidine maternelle et de Fpn est régulée par des changements dans l'état du fer et les besoins en fer et par les cytokines inflammatoires qui modulent aussi la synthèse fœtale de Fpn (*Collard 2009*).

En particulier l'interleukine-6 (IL-6) augmente la transcription du gène hepcidine dans les hépatocytes et diminue la régulation du gène Fpn dans les antérocytes et les macrophages (Nemeth et Ganz 2006 ; Ganz 2013), aussi bien que dans les syncytiotrophoblastes du placenta (Collard 2009) et dans les érythroblastes (Zhang et al.2011). Quand le flux du fer dans le plasma est altéré à cause de l'hepcidine et/ou la dérégulation de Fpn, à la fois la saturation en fer de transferrine du sérum et l'érythropoiesis diminue concomitamment avec l'augmentation des réserves de fer intracellulaire et une baisse de fer dans le sang.

Par conséquent, l'anémie par l'inflammation est caractérisée par l'ID malgré des réserves adéquates en fer (Nemeth et Ganz 2006).

Même si le rôle de Fpn-hepcidine dans l'homéostasie du fer est connu, l'ID/AF maternel sont encore traités avec l'administration de fer « inorganique » comme le sulfate de fer.

Le sulfate de fer par voie orale, souvent inefficace dans le traitement des ID/AF, provoque plusieurs effets contraires et augmente les niveaux du sérum IL-6, avec pour résultat la persistance de fer et des désordres d'hémostase inflammatoires (Kadiiska et al.2000 ; Paesano et al.2009, 2010a, b, 2012a).

De même l'ID néonatale n'est fréquemment pas inversée par une supplémentation en fer (Shafir et al.2008).

Toute thérapie par une supplémentation en fer est incapable de réguler l'hepcidine et Fpn, les principales protéines de l'homéostasie du fer, doit être revue de façon extensive afin de prendre en compte la dangereuse en fer intracellulaire dans ID/AF, aggravé par la thérapie de supplémentation en fer (Paesano et al.2012b).

Une approche prometteuse, alternative à la supplémentation en fer, est l'administration orale de lactoferine dérivée du lait de vache (bLf), une glycoprotéine qui fixe le fer cationique montrant la grande similitude avec Lf humaine par sa structure (Baker et Baker 2005) et ses fonctions (Valentini et Antonini 2005 ; Baker et Baker 2012).

BLf est un important régulateur du fer et de l'homéostasie inflammatoire utile dans le traitement ID/AF associé à la grossesse puisqu'il rétablit « l'export » physiologique du fer des cellules vers la circulation (Paesano et al.2009, 2010a, b) et empêche la naissance prématurée (Paesano et al.2012a).

Dans les grossesses sans complication traitées par bLf, une amélioration significative des paramètres hématologiques a été observée, cela était associé à une importante diminution des niveaux de sérum IL-6, baisse contrastant avec le résultat de la thérapie orale par sulfate de fer.(Paesano et al.2009, 2010b).

Sur la base de ces résultats, nous émettons l'hypothèse que bLf pourrait être aussi utile pour traiter ID/AF dans les grossesses compliquées associées à la thrombophilie héréditaire (HT).

HT, une prédisposition génétique à la formation de thrombose veineuse due à la coagulation anormale (Rosendaal 1999 ; Khan et Dickerman 2006), représente un risque significatif supplémentaire à la fois pour la santé du nouveau-né et de la mère, car il cause des avortements et des fausses couches récurrents, des morts fœtales intra utérines, des retards de croissance, d'éclampsie, la rupture du placenta (Stella et Sibai 2006 ; Patnaik et al.2007).

En vue de la corrélation bien connue entre les résultats de grossesses défavorables et les cytokines pro-inflammatoires chez les femmes enceintes HT (Fox et Kahn 2005 ; Zhao et al.2008), l'administration orale de sulfate ferreux pourrait augmenter l'inflammation, et aussi représenter un risque supplémentaire pour la mère et le fœtus pendant la gestation.

Ici, la sécurité et l'efficacité de l'intervention novatrice bLf face à la thérapie standard de supplémentation en sulfate ferreux, sont évaluées chez les femmes enceintes affectées par HT pour vérifier si bLf peut apporter une approche prometteuse pour rétablir le fer et l'homéostasie inflammatoire dans ces grossesses compliquées.

