

Activité de l'acide acétylsalicylique à doses ultra-faibles

Depuis 1985, l'équipe de Christian Doutremepuich, professeur d'hématologie à la faculté de pharmacie de Bordeaux, étudie l'action de l'acide acétylsalicylique (aspirine) sur les plaquettes sanguines, les cellules pariétales vasculaires et leurs interactions.

L'acide acétylsalicylique agit en transférant son radical acétyl- à un acide aminé du site actif d'une enzyme : la cyclo-oxygénase. Cette dernière est ainsi rendue non fonctionnelle. Ce phénomène est irréversible ; on le qualifie d'inhibition non compétitive. Les propriétés pharmacologiques (la plupart des effets secondaires inclus) de l'aspirine sont liés à l'inhibition de la synthèse d'eicosanoïdes par la cyclo-oxygénase.

A forte dose (1 g), l'aspirine est utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-pyrétiques. A faible dose (50 mg), son action anti-thrombotique et anti-agrégant plaquettaire est prédominante.

La question posée par cette équipe a été d'identifier l'éventuelle activité de l'aspirine à très faible dose en utilisant des dilutions homéopathiques moyennes et hautes (5 et 15 CH). Plus de quinze années de recherche sur ce thème ont été couronnées par de nombreuses publications dans des revues scientifiques internationales dont les principaux résultats sont résumés ici.

Étude préliminaire in vivo chez l'homme^{1, 2, 3}

Méthodes

Dix volontaires sains reçoivent successivement trois traitements différents à 8 jours d'intervalle :

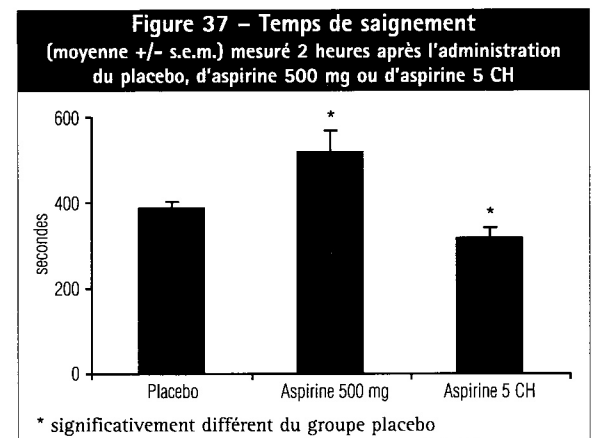
- aspirine 500 mg,
- aspirine 5 CH,
- placebo.

Leur temps de saignement est mesuré 2, 4 et 6 heures après l'administration.

Résultats

L'aspirine à dose pondérale augmente le temps de saignement, l'aspirine 5 CH le diminue, dans les deux cas, de façon significative par rapport au placebo [voir figure 37].

Ces données sont en accord avec la littérature en ce qui concerne l'effet de l'aspirine 500 mg (effet anti-agrégant plaquettaire). En revanche, les résultats concernant l'aspirine 5 CH sont les premiers à démontrer un effet de cette substance à une dose si faible. Ils nécessitent une confirmation par une seconde étude réalisée avec toutes les précautions d'usage destinées à éliminer les biais méthodologiques possibles.



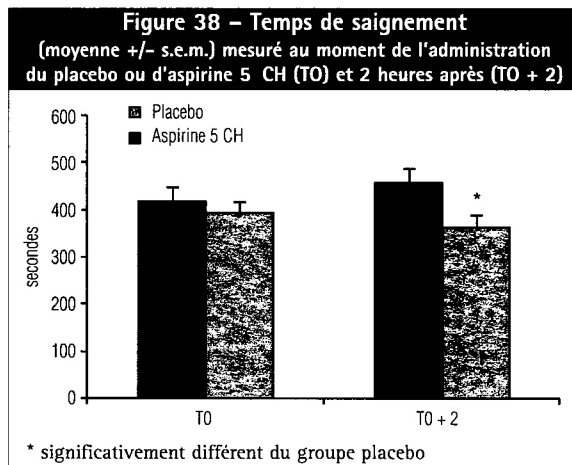
Étude randomisée en double aveugle contre placebo⁴

Méthodes

Vingt volontaires sains de sexe masculin sont traités de façon aléatoire par de l'aspirine 5 CH ou par un placebo. Leur temps de saignement est mesuré, dans les conditions contrôle puis 2, 4 et 6 heures après le traitement.

Résultats

Les résultats obtenus confirment ceux de l'étude précédente puisque le temps de saignement est significativement diminué deux heures après traitement par l'aspirine 5 CH [voir figure 38]. Il est possible de montrer, de façon reproductible, que l'aspirine à dose ultra-faible diminue le temps de saignement. Afin de déterminer les mécanismes responsables de cette activité, diverses études *in vitro*, permettant une analyse plus fine de la fonction plaquettaire, ont été réalisées⁶.



