Évaluation histopathologique de l'action sur la paroi de la grande veine saphène de la mousse de polidocanol 2 % en fonction de différents ratios volumiques air-liquide.

Étude pilote portant sur dix segments de grande veine saphène *in situ*. Comptage et mesurage des bulles en microscopie optique pour chaque ratio et en fonction du temps.

Histo-pathological evaluation of the action on the wall of the great saphenous vein with 2% polidocanol foam, based on various air-liquid volumes ratio.

Pilot study on ten in situ saphenous vein great segments. Counting and measuring of bubbles in light microscopy according to for each ratio and time exposure.

Raynal P.[1], Nagy N.[2], Lelubre C.[3], Zouaoui K.[3], Nuyens V.[3], Benigni J.-P.[4]

Mémoire DUP 2014

Résumé

Introduction : La supériorité de la mousse sclérosante par rapport à la forme liquide est reconnue. Cependant il n'y a pas de consensus fort sur la concentration idéale ni sur le meilleur ratio (liquide-gaz) à utiliser.
Aucune étude n'a jusqu'à ce jour analysé la toxicité de l'injection à différents ratios et temps d'exposition d'une mousse de polidocanol (POL) 2 % sur la paroi veineuse de la grande veine saphène (GVS).

Objectifs : Qualifier et quantifier après 5 (T5') et 30 (T30') minutes d'exposition à une mousse de POL 2 %, les lésions provoquées sur la paroi veineuse de la GVS, en fonction des ratios (sclérosant-air) utilisés (1:3, 1:4, 1:5).
Étude de stabilité pour chaque ratio de la mousse par comptage et mesurage au microscope optique des bulles en fonction du temps (To à T15 minutes).

Summary

Backgrounds: *The superiority of foam sclerosant relative to liquid is recognized. However, there is no strong consensus on the ideal concentration or the best ratio liquid-gas to use.*
To date no study has analyzed the toxicity on the great saphenous vein (GSV) wall of various ratios and exposure time of foam polidocanol (POL) 2% injections.

Objectives: *Qualify and quantify after five (T5') and thirty (T30') minutes exposure to a POL 2% foam, the damages caused on the GVS wall, based on the ratio (slerosant-air) used.*
Stability study for each ratio of the foam by counting and measuring (diameter) in light microscopy, bubbles function of times (To, T5, T15 minutes).

Pierre Raynal, CHU de Charleroi, Hôpital Vésale, route de Gozée, 706, 6110 Montigny-le-Tilleul, Belgique.
1. Département de chirurgie vasculaire, CHU de Charleroi, Belgique.
2. Département d'anatomie pathologique, CHU de Charleroi, Belgique.
3. Laboratoire de médecine expérimentale, CHU de Charleroi, Belgique.
4. Phlébologue, Hôpital Begin, 94160 Saint-Mandé, France. Directeur du mémoire.
E-mail : pierre.raynal@chu-charleroi.be

Méthodes : Dix patients candidats (5H/5F) à un éveinage chirurgical de la GVS (6-12 mm de diamètre) par stripping ou invagination. Avant cela, les segments veineux sont remplis de mousse de POL 2 % aux ratios 1:3, 1:4, 1:5. Ensuite, ils sont fragmentés, prélevés, rincés et fixés dans de la formaline après 5 et 30 minutes d'exposition, puis colorés à l'hématoxyline-éosine (H&E).
Estimation histopathologique du pourcentage de cellules endothéliales résiduelles et de la profondeur des lésions de la média.
Comptage et mesurage des bulles par microscopie optique pour chaque ratio et aux temps d'exposition To', T5' et T15'.

Résultats : À T5', le ratio 1:3 inflige une destruction de l'endothélium (et dans une nettement moindre mesure de la média) plus sévère que pour les autres ratios. Cet effet diminue rapidement au cours du temps (T30') quel que soit le ratio utilisé.
Le comptage des bulles par champ, à To', indique un nombre significativement supérieur pour le ratio 1:3. À T5', pour chaque ratio on observe une importante réduction du nombre de bulles/champ.

Conclusions : À T5', le ratio 1:3 est le plus efficace sur les dommages causés à la paroi veineuse.
Aux temps d'exposition prolongés (T30'), cette différence n'est plus retrouvée ni au sein du même ratio (intra-ratio) ni des autres (inter-ratio). Il existe donc un nivellement graduel de l'atteinte pariétale qui aboutit à observer des lésions comparables quel que soit le ratio utilisé.
Les résultats des colorations spécifiques au collagène sont en cours d'analyse. L'analyse des résultats du comptage des bulles/champ vont dans la même direction. D'autres essais cliniques *in situ* sont nécessaires pour valider ces observations faites sur un faible échantillonnage. Notre recrutement se poursuit.

Mots-clés: *sclérothérapie à la mousse, paroi veineuse, modification histopathologique, concentration, ratio, polidocanol, grande veine saphène* in situ, *cellules endothéliales, lésions de la média, stabilité, biophysique.*

Methods: *Ten patients (5h/5f) candidates to a surgical stripping of the GVS (6-12 mm diameter). Before the venous segments are filled with foam POL 2%, ratios 1:3, 1:4, 1:5. Then they were fragmented, gently resected, rinsed and fixed in formalin after five and thirty minutes of exposure. H&E staining to appreciate overall vein architecture was performed for each specimen.*
Pathological examination percentage of residual endothelial cells and depth of lesions of the media.
Counting and measuring bubbles size by light microscopy for each ratio and exposure time (To', T5', T15').

Results: *At T5' the ratio 1:3 induces destruction of the endothelium more severe than for the others. These observations were made for media injury but with much lesser extent.*
This effect decreases rapidly with time (T30') whatever the ratio used.
Counting bubbles field to To' indicates a significantly greater for the 1:3 ratio. At T5' for each ratio, a serious reduction in the number of bubbles per field was found.

Conclusions: *At T5' the ratio 1:3 is the most efficient on the damage to the GSV wall. With prolonged exposure time (T30') this difference was not found for the same ratio (intra-ratio) or for a higher one (inter-ratio).*
Therefore there is a gradual levelling of the parietal lesions, which led to observe similar injury regardless of the ratio used.
The results with specific staining to the collagen are being analysed. At least the analysis of the results of bubbles/field counting are going in the same direction.
Other in situ *clinical trials are needed to confirm these results on a small sample. Our recruitment continues.*

Keywords: foam sclerotherapy, polidocanol, vein wall, great saphenous vein *in situ*, histopathological changes, endothelial cells, tunica media injury concentration, ratios, stability, biophysic behavior.