## **MATERIAUX ET METHODES :**

Design de l'étude :

Pour comparer la sécurité et l'efficacité de la thérapie novatrice par bLf versus supplémentation standard en sulfate ferreux dans le traitement de ID/AF chez les femmes enceintes HT, une étude clinique interventionnelle monocentrique a été élaborée. Cette étude a été réalisée dans le service de la maternité Fabia, Via Olevano Romano, 25 Rome, Italy, un hôpital de niveau II pour les grossesses à risques, cette étude a été réalisée en accord avec les principes éthiques de la déclaration d'Helsinki et de bonnes pratiques cliniques. L'accord fut donné par le comité d'éthique de la maternité Fabia (FM MOD 26/02/2010). Toutes les femmes enceintes donnèrent un consentement écrit bien renseigné avant d'entreprendre quelque procédure d'étude que ce soit.

Patientes :

Les femmes enceintes de 18 à 40 ans, entre la 6<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine de grossesse, ayant un passé comportant des résultats défavorables, comprenant des fausses couches récurrentes, des naissances prématurées, des retards de croissance intra utérine, ont subi avant leur admission dans l'étude un dépistage des marqueurs HT suivants : protéine C, protéine S, résistance de la protéine C activée, des déficiences antithrombotiques, des facteurs de coagulation élevés, l'hyperhomocystéinémie, F5 R506Q (facteur V Leiden) et F2 G20210A (prothrombine G20210A) mutations.

Quand au moins un de ces marqueurs HT ont été décelés, les femmes enceintes ont été considérées comme affectées par HT et dépistées ensuite pour des paramètres d'hématologie avant de commencer la thérapie contre ID et AF.

Les femmes enceintes HT furent admises quand un des paramètres hématologiques correspondait aux valeurs suivantes : hématies  $\leq$  à 4.000.000/ml, hémoglobine  $\leq$  à 11g/dl, fer sérique total  $\leq$  à 30mg/dl, et ferritine  $\leq$  à 12ng/ml.

Les femmes enceintes furent exclues si elles avaient des grossesses sans complication, syndrome anti phospholipides, d'autres maladies concomitantes, de précédentes thérapies de supplémentation en fer, des transfusions de sang récentes, et une allergie aux protéines du lait.

Analyses biologiques :

Les marqueurs HT furent détectés à l'institut Regina Elena, Department of Medical Pathology, Rome, Italy selon Jackson and al. (2008).

Les paramètres hématologiques : c'est-à-dire le nombre d'hématies et d'hémoglobine, le fer sérique total, les concentrations de ferritine sérique à partir d'échantillons de sang veineux furent évalués comme décrit précédemment (Meier et al.2003).

Les analyses hématologiques ainsi que les autres analyses requises habituellement pendant la grossesse furent réalisées dans des laboratoires cliniques choisis librement par les femmes enceintes.

Les niveaux de sérum IL-6 ont été déterminés par la méthode ELISA (Department of public Health and Infectious Diseases, Sapienza University of Rome, Italy) sur les échantillons prélevés avant la thérapie et après la thérapie à l'accouchement.

Interventions :

Les femmes enceintes HT affectées par ID et AF furent réparties en deux groupes A et B sur la base de leur choix personnel. L'affectation au hasard des groupes ainsi que l'administration de placebo étaient considérés contraire à l'éthique.

Les femmes du groupe A ont reçu le traitement innovant consistant à l'administration orale d'une gélule contenant 100mg de bLf plus excipient (Lattoglobina<sup>®</sup>, Isoferine<sup>®</sup>) deux fois par jour avant les repas. La saturation en fer bLf varie de 20 à 30% comme déterminée par spectroscopie optique. Le montant total de fer fourni correspond environ à 70-84mg/jour.

Les femmes du groupe B ont reçu la thérapie classique basée sur l'administration orale de comprimés contenant 520mg de sulfate ferreux (Ferro-Grad<sup>®</sup>, Abbot Laboratories, USA) une fois par jour pendant le repas selon le schéma classique. Un comprimé de Ferro-Grad<sup>®</sup> fourni 156mg de fer.

Toutes les femmes enceintes participantes ont reçu de l'Héparine de Bas Poids Moléculaire (HBPM) (0,3U/jour Seleparina<sup>®</sup>, Italfarmaco SpA, Milano-Italy) ainsi qu'une faible dose d'aspirine de 100mg tous les deux jours (Cardioaspirin<sup>®</sup> 100, Bayer SpA, Milano Italy), pour prévenir et réduire le risque de thrombose veineuse et de fausse couche associé à l'hypercoagulabilité (Kaandorp et al.2009).