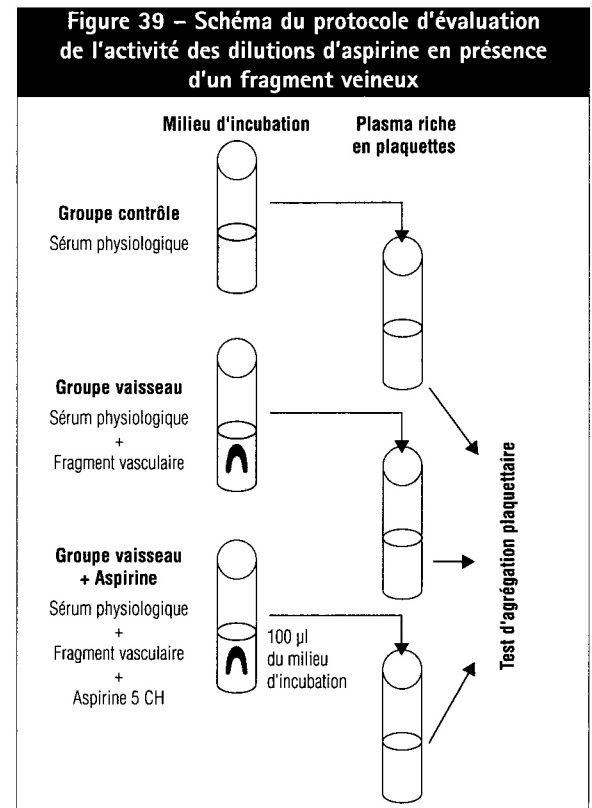
Mécanisme d'action de l'aspirine à dose ultra-faible⁵

Divers facteurs d'origine vasculaire sont susceptibles d'influencer l'agrégation plaquettaire. Afin de déterminer si l'aspirine 5 CH agit via certains de ces médiateurs, une étude *in vitro* est réalisée.

Méthodes

Le modèle expérimental consiste à incuber 10 minutes à 37 °C les trois préparations suivantes :

- sérum physiologique (groupe contrôle),
 - un fragment vasculaire humain dans du sérum physiologique (groupe vaisseau),
 - une préparation identique à la précédente en présence d'aspirine 5 CH (groupe vaisseau + aspirine 5 CH).
- 100 µl de ces milieux d'incubation sont ajoutés à un échantillon de plasma riche en plaquettes dont on étudie l'agrégation (amplitude et vélocité) [voir figure 39].

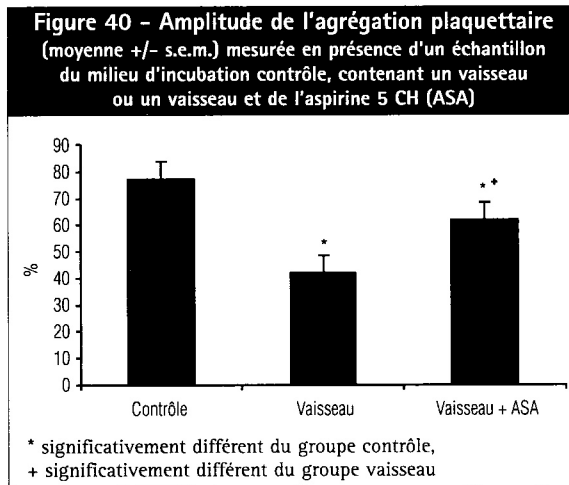


Résultats

Cette étude met en évidence [voir figure 40] :

- une diminution de l'agrégation plaquettaire en présence du vaisseau,
- une inhibition partielle de cet effet en présence d'aspirine 5 CH.

Ainsi, les vaisseaux libèrent des substances qui modifient l'agrégation plaquettaire. L'aspirine, à dose ultra-faible, semble moduler la sécrétion de ces substances pour rétablir l'agrégation plaquettaire.



Nature des substances responsables de l'effet vasculaire de l'aspirine 5 CH⁷

Méthodes

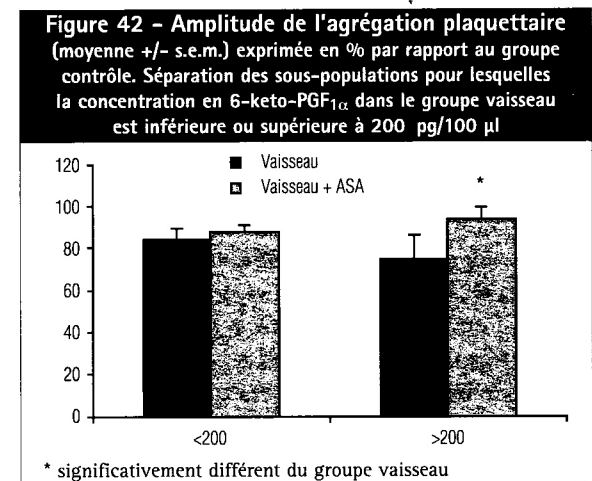
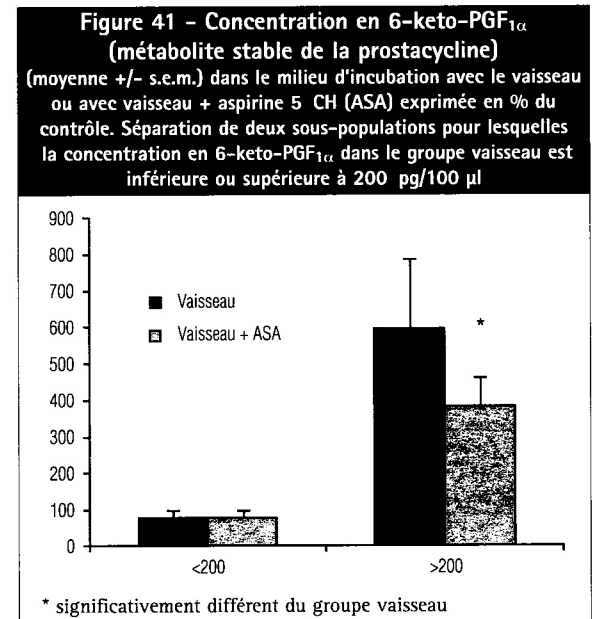
Afin d'étudier les mécanismes responsables de l'action de l'aspirine 5 CH sur la paroi vasculaire, un dosage de la prostacycline est réalisé dans les milieux d'incubation précédemment décrits.