Introduction

L'objectif de cette étude est de quantifier au cours de différents temps d'exposition (T5 minutes (T5') et T30 minutes (T30')) les lésions provoquées sur la paroi veineuse de grandes veines saphènes par une mousse de polidocanol 2 % administrée *in situ* avec des ratios liquides / air ambiant variant de 1:3 à 1:4 et à 1:5.

Dans un second temps, une analyse, en microscopie optique, de la stabilité des mousses préparées aux différents ratios, aux temps To', T5' et T15', a été réalisée.

Mise au point sur la sclérothérapie

Définition

La sclérose définitive d'une veine variqueuse nécessite une destruction de la couche endothéliale mais surtout des fibres collagènes de la média au contact du produit sclérosant.

Fegan [1], puis **Schneider** et **Fischer** [2] avaient déjà démontré les aspects histologiques après sclérothérapie au tétradécyl sulfate de sodium (TDS).

Ils démontraient que le processus chimique s'étendait sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois.

Le mécanisme de la sclérose peut se détailler comme suit [3, 4] **:**

- Altération endothéliale.
- Formation d'un caillot pauvre en fibrine par stimulation de la voie extrinsèque de la coagulation par activation du facteur XII, cette activation se déroulant d'avantage dans la paroi veineuse que dans la lumière [5].

  Cette action sur les facteurs de coagulation et la fonction plaquettaire peut se poursuivre jusqu'au 5e jour.

  C.M. Hamel-Desnos et al. [6] ont récemment démontré qu'en terme d'inflammation et de coagulation, la mousse sclérosante n'a qu'un impact minimal sur le sang périphérique, avec ou sans compression post-traitement.
- L'infiltration fibrineuse maximale dans l'intima, la média et la tunique externe est retrouvée entre le 5e et le 7e jour [5].

La sclérose n'a pas pour finalité de provoquer la thrombose de la veine variqueuse mais bien de la transformer en un cordon fibreux.

Ce mécanisme est fondamental pour obtenir l'occlusion définitive de la veine à traiter et peut expliquer les moins bons résultats, à long terme, de la sclérothérapie à la mousse de la grande veine saphène par rapport aux techniques endoveineuses de chauffage à l'origine d'une profonde altération transmurale [7, 8].

E.J. Orbach (21), puis **C.M. Hamel-Desnos** et al. [9], **P. Ouvry** et al. [10] ainsi que **E. Rabe** et **J. Otto** [11] ont clairement démontré la supériorité du produit sclérosant injecté sous forme de mousse plutôt que sous forme liquidienne, notamment dans le traitement de la grande veine saphène. Pour cette raison, le produit sclérosant utilisé dans le cadre de cette étude a été injecté sous forme de mousse.

Trois familles de produits sclérosants au mécanisme d'action différent sont à la disposition du corps médical :

– les détergents dans lesquels on retrouve le polidocanol (POL) agent non-ionique et le tétradécyl sulfate de sodium (TDS), agent anionique ;
– les agents osmotiquement actifs (hypersaline sodium) ;
– les agents irritants chimiques dont fait partie la glycérine chromée.

Bien que le tétradécyl sulfate de sodium (TDS) soit le plus couramment utilisé dans les pays anglo-saxons, nous avons porté notre choix sur le polidocanol (POL) car celui-ci est le plus utilisé en Europe de l'Ouest, et tout particulièrement dans notre pratique quotidienne de la phlébologie.

Mécanismes d'action des détergents

Les sclérosants détergents contiennent un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe.

Ils produisent une destruction des cellules endothéliales en interférant avec les membranes cellulaires grâce à leur grande similitude moléculaire avec les phospholipides de la bicouche lipidique membranaire. Cette adsorption réduit la tension de surface, provoquant une rapide et intense hydratation cellulaire [12].

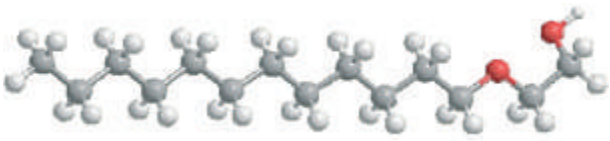
À faible concentration et basse température, la plupart des molécules de détergents se dissolvent dans la solution sans formation de micelles (qui renforcent l'action sclérosante). La toxicité au niveau de l'endothélium est alors minimale.

Par augmentation de la concentration en sclérosants et à température plus élevée (corporelle), l'effet inverse est observé avec une augmentation proportionnelle de l'effet sclérosant sur l'atteinte des cellules endothéliales.

Certains auteurs ont récemment rappelé l'interaction des sclérosants (TDS/POL) sur les membranes cellulaires [13] ainsi que leurs propriétés rhéologiques [14].

J.J. Bergan avait déjà noté des similitudes avec le détergent vaisselle, lequel produisait beaucoup plus de mousse et avait une action plus efficace lorsqu'il était utilisé dans l'eau chaude que dans l'eau froide.

Pharmacologie du polidocanol



Polidocanol Laurel Macro Gel 400 Laureth-9 ($C_{14}H_{30}O_2$) fut synthétisé pour la première fois en 1936 et principalement utilisé comme anesthésique topique dans les crèmes et lotions pour irritation de la peau, brûlures, piqûres d'insectes mais également comme anesthésique épidural.

Ce n'est que dans les années 1960 que ses propriétés d'agent sclérosant ont été révélées (alors que les propriétés sclérosantes du TDS ont été observées dès les années 1940).

Le polidocanol exerce une action sclérosante de même qu'un effet anesthésique local. Il permet par conséquent un traitement sclérosant des varices pratiquement indolore. La solubilité et la stabilité du POL sont obtenues par l'ajout de 5 % d'éthanol. Aucune donnée concernant le taux d'absorption de l'éthanol n'est disponible.

Quant à la pharmacocinétique, il est quasi totalement éliminé (90 %) après 12 heures, élimination essentiellement urinaire (clearance rénale 2,43 l/h) et fécale (clearance biliaire 3,14 l/h). Liaison aux protéines 64 %.

En Europe, la dose maximale recommandée ne peut dépasser les 2 mg par kilo. Nonobstant cela, la littérature montre de grandes variations des volumes employés selon les auteurs [15, 16, 17].