Les femmes enceintes participantes ont été examinées au moment de l'inscription et ensuite tous les 30 jours aux visites programmées jusqu'à l'accouchement.

Les principaux résultats de l'évaluation de l'efficacité de bLf face à l'administration de sulfate ferreux étaient basés sur l'évaluation des paramètres hématologiques et des niveaux IL-6 sérum.

De plus, les mesure : hémocrite, glycémie, uricémie, bilirubine, transaminase glutamique oxaloacétique, transaminase glutamique pyruvique, cholestérol, triglycérides, et électrolytes furent évalués à chaque visite.

Les principaux résultats de l'évaluation de sécurité de bLf face à l'administration orale de sulfate ferreux étaient basés sur l'évaluation de conformité maternelle ou d'effets contraires, de signes vitaux du fœtus, du poids de naissance et du score d'APGAR (Apgar 1953).

Les effets contraires chez la mère ont été détectés par l'évaluation de l'inconfort gastro intestinal, nausées, vomissements, diarrhées et constipations.

Les estimations des signes vitaux du fœtus ont été monitorés par des mesures ultrasonographiques de la croissance intra utérine et par le liquide amniotique exprimé comme index fluid amniotic (AFI), un index pour le bien-être du fœtus (Petrozella et al.2011).

Le poids des nouveaux nés et le score d'APGAR ont aussi été enregistrés.

Le score d'APGAR est une méthode pratique pour évaluer la condition physique du nouveau-né peu après l'accouchement. Un score d'APGAR de 0-3 à 5 et 10 minutes de la naissance est l'annonce d'une morbidité élevé et de mortalité tandis qu'une valeur de 9-10 indique que le nourrisson est dans la meilleure condition possible.

### **Analyses statistiques :**

L'analyse statistique fut menée en utilisant le test ANOVA. Les valeurs  $P \leq 0.0001$  ont été considérées comme significatives.

## **RESULTATS**

### **Echantillon :**

Un total de 295 femmes enceintes HT atteintes de ID et AF participèrent à l'essai clinique interventionnel au cours du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse. Sur la base de leur choix personnel, 156 femmes enceintes HT choisirent de faire partie du groupe A (blf intervention innovante) et 139 du groupe B (intervention standard sulfate ferreux Ferro-Grad®).

Les paramètres démographiques et hématologiques des femmes enceintes HT participantes sont reportés dans le tableau 1.

### **Sécurité et efficacité des thérapies sur ID et AF :**

Parmi les 295 femmes participantes, un total de 253 a complètement terminé l'étude.

Parmi les 156 femmes du groupe A, 153 ont terminé l'étude (98%), 3 ne furent retenues pour cause d'analyse incomplète.

Aucun effet secondaire n'a été enregistré.

Parmi les 139 femmes du groupe B, 100 ont terminé l'étude (71,9%), tandis que 39 furent exclues : 23 pour cause d'effets secondaires, 8 pour mauvaise observance du protocole, 5 pour fausse couche au cours de la 12<sup>ème</sup> et 13<sup>ème</sup> semaine de grossesse et 3 pour cause d'analyse incomplète (fig.1).

Même si les paramètres hématologiques ont été évalués avant puis tous les 30 jours pendant la thérapie jusqu'à l'accouchement (fig 2), seules les valeurs hématologiques avant la thérapie et à l'accouchement après la thérapie ont été consignées. A l'accouchement, les femmes HT traitées par blf ont montré des