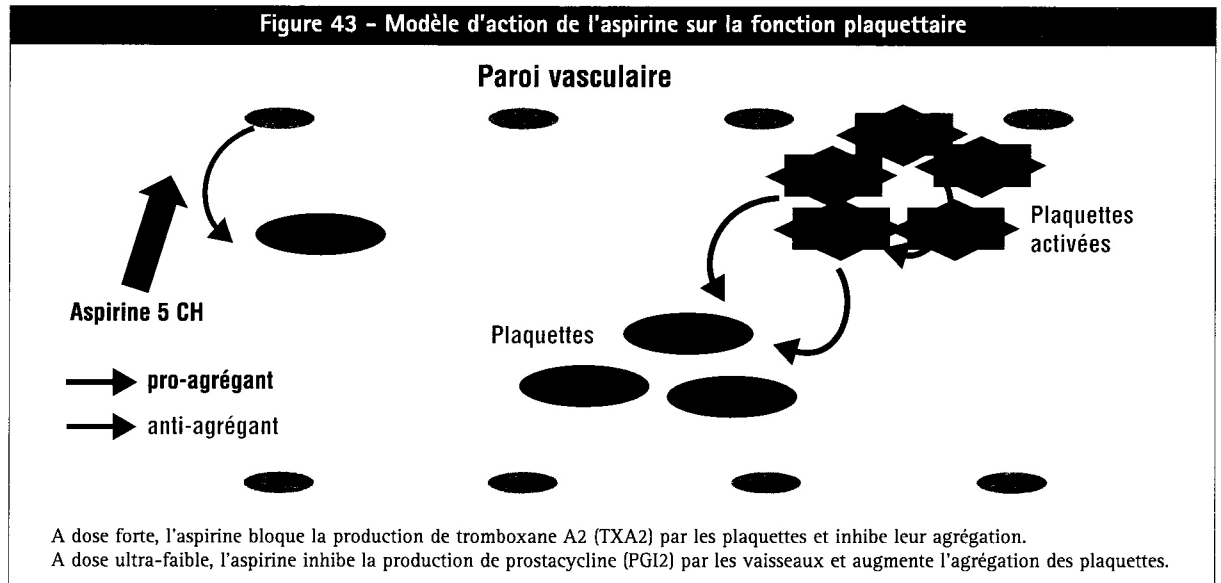
Résultats

Il est ainsi montré que seuls certains vaisseaux ont une production basale de prostacycline élevée : concentration dans le milieu d'incubation en 6-keto-PGF_{1α} (métabolite stable de la prostacycline) supérieure à 200 pg/100 µl. Dans ces conditions

seulement, l'aspirine 5 CH inhibe la libération de prostacycline par le vaisseau [voir figure 41] et rétablit l'agrégation plaquettaire [voir figure 42].

Ces résultats permettent de conclure que la paroi vasculaire libère de la prostacycline ayant pour action biologique une diminution de l'agrégation plaquettaire. L'aspirine 5 CH diminue la quantité de prostacycline pariétale libérée et rétablit ainsi l'agrégation plaquettaire. Cette action n'est observée que lorsque la libération de prostacycline par les vaisseaux est suffisante.





L'aspirine à forte et ultra-faible doses semble donc agir *via* un système commun : les prostaglandines, mais pas au niveau du même type cellulaire (les plaquettes à forte dose, la paroi vasculaire à dose ultra-faible) [voir figure 43].

- la surface et la durée du thrombus,
- la durée d'embolisation et le nombre d'emboles émis.

Chez ces mêmes animaux, il est également possible de mesurer le temps de saignement, l'amplitude et la vélocité de l'agrégation plaquettaire.

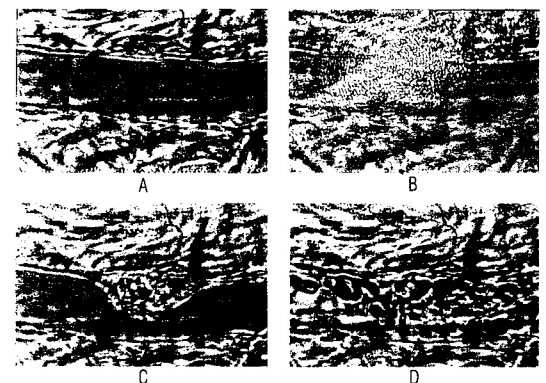
Expérimentation *in vivo* chez le rat

Méthodes

Afin d'explorer plus finement les mécanismes d'action de l'aspirine à très faible dose sur la fonction plaquettaire *in vivo*, un nouveau modèle a été développé⁸. Il consiste à provoquer, à l'aide d'un faisceau laser, des micro-lésions à l'intima de vaisseaux mésentériques (artériole ou veinule) chez un rat anesthésié. Ces lésions entraînent la formation d'agrégats plaquettaires en quelques secondes [voir figure 44]. La présence de ce thrombus s'accompagne de l'émission d'emboles pendant quelques minutes. L'utilisation d'un système d'enregistrement vidéo automatique, relié à un microscope, permet la mesure de nombreux paramètres caractéristiques :