Historique

1840	**Pravaz**. 1re injection sclérosante.
1853	**Cassaignac** et **Debout** injectent du chlorure férique dans les veines variqueuses.
1925	Utilisation des sclérosants irritants (glycérine) pour les télangiectasies.
Années 1920	Utilisation des sclérosants osmotiquement actifs (hypertoniques salines).
1939	**Mac Ausland** [18] injecte l'écume d'une flapule secouée de morrhuate sodique. La sclérothérapie à la mousse est née.
1944	**E.J. Orbach** [19] met au point la technique de l'air-block, permettant par l'interposition d'une bulle d'air de séparer le liquide sclérosant du sang veineux dans les petites et moyennes veines.
1946	**I. Reiner** [20], première utilisation du TDS.
1950	**E.J. Orbach** [21] constate déjà la supériorité de la mousse sclérosante par rapport à la forme liquide dans le processus d'occlusion et du vasospasme.
1956	**P. Flückiger** [22], première sclérose à la mousse (éthanolamine oléate) selon la technique « sclérothérapie rétrograde ». Observe également la supériorité de la forme mousse.
1963	**P. Lunkenheimer** réalise le premier traitement sclérosant avec du polidocanol (2 ml).
1967	**P. Flückiger** [23] perfectionne sa technique en constituant la mousse par plusieurs allers-retours au travers d'une fiole sur laquelle est apposée une seringue.
1986	**Grigg** produit de la mousse en connectant deux seringues avec une tubulure (technique Irvine, précurseur de la technique de Tessari).
1988	**R.M. Knight** et **F. Vin** [24] initient l'injection sclérosante échoguidée.
1991	**M. Schadeck** et **F.A. Allaert** [25]. Échotomographie de la sclérose.
1993	**J. Cabrera Garrido** [26] produit de la mousse en mixant du dioxyde de carbone avec du polidocanol.
1997	**J. Cabrera Garrido** [27] publie une série de 261 grandes veines saphènes traitées par échosclérose à la mousse.
1997	**A. Monfreux** [28] met au point la méthode MUS qui permet d'obtenir la mousse avec une seringue en verre connectée à un plug générant une importante pression.
1998	**J.-P. Benigni** et **M. Sadoun** [29] proposent l'utilisation de seringues en plastique.
2000	**A. Frullini** [30] reprend la technique de Flückiger, ajoutant un adaptateur permettant l'utilisation de seringues disposables.
2000	**L. Tessari**, **A. Cavezzi**, **A. Frullini** [31, 32] mettent au point une technique de fabrication de la mousse dite « du tourbillon » en utilisant deux seringues et un robinet à trois voies. Celle-ci évoluera au cours du temps vers la « double syringe system ».
2003	**E. Rabe**, **F. Pannier-Fischer** et al. [33]. Guidelines for sclerotherapy of varicose veins.
2008	Protocole de Tegernsee.
2009	Reconnaissance internationale de la sclérothérapie à la mousse à l'UIP de Monaco.
2013	**E. Rabe** et al. [34]. European guidelines for sclerotherapy in chronic venous disorders.
2013	Nice-guidance (UK) [35]. Scléro-mousse : premier choix thérapeutique.
2014	Étude VANISH-2 (USA) [36], validant la technique de la scléro-micromousse de POL pour le traitement des veines variqueuses de C2 à C6 ainsi que des GVS d'un diamètre allant de 3,6 à 19,4 mm.

Biophysique et comportement rhéologique de la mousse [37, 38, 39, 40, 41]

Bien que différents systèmes (Varisolve™); Turbo Foam™, Easy Foam™, Stéri-Sclé-rivein™) ont été conçus pour standardiser la formation de la mousse, force est de reconnaître que leur utilisation est peu répandue en pratique courante, ce qui permet de dire qu'aucune mousse n'est pareille à une autre.

La littérature regorge d'articles étudiant différents paramètres pour obtenir la mousse sclérosante la plus efficace (« ideal foam »). Des clubs « mousse » ont été créés.

C'est ainsi qu'ont été étudiés à tour de rôle, l'influence du type et/ou de la concentration du sclérosant utilisé, le type de gaz, le ratio liquide/gaz, la méthode de préparation de la mousse, le matériel utilisé (seringues, aiguilles, connecteurs), l'intervalle de temps entre la confection de la mousse et son injection.

D'autres auteurs ont étudié le bénéfice d'associer de petites doses de glycérine [42, 43].

Toutes ces variables ont un rôle déterminant sur la qualité de la mousse qui s'évalue par sa stabilité, sa viscosité et la taille des bulles.

La littérature, d'une manière assez unanime et constante, valide les recommandations suivantes [34] :
– utilisation de seringues de 10 ml non siliconées ;

– utilisation d'aiguilles d'un calibre minimal de 25 G ;
– utilisation de l'air en tant que gaz ;
– temps le plus court possible entre la production de mousse et l'injection (maximum 60 secondes).

Impact des différentes concentrations de polidocanol

Dans son étude 3/1 [44], **C.M. Hamel Desnos** et al. démontrent une efficacité équivalente du POL dans sa concentration 1 % et 3 % dans le traitement de la grande veine saphène d'un calibre inférieur ou égal à 8 mm.

Le suivi de cette étude multicentrique, randomisée, prospective et en double aveugle, est de 2 ans.

D'autres travaux [45, 46, 47, 48] réalisés *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* sur des prélèvements de grandes veines saphènes ont été publiés et ont révélé que, quel que soit le produit utilisé (TDS *versus* POL) et/ou les concentrations testées (POL 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %), on observe une atteinte précoce (dans les 5 minutes) avec lésions intimales caractérisées par une importante perte des cellules endothéliales, une atteinte sous-endothéliale essentiellement caractérisée par un œdème et une vacuolisation des fibres musculaires lisses observée de manière inégale et superficielle.

Par contre, pour des temps d'exposition courts (5 minutes), l'élastine et le collagène étaient restés intacts aux différentes colorations testées, ainsi qu'en microscopie électronique.

Ces différentes études sont en parfaite concordance puisqu'à la fois sur un plan histologique avec temps d'exposition court que d'un point de vue échographique après un suivi de 2 ans, il n'est pas démontré que l'utilisation de polidocanol à haute concentration soit plus efficace.

Cependant, une récente étude [13] insiste sur le concept de dose-dépendante.

Choix du ratio liquide/gaz

Les données de la littérature sont moins unanimes quant à connaître le ratio idéal qui se situe, selon les auteurs, entre 1:3 et 1:5.

Les dernières recommandations européennes [34] proposent les ratios 1:4 et 1:5.