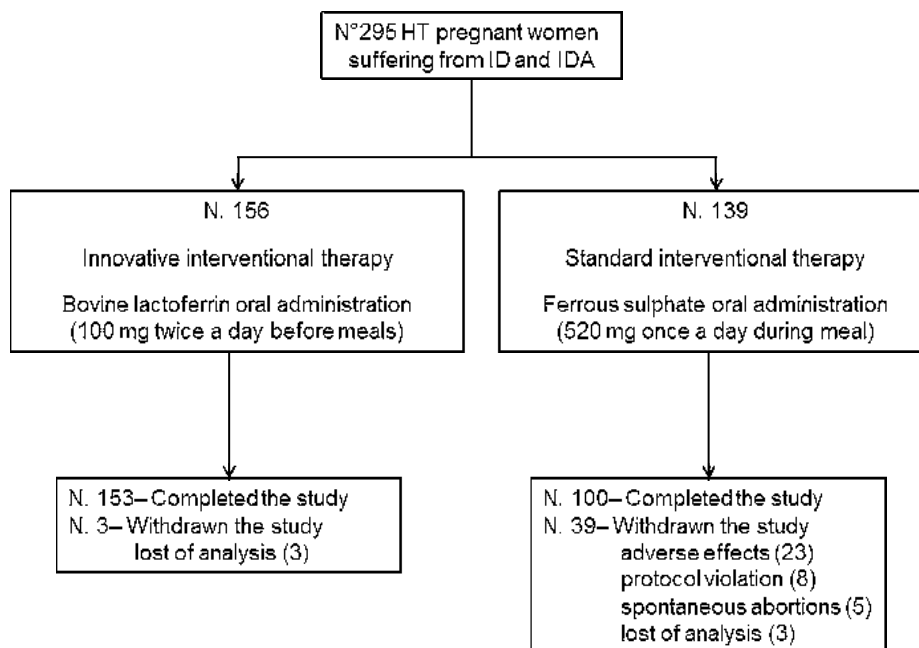
valeurs hématologiques statistiquement significatives plus hautes que celles observées chez les femmes HT traitées au sulfate ferreux (Ferro-Grad®).

**Table 1 -** Baseline haematological means of HT pregnant women affected by ID and AF assessed between the 6th and 8th week of gestation

	Arm A	Arm B
HT pregnant women completing the study (no)	156	139
Age, mean $\pm$ SD (year)	34.0 $\pm$ 3.5	34.8 $\pm$ 2.9
Laboratory mean values $\pm$ SD		
Red blood cells $9 \times 10^3$ (no)	3,850 $\pm$ 206	3,778 $\pm$ 161
Haemoglobin (g/dl)	11.4 $\pm$ 0.8	11.3 $\pm$ 0.6
Total serum iron (lg/dl)	59.6 $\pm$ 18	43.0 $\pm$ 31
Serum ferritin (ng/ml)	14.7 $\pm$ 10	14.0 $\pm$ 11
Serum IL-6 (pg/ml) <sup>a</sup>	94 $\pm$ 8	93 $\pm$ 13

<sup>a</sup> Serum IL-6 was assayed before therapy exclusively in 20 HT pregnant women of each Arm, randomly selected

**Fig. 1 -** Schematic diagram of the interventional study



Dans des études précédentes, sur des grossesses simples et peu compliquées, une amélioration significative des paramètres hématologiques associés à une baisse conséquente des niveaux de sérum IL-6 a été observée chez les femmes traitées par bLf.

Ici, nous avons évalué les concentrations de sérum IL-6 au moment de l’inscription et après une thérapie à l’accouchement chez 20 femmes enceintes HT de chaque groupe choisi au hasard (fig 3).

Les niveaux de sérum IL-6 ont baissé de façon significative de  $94 \pm 10$  à  $69,5 \pm 6$  chez les femmes du groupe A, mais a augmenté de  $93 \pm 13$  jusqu’à  $112,6 \pm 112,7$  chez les femmes du groupe B même si ce n’est pas de façon significative.

## Résultats concernant les fœtus et nouveau-nés :

La croissance intra utérine, AFI, le poids des nouveau-nés et les valeurs d'APGAR ont montrés le bien-être du fœtus et du nouveau-né sans tenir compte de la thérapie bLf ou sulfate ferreux.

## DISCUSSION

Les femmes atteintes de HT sont sujettes à des facteurs de risques significatifs pendant la grossesse puisque HT prédispose à l'hypertension, à la pré-éclampsie et au retard de croissance intra utérine.

Dans ces grossesses à haut risque, des fausses couches récurrentes sont 9 fois plus fréquentes que dans des grossesses sans complications (Patnaik et al.2007).

Les troubles du fer comme ID et AF peuvent compliquer plus tard la gestion de la grossesse. Ces complications ne sont pas prises en compte puisque l'impact de ID et AF dans cette population n'a pas été réellement étudié. Inversement, un haut degré de corrélation entre les résultats de grossesse défavorables et les cytokines pro inflammatoires, comprenant IL-6, chez les femmes enceintes a été observé (Fox et Kahn 2005 ; Hagberg et al.2005 ; Zaho et al.2008).

De façon très intéressante IL-6 est une molécule clé dans l'effet réciproque entre l'homéostasie inflammatoire et le fer modulant l'hepcidine et la synthèse Fpn, les plus importants régulateurs de l'homéostasie du fer (Wessling-Resnick 2010).