- le nombre de tirs laser nécessaires à l'induction du thrombus,

Figure 44 - Photographie d'une artériole mésentérique vue au microscope lors de l'induction de la thrombose par le faisceau laser



- A. Avant l'application du faisceau laser,
B. Pendant le tir laser (1/30^{ème} de seconde),
C. 3 secondes après le tir laser, formation du thrombus au niveau de la lésion artériolaire,
D. 30 secondes après le tir, le thrombus occupe pratiquement toute la lumière.

L'administration de différentes doses d'aspirine avant l'induction du thrombus permet d'évaluer leur action sur l'agrégation plaquettaire *in vivo*^{9, 10}. Différents groupes expérimentaux ont été étudiés :

- groupe contrôle (CTL) traité au sérum physiologique,
- groupe salicylate : traité au salicylate 100 mg/kg,
- groupes ASA : traités à l'aspirine aux doses, en mg/kg, de 100, 1, 10⁻² (1 CH), 10⁻⁴ (2 CH), 10⁻⁶ (3 CH), 10⁻⁸ (4 CH), 10⁻¹⁰ (5 CH), 10⁻¹⁸ (9 CH), 10⁻³⁰ (15 CH), 10⁻⁶⁰ (30 CH).

Résultats

On observe un effet opposé de l'aspirine à forte et à ultra-faible doses sur la plupart des paramètres mesurés : vélocité et amplitude [voir figure 45] de l'agrégation plaquettaire, durée d'embolisation et nombre d'embolies [voir figure 46]. En revanche, le temps de saignement est augmenté par la forte dose mais pas significativement modifié par les dilutions [voir figure 47].

L'aspirine 100 mg/kg présente donc des propriétés anti-agrégantes et anti-thrombotiques alors que l'aspirine hautement diluée (9, 15 et 30 CH) est pro-agrégante et pro-thrombotique.

Figure 45 – Amplitude de l'agrégation plaquettaire (moyenne) mesurée dans les conditions contrôles (CTL), après traitement au salicylate (Salicylate 100 mg/kg) ou à l'aspirine (ASA) 100 et 1 mg/kg, 1, 2, 3, 4, 5, 9, 15 et 30 CH

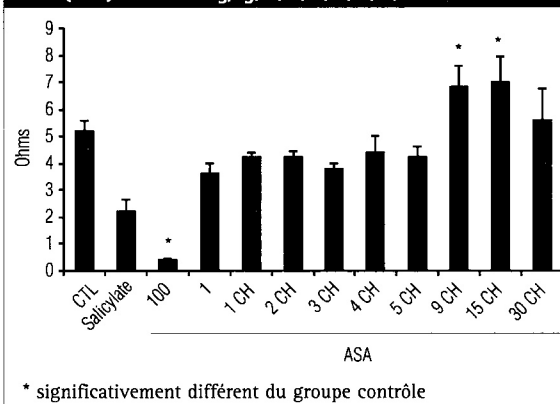


Figure 46 – Nombre d'embolies (moyenne) mesuré suite à l'induction d'une thrombose artérielle, dans les conditions contrôles (CTL), après traitement au salicylate (Salicylate 100 mg/kg) ou à l'aspirine (ASA) 100 et 1 mg/kg, 1, 2, 3, 4, 5, 9, 15 et 30 CH

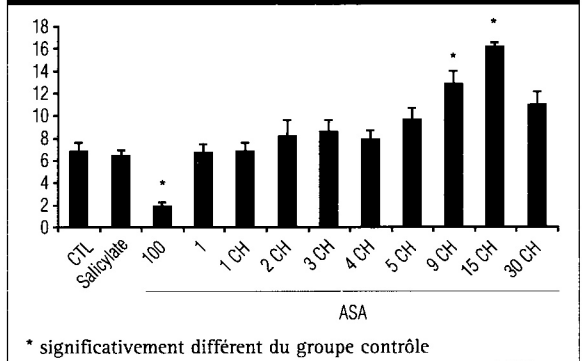
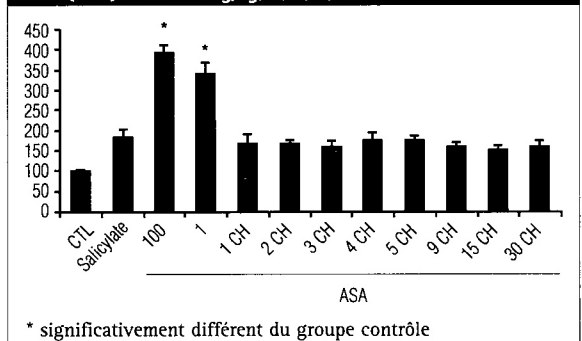


Figure 47 – Temps de saignement (moyenne) mesurée dans les conditions contrôles (CTL), après traitement au salicylate (Salicylate 100 mg/kg) ou à l'aspirine (ASA) 100 et 1 mg/kg, 1, 2, 3, 4, 5, 9, 15 et 30 CH



Étude de l'action de l'aspirine plusieurs jours après son administration¹¹

Méthodes

Le modèle de thrombose induite par faisceau laser est utilisé pour évaluer la fonction plaquettaire pendant 16 jours après administration de 100 mg/kg d'aspirine à des rats.