Tessari et **Coleridge Smith** [49] proposent un ratio 1:4.

A. Monfreux [40] estime qu'il y a lieu de choisir la concentration du polidocanol et le ratio en fonction de la veine à traiter.

Ainsi, il propose, pour le traitement des veinules et varicosités, l'utilisation de mousse « humide et molle » (ratio 1:2 à 1:3) avec une concentration de produit sclérosant variant de 0,125 % à 0,25 %.

Pour les veines dont le calibre est compris entre 2 et 6-7 mm, l'utilisation de « mousse moyenne » de ratio 1:4 avec une concentration de POL allant de 0,5 % à 1,5 %.

Enfin, pour les axes de gros calibres (supérieurs à 7 mm), préférer une mousse sèche et compacte dont le ratio varie entre 1:5 et 1:6, voire 1:8 avec du POL concentré à 1,5 %, 2 %, voire dans certains cas particuliers jusqu'à 3 % (absence de résultat après sclérothérapie bien conduite ; GVS de très gros calibre).

Un article récent [41] rapporte une étude réalisée en 2013 par **A. Monfreux** incluant le traitement de 84 troncs saphéniens traités par l'injection de mousse sclérosante au ratio 1:5 dont les résultats obtenus en une seule séance étaient nettement en faveur de l'utilisation d'une mousse sèche.

L'auteur propose de compléter l'observation en incluant le ratio 1:6.

Sans doute pour valider ces premiers résultats, une étude prospective sur le ratio idéal appelée best-mousse a débuté en septembre 2014 à l'initiative du Docteur **A. Monfreux**. Le formulaire d'inclusion a été adressé aux membres du forum VLC.

J.C. Wollmann [37] rapporte que la détermination du ratio optimal est variable en fonction du paramètre étudié soit le FHT (foam hall time)[1], le FDT (foam drainage time)[2] ou le FCT (foam coalescence/coarsening time)[3].

Pour le groupe FHT, la plus grande stabilité est observée pour les mousses confectionnées avec un ratio de 1:3 à 1:5. Pour celles-ci, moins de 30 % de la quantité de liquide utilisée pour préparer la mousse retourne à l'état liquide après 120 secondes.

Au-delà des 120 secondes, les temps de demi-vie les plus longs ont été trouvés pour les mousses humides correspondant aux ratios 1:2 et 1:3.

En ce qui concerne le FDT, les temps les plus longs ont été observés avec les mousses dites sèches correspondant aux ratios 1:4 et supérieurs.

Inversement, le FCT est plus long pour les mousses humides, ceci étant en concordance avec les phénomènes de mûrissement et de coalescence décrits par **A. Monfreux** [40].

En tenant compte de ces 3 paramètres, la meilleure stabilité de la mousse est obtenue avec des ratios 1:4 et 1:5 donnant un bon compromis quant à une déliquescence acceptable, l'absence de signe de drainage ou de coalescence visible dans les 35 à 55 secondes.

1. Soit le temps nécessaire à ce que la moitié du liquide sclérosant utilisé pour produire la mousse est retourné à l'état liquide.
2. Soit le temps écoulé jusqu'à ce que l'on voit débuter le drainage de la mousse.
3. Soit le temps nécessaire à l'observation de bulles visibles à l'œil nu : supérieur à 250-300 microns de diamètre ou apparition de zones libres de toutes bulles apparaissant sur le dessus de la seringue.

Certains auteurs [46] ont rapporté, dans des données non publiées, que le temps de demi-vie du TDS 1 % est de 181 secondes et de 217 secondes pour le 3 % ; que la mousse est totalement liquéfiée après 300 secondes.

À noter que ces chiffres sont variables d'une étude à l'autre puisque **A. Erkin** [45] précise que la mousse de POL est complètement liquéfiée en 287 secondes pour la concentration de 0,5 %, en 302 secondes pour 1 %, en 362 secondes pour 2 % et 450 secondes pour 3 % de concentration.

Comme mentionné plus haut et à condition que la mousse ait été confectionnée valablement, la concentration du produit sclérosant n'est pas le principal élément déterminant l'efficacité de la sclérothérapie, à savoir, l'occlusion fibrotique de la veine.

Certains auteurs ont d'ailleurs rapporté une importante atteinte endothéliale pour des faibles concentrations de mousse de polidocanol (dès 0,5 %).

K. Wong et al. [14] relèvent que la densité du sclérosant liquide diminue à mesure que la concentration augmente tandis que celle de la mousse diminue avec l'augmentation de la fraction de l'air.

D'autres paramètres sont à l'étude tels que le ratio liquide/gaz utilisé ainsi que la pression avec laquelle la mousse est confectionnée.

Matériels et méthode

Technique de prélèvements

Informations éclairées des patients sur lesquels la procédure a été réalisée.

Détermination préopératoire du stade clinique de la maladie veineuse chronique sur base du stade clinique de la classification de la CEAP révisée. Inclusions de 9 C2 et 1 C2-3.

5 hommes et 5 femmes.

Mesures préopératoires par écho-Doppler, debout sur escabeau de phlébologie, du diamètre de la grande veine saphène au tiers supérieur de la cuisse (10 à 15 cm sous le creux inguinal) correspondant au segment cartographique M1.

Description de la technique opératoire de prélèvement puis d'éveinage (invagination *versus* stripping au câble par télescopage externe selon Babcock)

Abord premier de la jonction saphéno-fémorale (JSF) et des 8 à 10 derniers centimètres de la grande veine saphène(GVS) qui seront subdivisés en 2 à 3 segments par ratio utilisé plus groupe témoin.

Après ligature juste en amont de la valvule préterminale, il est procédé à l'injection (aiguille 25 G) de la mousse de polidocanol 2 % (Chemische Fabrik Kreussler & CO, Wiesbaden, Germany) au ratio prédéfini (1/3, 1/4, 1/5) dans le segment de la GVS dont le volume de mousse dépend du calibre de la veine.

Une fois le compartiment endoluminal totalement rempli, la veine est segmentée en 2 ou 3 niveaux (soit par ligature safil ooo, soit par clip vasculaire).

Le segment veineux est alors laissé en place (*in situ*) puis prélevé à T5 minutes puis à T30 minutes après l'injection de mousse.

Chaque prélèvement sera ensuite vidé du contenu et rincé avec du sang du patient légèrement hépariné (héparine sodique Léo-Pharma) avant d'être fixé dans de la formaline. Chaque échantillon reçoit un numéro d'identification distinct qui permettra la randomnisation pour l'analyse histopathologique.