Il est important de reconnaître la relation étroite entre les désordres de l'homéostasie inflammatoire et le fer et les résultats défavorables dans une grossesse HT.

Dans cette étude bLf fut statistiquement significativement plus efficace que la thérapie par sulfate ferreux dans ID et AF (fig.2).

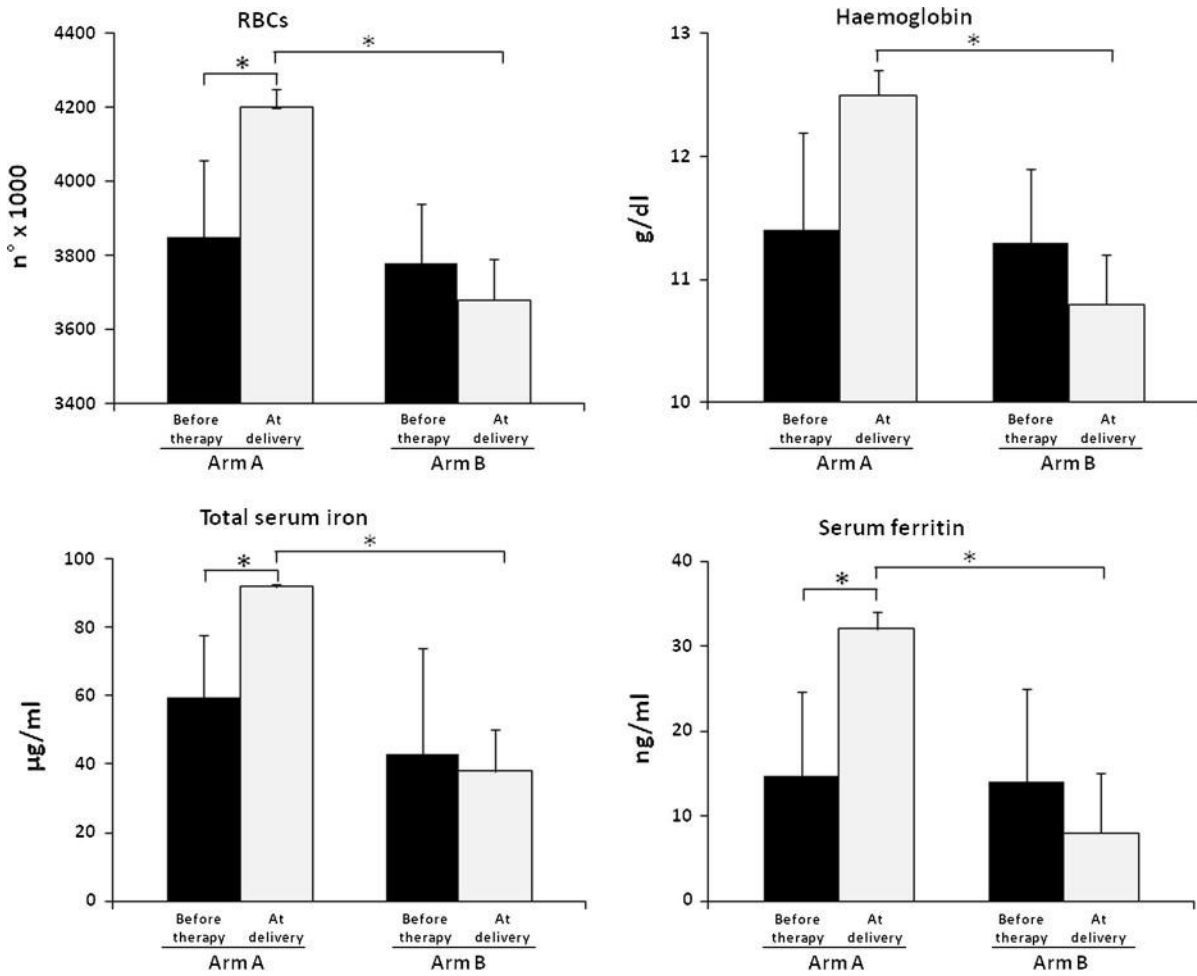
L'efficacité de bLf n'était pas due à la quantité de fer apportée qui est beaucoup plus basse que celle requise quotidiennement pendant la grossesse et qui est fournie par le sulfate ferreux (156mg/jour).