Résultats

2 jours après l'administration de l'aspirine, on observe l'effet anti-thrombotique classique comme en témoigne

la diminution de la durée d'embolisation [voir figure 48] et du nombre d'emboles [voir figure 49].

De 4 à 6 jours après son administration, plus aucun effet n'est observé sur ces paramètres. En revanche, 8 à 10 jours après son administration, l'effet inverse de celui initialement mesuré est mis en évidence : augmentation de la durée d'embolisation [voir figure 48] et du nombre d'emboles [voir figure 49].

Cette action est semblable à celle observée dans l'étude précédente lors d'une administration d'aspirine hautement diluée. L'effet pro-thrombotique de l'aspirine, plusieurs jours après son administration, pourrait expliquer les phénomènes thrombo-emboliques observés chez des patients à l'arrêt du traitement par l'aspirine.

Effet de l'administration répétée d'aspirine à forte dose¹³

Méthodes

100 mg/kg d'aspirine sont administrés à des rats à J0. Une seconde administration est réalisée 30 minutes avant l'induction de la thrombose (par la méthode de laser précédemment décrite) à J0+2, +4, +6, +8, +9, +10, +14 et +16 jours. Deux groupes contrôles sont réalisés : un traité au sérum physiologique (CTL), l'autre traité une seule fois à l'aspirine 30 minutes avant l'induction de la thrombose (CTL ASA).

Résultats

L'effet de l'administration de deux doses fortes, successives, d'aspirine est variable selon l'intervalle de temps qui les sépare. Un effet anti-thrombotique (diminution du nombre d'emboles [voir figure 50]) et anti-agrégant plaquettaire (augmentation du temps de saignement [voir figure 51] et diminution de l'amplitude de l'agrégation [voir figure 52]) est observé après une prise unique d'aspirine ou deux prises à 2 jours d'intervalle.

En revanche, lorsqu'un délai plus long est observé entre les deux prises, certains effets de l'aspirine ne sont plus mis en évidence. Particulièrement avec 6 et 10 jours d'intervalle entre les deux prises, on n'observe ni diminution du nombre d'emboles [voir figure 50] ni enfin diminution de l'amplitude de l'agrégation plaquettaire [voir figure 52]. Le temps de saignement reste inchangé si la seconde administration est réalisée entre J4 et J9 [voir figure 51].

Tout se passe comme si l'action pro-thrombotique rémanente de la première administration (mise en évidence dans l'étude précédente) inhibait l'action de la seconde. Ces données présentent un intérêt majeur dans le suivi des traitements anti-agrégants plaquettaires utilisant des prises régulières d'aspirine.

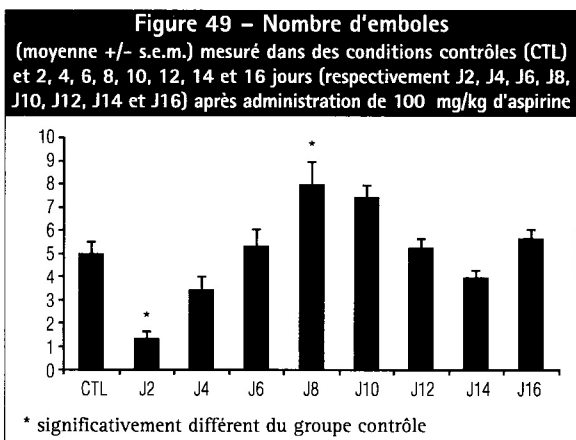
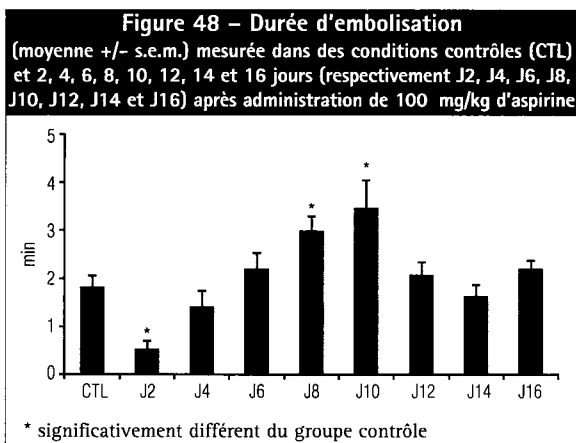
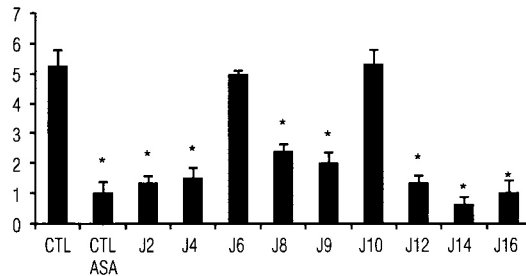
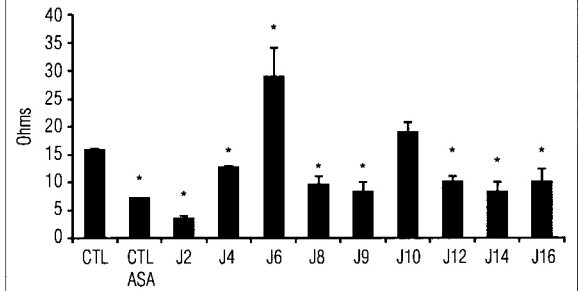