Au total, 21 échantillons (y compris le groupe témoin) répartis sur les trois ratios aux temps T5' et T30' pour 10 prélèvements de GVS réalisés entre le 10 avril et le 15 mai 2014.

Le groupe témoin comprend 3 prélèvements de GVS ayant été injectés avec du sérum physiologique de manière à déterminer l'existence d'éventuelles lésions pariétales qui seraient dues à l'administration sous pression du sérum physiologique et la participation éventuelle de phénomènes hypoxiques liés à la méthodologie (abord chirurgical de la grande veine saphène).

Analyse statistique

La normalité des distributions étudiées a été évaluée au moyen des tests de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov-Smirnov.

En fonction du caractère gaussien ou non des distributions, les statistiques de localisation sont rapportées sous la forme de moyenne ± écart-type ou de médiane (percentile 25 - percentile 75).

Les comparaisons de plus de deux groupes ont été réalisées au moyen de tests d'analyse de variance à un facteur (ANOVA) ; dans le cas de distributions non gaussiennes, des analyses de variance basées sur les rangs ont été réalisées (test de Kruskal Wallis), avec l'utilisation de tests de comparaison multiples *post hoc* en cas de nécessité.

Dans le cas de données pairées (échantillons non indépendants), les groupes ont été comparés au moyen d'un test t pour données pairées ou un test de Wilcoxon selon le caractère gaussien ou non des distributions étudiées.

Une valeur de $p < 0,05$ était retenue comme seuil de signification statistique.

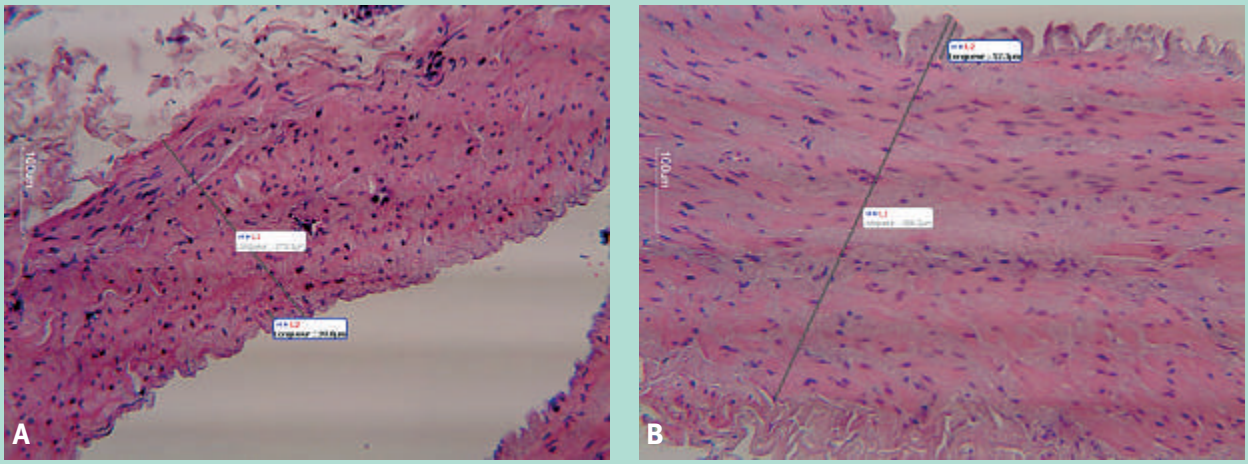


FIGURE 1 : Architecture globale d'une section (5 microns) de GVS après coloration à l'H&E. A : atteinte endothéliale. B : mesure de l'épaisseur de la média.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel SigmaPlot™ version 12.0 (Systat Software Inc., CA, USA).

Procédure d'analyse histopathologique

À la fois les prélèvements « témoins » et « mousse » sont analysés en microscopie optique (microscope Leitz grossissement × 200) après lavage et inclusion dans des blocs de paraffine pour être ensuite microtomisés et colorés à l'hématoxyline éosine (H&E).

En fonction de l'importance des lésions observées, d'autres colorations plus spécifiques au collagène et à l'élastine seront utilisées (trichrome de Masson). Cela n'a pu être réalisé dans le cadre de ce travail.

L'analyse histopathologique est confiée au service d'anatomopathologie du CHU de Charleroi qui ne connaît ni le ratio, ni le temps d'exposition des prélèvements.

Le logiciel utilisé est le Motic Images Plus 2.0 (www.motic.com).

Critères d'évaluation histopathologique

Pour chaque ratio et temps d'exposition (T5'/T30') et groupe témoin, les lésions suivantes ont été analysées :

- **Pourcentage de destruction** des cellules et isolement d'éventuels îlots de cellules endothéliales persistants (qui pourraient être à l'origine de la recanalisation par la production de facteurs angiogéniques) **(Figure 1a)**.
- **La profondeur de l'atteinte pariétale** mesurée en µm à partir de l'endothélium et de la média totale définie comme la distance entre la lumière du vaisseaux et la couche la plus externe des fibres musculaires lisses **(Figure 1b)**.
- **Étude descriptive** de l'atteinte lésionnelle sous forme d'un œdème de la média, d'une vacuolisation des fibres musculaires lisses, de l'intégrité ou de l'atteinte des fibres musculaires.

Comptage microscopique du nombre et du diamètre des bulles

La mousse a été confectionnée pour chaque ratio selon la technique du tourbillon avec un robinet à 3 voies par 20 allers-retours.

Au dixième, l'un des pistons, non revêtu de silicone, est bloqué au fond de la seringue alors qu'une forte pression est donnée sur l'autre pendant 6 à 7 allers-retours puis la manœuvre se poursuit.

La mousse obtenue est placée, avec une aiguille de 23G, sur une lame. L'échantillon n'est pas recouvert d'une lamelle couvre-objet afin de ne pas l'aplatir et imposer une contrainte externe susceptible de modifier la configuration des bulles (aspect polygonal des bulles).

On analyse au grossissement × 100 les bulles qui présentent une importante agitation (coalescence) ce qui nécessite d'attendre environ 15 à 20 secondes avant d'avoir un champ plus stable permettant une capture d'écran (NIS-Elements, D 3.00, SP5, Nikon Corporation) suffisamment nette que pour effectuer le comptage **(Figure 2)**.