De plus, l'efficacité de la bLf n'était pas reliée à une augmentation d'absorption de fer puisque ceci est reconnu avoir lieu de la même manière à partir de bLf et de sulfate ferreux (Lønnerdal et Bryant 2006). Prises ensemble, ces données ont montré l'influence supposée de bLf sur les facteurs clé de l'homéostasie inflammatoire et du fer incluant IL-6. Les résultats reportés ici confirment cette hypothèse. Après la thérapie bLf, les niveaux du sérum IL-6 ont baissé de façon significative ( $P \leq 0,0001$ ) même si ils sont restés plus haut que ceux détectés dans une grossesse sans complications (Paesano et al.2006, 2010b).

Au contraire, chez les femmes enceintes HT traitées avec du sulfate ferreux, les niveaux de sérum IL-6 ont augmenté même si ce n'est pas d'une importance significative.

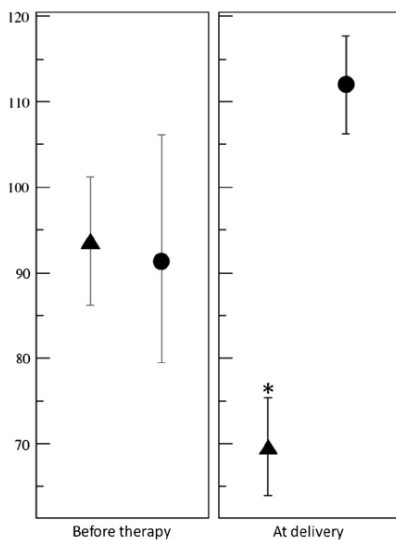
En conséquence, l'effet de bLf dans l'augmentation des paramètres hématologiques est directement relié à la baisse de IL-6 même si un effet direct de bLf sur l'hepcidine et Fpn ne peut pas être exclu (Paesano et al.2010b).

**Fig 2** - Haematological values before and after therapy at delivery in HT pregnant women suffering from ID and AF. Mean values  $\pm$  standard deviation of haematological parameters before and after therapy at delivery of HT pregnant women receiving bLf oral administration (Arm A, 153 women) or the ferrous sulfate oral administration (Arm B, 100 women). Statistical analysis was performed by ANOVA \*Significant differences ( $P \leq 0.0001$ )



Concernant la sécurité, pareillement aux observations dans les grossesses sans complications (Paesano et al.2006, 2010b) 16,5% des femmes enceintes du groupe B se retirèrent de l'essai clinique à cause des effets secondaires du sulfate ferreux.

Au contraire, aucune femme du groupe A n'a connu d'effets secondaires.



**Fig 3** - Serum IL-6 levels before therapy and after therapy at delivery in HT pregnant women suffering from ID and AF. Mean values  $\pm$  standard deviation of serum IL-6 levels before therapy at delivery of HT pregnant women receiving bLf oral administration (Arm A, 20 women) (triangle) or the ferrous sulphate oral administration (Arm B, 20 women) (circle). Statistical analysis was performed by ANOVA. \*Significant differences ( $P \leq 0.0001$ ) respect the values recorded before the therapy



Même si toutes les femmes enceintes HT ont été traitées par des agents anticoagulants pour faire baisser l'hypercoagulabilité et les risques de fausse couche, 5 fausses couches entre la 12<sup>ème</sup> et la 13<sup>ème</sup> semaine de gestation ont été signalées parmi les femmes traitées au sulfate ferreux.

Les valeurs hématologiques de ces 5 femmes indiquaient la persistance d'ID/AF et des niveaux élevés de sérum IL-6 (> 90 pg/ml).

Au contraire, aucune fausse couche n'a été observée chez les femmes qui recevaient bLf (groupe A).

Cette incidence de fausses couches aussi bien que l'augmentation des niveaux de sérum IL-6 et la persistance de ID/AF chez les femmes enceintes HT traitées avec du sulfate ferreux suggèrent une forte relation entre l'échec d'une thérapie et la persistance de troubles de l'homéostasie inflammatoire et du fer.

Puisque ID et AF associés à la grossesse aussi bien que l'inflammation sont parmi les facteurs de risques majeurs pour des résultats contraires dans les grossesses HT, l'administration d'un composé doté de la capacité de rétablir l'homéostasie du fer et atténuer l'inflammation comme bLf pourrait représenter une thérapie sûre et extrêmement importante contre ID/AF. La preuve qu'aucune femme traitée avec bLf n'a subi aucune fausse couche, à la différence des 5 fausses couches observées chez celles qui étaient traitées au sulfate ferreux.