Figure 50 – Nombre d'embolies
(moyenne) mesuré 30 minutes après la dernière administration, dans des groupes d'animaux contrôles traités au sérum physiologique (CTL), traités par une dose unique d'aspirine 100 mg/kg (CTL ASA) et par deux doses d'aspirine 100 mg/kg à 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14 et 16 jours d'intervalle (respectivement J2, J4, J6, J8, J9, J10, J12, J14 et J16)



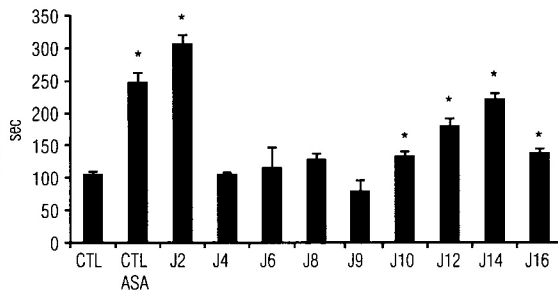
* significativement différent du groupe contrôle

Figure 52 – Amplitude de l'agrégation plaquettaire
(moyenne) mesurée 30 minutes après la dernière administration, dans des groupes d'animaux contrôles traités au sérum physiologique (CTL), traités par une dose unique d'aspirine 100 mg/kg (CTL ASA) et par deux doses d'aspirine 100 mg/kg à 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14 et 16 jours d'intervalle (respectivement J2, J4, J6, J8, J9, J10, J12, J14 et J16)



* significativement différent du groupe contrôle

Figure 51 – Temps de saignement
(moyenne) mesuré 30 minutes après la dernière administration, dans des groupes d'animaux contrôles traités au sérum physiologique (CTL), traités par une dose unique d'aspirine 100 mg/kg (CTL ASA) et par deux doses d'aspirine 100 mg/kg à 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 14 et 16 jours d'intervalle (respectivement J2, J4, J6, J8, J9, J10, J12, J14 et J16)



* significativement différent du groupe contrôle

Neutralisation de l'effet de deux doses d'aspirine¹²

Méthodes

Utilisant la technique de thrombose induite par laser, cette étude a pour objectif d'évaluer l'effet de deux doses différentes cumulées d'aspirine.

4 groupes expérimentaux sont étudiés :

- un groupe contrôle (CTL) traité au sérum physiologique,
- un groupe traité par de l'aspirine 15 CH (ASA 15 CH),
- un groupe traité par de l'aspirine 100 mg/kg (ASA 100),
- un groupe traité par de l'aspirine 100 mg/kg et de l'aspirine 15 CH (ASA 100 + 15 CH).

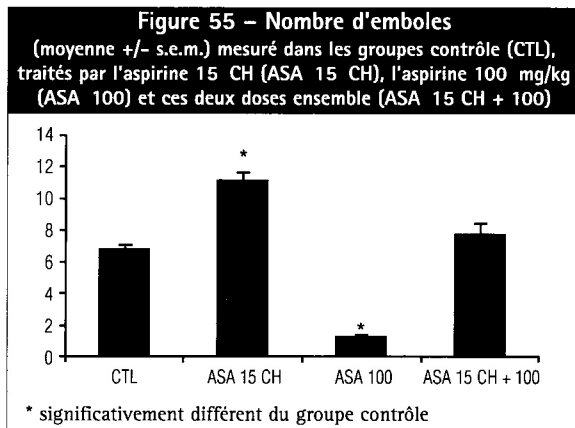
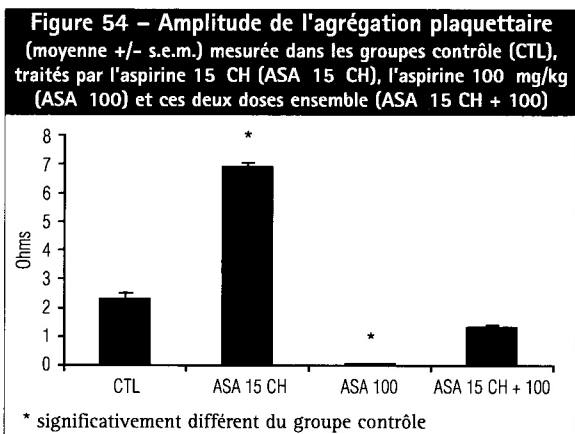
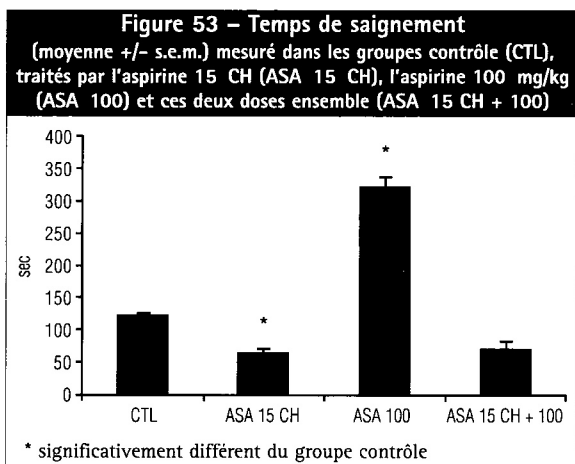
Dans tous les cas, une thrombose est induite après le traitement et les paramètres classiquement étudiés sont enregistrés.