Les images numérisées sont ouvertes avec le programme image J (NIH-Image software, Bethesda, MD, USA). Une grille est placée sur l'image pour le comptage des bulles **(Figure 3)**.

En raison de la disposition de la mousse sur la lame (non couverte d'une lamelle), on ne peut pas faire une mise au point correcte pour toute la surface d'un champ.

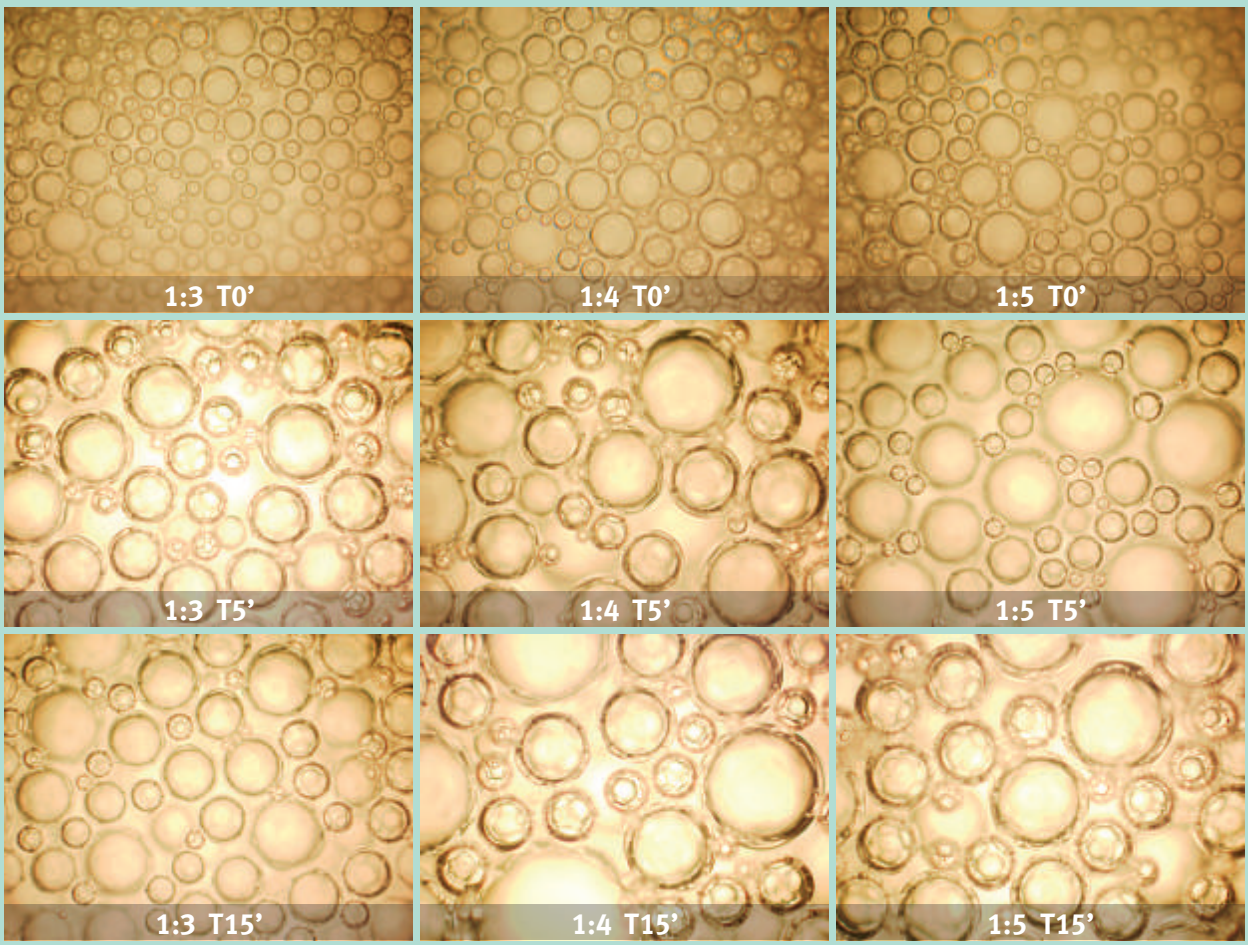


FIGURE 2 : Nombre de bulles / champ /ratio/T.

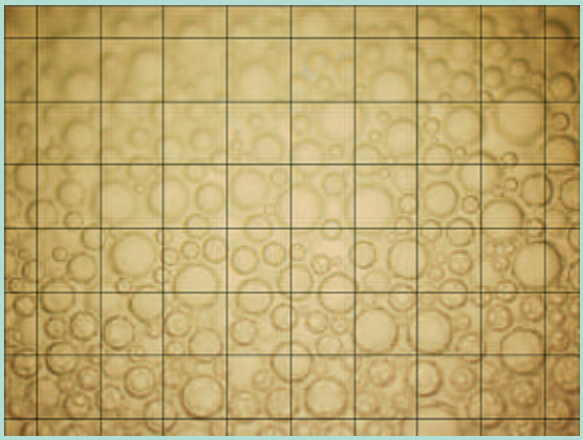


FIGURE 3 : Grille de comptage.

La mise au point est faite pour qu'au moins la moitié de l'image soit exploitable.

Grâce à la grille la moitié des bulles d'un champ est comptabilisé et ensuite le résultat est multiplié par 2.

Trois images ont été réalisées par condition. Les résultats sont exprimés en moyenne, écart-type et un test de Student est réalisé.

Pour la détermination du diamètre, la mesure a été faite sur 6 bulles sélectionnées au hasard, ensuite une moyenne a été comptée pour chaque ratio et chaque temps d'exposition (To', T5', T15'). Comme précédemment, les résultats sont exprimés en moyenne, écart-type et un test de Student est réalisé.

Résultats

Sur le plan histologique

À T5', la destruction des cellules endothéliales semble plus ($p > 0,05$) marquée pour le ratio 1:3 que pour 1:4 et 1:5. Différence inter-ratio entre T5' et T30', l'atteinte ne semble pas ($p > 0,05$) aggravée selon le ratio étudié. Pas de différence intra-ratio.

En ce qui concerne l'atteinte en profondeur de la média, des lésions sont observées dans les couches les plus médiales (en sous-intimal).

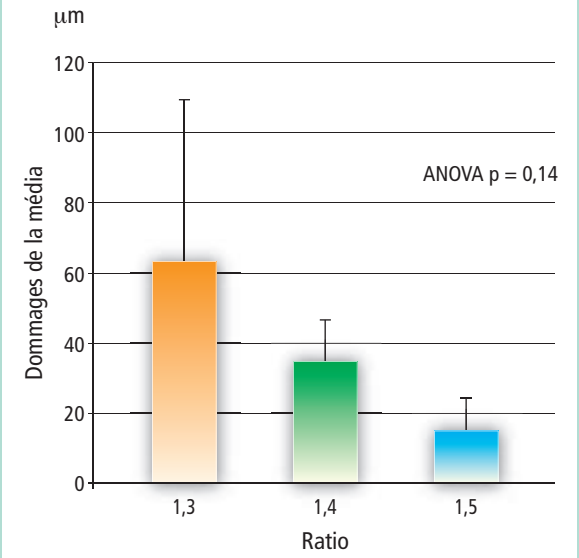


FIGURE 4 : Profondeur des dommages de la média (en µm).

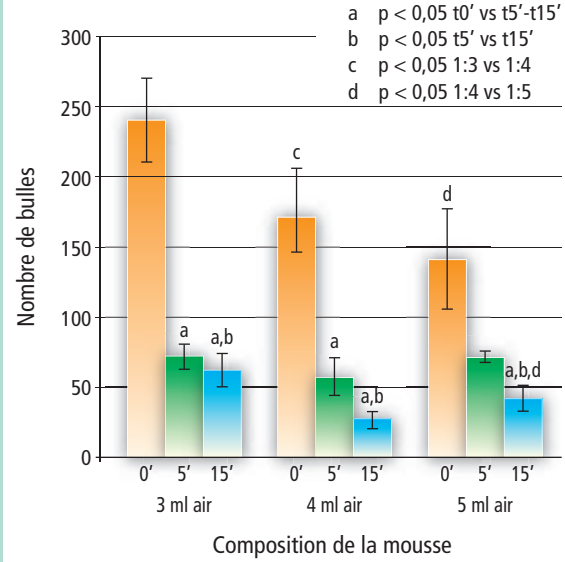


FIGURE 5 : Nombre des bulles en fonction du temps et par ratio.

La coloration se limitant à H&E, une atteinte ciblée des fibres musculaires, nécessitant d'autres colorants spécifiques, n'a pu être réalisée dans le cadre de ce présent travail, mais fera l'objet d'un compte rendu ultérieur.

Cependant, les résultats publiés jusqu'alors indiquent assez clairement le peu et la faible pénétration des lésions observées dans la média.

D'un point de vue statistique, en comparant deux à deux, par *paired t-test*, les ratios à T5' et T30', on ne voit pas de différences significatives dans les dommages provoqués au niveau des cellules endothéliales et/ou dans la profondeur de la média.

En comparant, par test ANOVA, les différents ratios à T5', on observe un trend très intéressant en faveur d'une efficacité nettement supérieure pour le ratio 1:3 **(Figure 4)**.

Le faible recrutement ne permet pas de tirer de conclusion.

L'inclusion de prélèvements de GVS se poursuit afin de doubler l'effectif, ce qui permettra une analyse statistique plus puissante.

Cette même tendance se retrouve dans l'atteinte de la média, mais dans une moindre mesure.

Comptage des bulles

À To, on constate que le nombre de bulles par champ est significativement supérieur pour le ratio 1:3 avec une moyenne de 241 bulles contre 172 et 141 bulles pour les ratios 1:4 & 1:5.

À T5, quel que soit le ratio utilisé, on constate une importante réduction du nombre de bulles/champ.

À T15, la diminution se poursuit mais de manière moins accélérée, peu significative, quel que soit également le ratio utilisé.

Entre T5 et T15, le nombre de bulles/champ est comparable d'un ratio à l'autre. À tout le moins, il n'y a pas de différence significative **(Figure 5)**.

Pour le diamètre, nous observons une tendance à l'augmentation du diamètre des bulles au cours du temps. Toutefois, seulement au ratio 1:4 entre To' et T15' une différence significative est observée. Cela est dû probablement à la variabilité de la taille des bulles. On observe en effet de grands écart-types.

Les bulles sont significativement plus petites au ratio 1:3 à T15' qu'au ratio 1:4 au même temps **(Figure 6)**.

Discussion

L'étude histopathologique des différents prélèvements, la quantification de l'atteinte pariétale et l'analyse statistique indiquent que le ratio 1:3 provoque des lésions plus sévères de la couche endothéliale et de la partie la plus médiale de la média.

L'observation qualitative et quantitative de destruction de fibres musculaires lisses et/ou de collagène après coloration spécifiques (orcéine et trichrome de Masson) n'a pas été réalisée dans le cadre de ce travail.

Rappelons toutefois que **A. Ikponmwosa** et al. [46], dans leur étude *in vivo*, n'ont remarqué aucune altération de l'élastine et du collagène en microscopie optique/électronique.

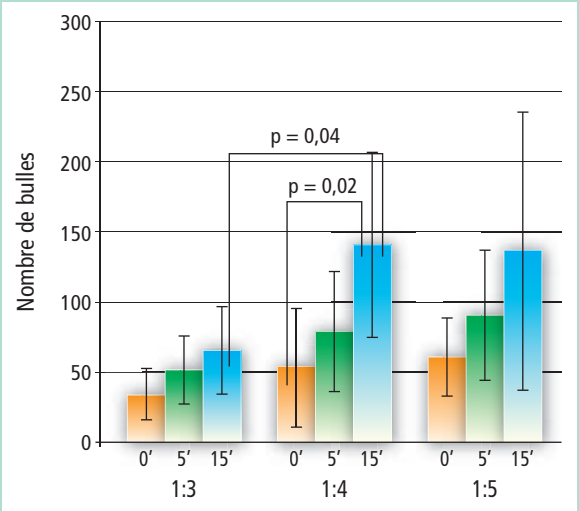


FIGURE 6 : Diamètre des bulles en fonction du temps et par ratio.

La supériorité du ratio 1:3 semble démontrée au temps T5'. Par contre, il n'y a pas de majoration des lésions pariétales observées à T30' par rapport à T5', et ce pour ce même ratio (1:3).

La même constatation est faite pour les ratios 1:4 et 1:5.

À T30', il n'a pas été prouvé que l'un ou l'autre ratio soit plus efficace. En d'autres termes, l'atteinte sur la paroi veineuse n'est pas plus marquée selon le ratio étudié.

Le comptage microscopique a démontré un nombre de bulles significativement plus élevé à To' pour le ratio 1:3, puis pour le ratio 1:4 et 1:5.