Résultats

On retrouve dans cette étude l'action anti-agrégante (augmentation du temps de saignement [voir figure 53] et diminution de l'agrégation plaquettaire [voir figure 54]), anti-thrombotique (diminution du

nombre d'emboles [voir figure 55]) de l'aspirine à forte dose. De la même façon, on retrouve l'effet en miroir de l'aspirine 15 CH.

Il est très intéressant de noter que les effets de l'aspirine à dose pondérale sont totalement inhibés lorsque l'aspirine 15 CH est administrée en même temps. Pour la plupart des paramètres mesurés, l'action de l'association aspirine 100 mg/kg et aspirine 15 CH ne diffère pas de celle du contrôle. Cependant, la concentration plasmatique de l'aspirine dans le groupe ASA 100 + 15 CH (0,23 +/- 0,05 µmol/l) n'est pas statistiquement différent de celle du groupe ASA 100 (0,28 +/- 0,1 µmol/l).



Ainsi, il s'agit d'une neutralisation des effets des deux doses et non, bien entendu, d'une interaction entre les substances administrées.

Bien que le mécanisme responsable de cette neutralisation reste à déterminer, celle-ci pourrait avoir des applications directes dans l'utilisation de hautes dilutions d'aspirine comme antidote à l'aspirine à forte dose pour réduire les risques hémorragiques lors d'une intervention chirurgicale par exemple.

Il est intéressant de noter que ce phénomène de neutralisation a également été observé pour une autre substance, la dexaméthasone. L'addition d'une 15 CH à une dose de 0,5 mg/kg annule l'action anti-inflammatoire de cette dernière dans un modèle l'œdème à la caragénine chez la souris¹⁵.

Cinétique de neutralisation de deux doses d'aspirine¹⁴

Méthodes

Cette étude a pour but d'étudier la neutralisation de l'effet d'aspirine à dose pondérale (100 mg/kg) par l'utilisation d'aspirine 15 CH administrée 1, 2 et 3 heures après. Des techniques identiques à celles de l'étude précédente sont utilisées.

Résultats

L'aspirine 15 CH neutralise les effets de l'aspirine 100 mg/kg dans des délais variables selon les paramètres étudiés. Le temps de saignement [voir figure 56] et le nombre d'embolies [voir figure 57] sont normalisés dès la première heure alors que les paramètres de l'agrégation plaquettaire ne le sont qu'à la troisième [voir figure 58].

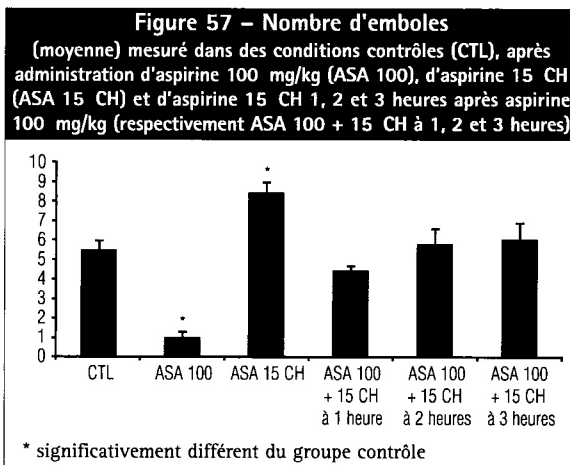
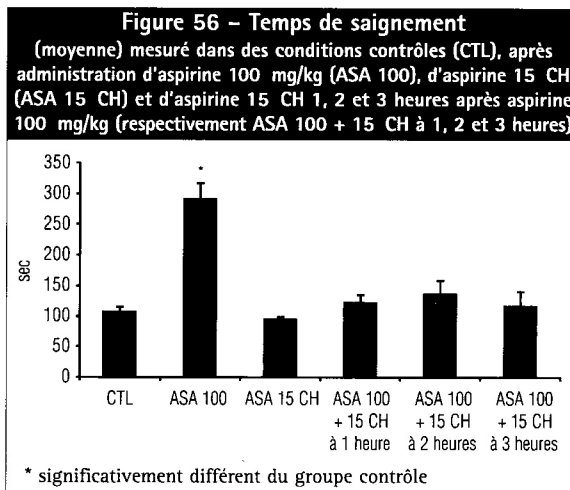
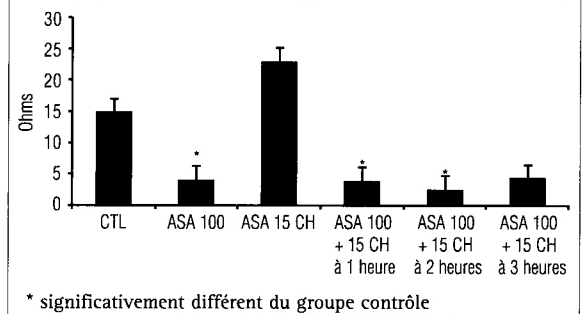


Figure 58 – Amplitude de l'agrégation plaquettaire
(moyenne) mesurée dans des conditions contrôles (CTL), après administration d'aspirine 100 mg/kg (ASA 100), d'aspirine 15 CH (ASA 15 CH) et d'aspirine 15 CH 1, 2 et 3 heures après aspirine 100 mg/kg (respectivement ASA 100 + 15 CH à 1, 2 et 3 heures)



Conclusion

Sur plusieurs modèles expérimentaux (*in vivo* et *in vitro*, chez l'homme et chez l'animal) il a été mis en évidence une action de l'aspirine à dose ultra-faible (5 CH à 30 CH soit 10^{-10} à 10^{-60} mg/ml). Cette action est pro-agrégante et thrombogène ; elle est l'opposée de celle observée avec l'aspirine à dose pharmacologique. De plus, l'aspirine 15 CH peut neutraliser les effets d'une prise d'aspirine à dose pondérale.

Ces résultats ont un intérêt théorique car ils soulignent la réalité de l'effet des très hautes dilutions. Mais ils ont également un intérêt pratique si l'utilisation d'aspirine à dose ultra-faible s'avère capable, chez l'homme, d'inhiber les risques hémorragiques liés à la prise d'aspirine à dose pharmacologique.

De nombreuses questions concernant le mécanisme d'action de l'aspirine à dose ultra-faible restent posées. Des études en cours et à venir devraient nous permettre d'enrichir encore nos connaissances sur cette substance.

Bibliographie

(par ordre chronologique)

- 1 – Doutremepuich C., Pailley D., Anne M.C., De Seze O., Paccalin J., Quilichini R., Template bleeding time after ingestion of ultra low dosages of acetyl salicylic acid in healthy subjects, Preliminary study, *Thromb. Res. Suppl.*, 1987 ; 48(4) : 501-4.
- 2 – Doutremepuich C., De Seze O., Anne M.C., Hariveau E., Quilichini R., Platelet aggregation on whole blood after administration of ultra low dosage acetylsalicylic acid in healthy volunteers, *Thromb. Res. Suppl.*, 1987 ; 47(3) : 373-7.
- 3 – Doutremepuich C., Paillet D., De Seze O., Anne M.C., Paccalin J., Quilichini R., Variation of bleeding time after administration of acetyl salicylic acid at different doses in the healthy volunteer, *Ann. Pharm. Fr.*, 1988 ; 46(1) : 35-9.
- 4 – Doutremepuich C., De Seze O., Le Roy D., Lalanne M.C., Anne M.C., Aspirin at very ultra low dosage in healthy volunteers : effects on bleeding time, platelet aggregation and coagulation, *Haemostasis*, 1990 ; 20(2) : 99-105.
- 5 – Lalanne M.C., Doutremepuich C., De Seze O., Belon P., What is the effect of acetylsalicylic acid at ultra low dose on the interaction platelets/vessel wall?, *Thromb. Res. Suppl.*, 1990 ; 60(3) : 231-6.
- 6 – Lalanne M.C., De Seze O., Doutremepuich C., Belon P., Could proteolytic enzyme modulate the interaction platelets/vessel wall in presence of ASA at ultra low doses?, *Thromb. Res. Suppl.*, 1991 ; 63(4) : 419-26.
- 7 – Lalanne M.C., Ramboer I., De Seze O., Doutremepuich C., In vitro platelets/endothelial cells interactions in presence of acetylsalicylic acid at various dosages, *Thromb. Res.*, 1992 ; 65(1) : 33-43.
- 8 – Vesvres M.H., Doutremepuich F., Lalanne M.C., Doutremepuich C., Effects of aspirin on embolization in an arterial model of laser-induced thrombus formation, *Haemostasis*, 1993 ; 23(1) : 8-12.
- 9 – Doutremepuich C., Aguejouf O., Pintigny D., Sertillanges M.N., De Seze O., Thrombogenic properties of ultra-low-dose of acetylsalicylic acid in a vessel model of laser-induced thrombus formation, *Thromb. Res.*, 1994 ; 76(2) : 225-9.
- 10 – Doutremepuich C., Aguejouf O., Belon P., Effects of ultra-low-dose aspirin on embolization in a model of laser-induced thrombus formation, *Semin Thromb. Hemost.*, 1996 ; 22 Suppl 1 : 67-70.
- 11 – Aguejouf O., Belougne-Malfatti E., Doutremepuich F., Belon P., Doutremepuich C., Thromboembolic complications several days after a single-dose administration of aspirin, *Thromb. Res.*, 1998 ; 89(3) : 123-7.
- 12 – Belougne-Malfatti E., Aguejouf O., Doutremepuich F., Belon P., Doutremepuich C., Combination of two doses of acetyl salicylic acid : experimental study of arterial thrombosis, *Thromb Res.*, 1998 ; 90(5) : 215-21.
- 13 – Aguejouf O., Malfatti E., Belon P., Doutremepuich C., Effects of acetyl salicylic acid therapy on an experimental thrombosis induced by laser beam, *Thromb. Res.*, 2000 ; 99(6) : 595-602.
- 14 – Aguejouf O., Malfatti E., Belon P., Doutremepuich C., Time related neutralization of two doses acetyl salicylic acid, *Thromb. Res.*, 2000 ; 100(4) : 317-23.
- 15 – Bonamin L.V., Martinho K.S., Nina A.L., Caviglia F., Do Rio R.G., Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects in vivo, *British Homeopathic Journal*, 2001 ; 90(4) : 198-203.