Par contre, cette différence inter- et intra-ratio s'estompe à T5' et T15'.

Ces deux analyses, réalisées sur un faible échantillonnage, donnent des résultats concordants et semblent attester d'une plus grande efficacité du ratio 1:3 à T5' pour une même concentration de polidocanol à 2 %. Cet effet s'atténue rapidement au cours du temps pour ne plus être observé à T5' et T30'.

L'interprétation de ces résultats doit tenir compte de biais méthodologiques tels que (liste non exhaustive) **:**

- séquestration entre deux ligatures/clips de la mousse sclérosante, ce qui ne correspond pas une situation physiologique ;
- le temps d'exposition de la veine au produit se fait sur un patient allongé en diastole musculaire, ce qui ne correspond pas non plus à une situation physiologique ;
- temps de contact de la mousse avec la paroi veineuse ne correspondant pas aux conditions de pratique phlébologique ;
- composante hypoxique éventuelle liée à la méthodologie (dissection, ligature) ;
- faible puissance statistique du fait d'un recrutement insuffisant, ce qui confère à cette étude un intérêt essentiellement observationnel. On ne peut ainsi parler actuellement que de tendance.

Conclusions

Dans cette étude pilote réalisée sur 10 segments de grandes veines saphènes prélevés dans une population mixte (5H/5F), nous avons décrit certains biais de notre expérience, essentiellement en rapport avec les conditions d'injection, ne correspondant pas à la pratique de la sclérothérapie et surtout au faible recrutement (qui se poursuit).

Cette remarque est cependant valable pour les rares études publiées sur ce sujet mais dont l'approche méthodologique est similaire à la nôtre [45, 46, 48].

Nonobstant cela, une tendance très encourageante est observée, indiquant qu'à T5' le ratio 1:3 induit d'avantage de dommages aux couches les plus médiales de la paroi veineuse.

Cette action se fait principalement au niveau de l'intima dont l'endothélium est quasi totalement desquamé.

L'atteinte sous-endothéliale reste très modérée.

Quant aux fibres élastiques et collagènes, non étudiées ici, certains auteurs les retrouvent intactes.

Ceci pourrait expliquer les échecs de la sclérothérapie en matière de recanalisation précoce par rapport aux techniques endoveineuses de chauffage [7, 8].

Par contre, nous avons observé qu'à T30' les lésions pariétales n'étaient pas significativement plus sévères qu'à T5' et ce, au sein d'un même ratio (intra) ou entre eux (inter).

On arrive aux mêmes constatations après examen microscopique des mousses aux temps To', T5' et T15' en matière de taille et de nombres de bulles par champ.

Nos observations et résultats s'accordent avec les données de la littérature quant à l'apparition très précoce d'une blessure (sous) intimale [45, 46, 48].

L'analyse microscopique de la mousse en donne une explication, mais indique également que sa stabilité pour une concentration de 2 % ne semble pas dépendre du ratio puisque, quel que soit celui-ci, le nombre de bulles décroît considérablement dès les 5 premières minutes.

Des études échographiques [44] et histopathologiques [45] ont souligné le rôle mineur de la concentration du polidocanol utilisé.

Certains ont signalé que le diamètre de la veine est un facteur important pour le choix de la concentration.

Il n'y a pas de véritable consensus à ce propos.

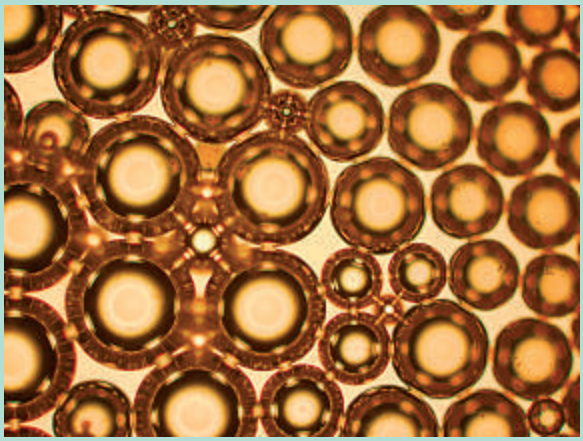


FIGURE 7 : Bulles fabriquées à 3 ATA après 15 minutes à pression ambiante (M.O. × 100).

E. Rabe et al. [34], dans leurs recommandations, préconisent l'utilisation de l'air ambiant.

Puisqu'il semble admis que « tout se passe dans les premiers instants » et eu égard à ce qui précède (concentration, stabilité, ratios, nature du gaz) ne faudrait-il pas réfléchir d'avantage au concept d'une micromousse en agissant sur un paramètre très peu étudié à ce jour, à savoir la pression avec laquelle la mousse est fabriquée ?

Certains dispositifs existent déjà sur le marché (Varisolve®, Varithena®) contenant une mousse stérile à 100 microns [50]**. Les études anglo-saxonnes Nice-guidance** [35] **et Vanish-1 et -2** [36] **ont validé l'efficacité des micro-mousses.**

N'y a-t-il pas là une voie à explorer ? (Figure 7)

Références

1. Fegan W.G., Fitzgerald D.E. A histologique assessment of continuos compression sclerotherapy. Angiology August 1965 ; 16 : 433-42.
2. Schneider W., Fischer H. On the histologie of varicose vein in man sclerosed with new sclerosing solutions. Arch. Kline Exp. Dermatol. 1964 ; Jul 31, 220 : 234-49.
3. Furie B., Furie B.C. Mechanism of thrombus formation. N. Engl. J. Med. 2008 ; 359 : 938-49.
4. Artémie P. Mechanism of action of sclerotherapy. Pharmacology of Phlebology ACP Australian meeting Sept 2007.
5. Wuppermann Th. Mécanisme de la sclérose des varices : Explorations hémostatiques, isotopiques et histologiques. Phlébologie 1991 ; 44, 1 : 23-9.
6. Hamel-Desnos C.M., Desnos P.R. *In vivo* biological effects of foam sclerotherapy. Eur. J. Endovasc. Surg. 2011 Aug ; 42(2) : 238-45.
7. Thomis S., Verbrugghe P., Milleret R. Steam ablation *versus* radiofrequency and laser ablation: an *in vivo* histological comparative trial. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2013 Sep ; 46(3) : 378-82.
8. Rasmussen L.H., Lawaetz M. Randomized clinical trial comparing endovenous laser ablation, radiofrequency ablation, foam sclerotherapy and surgical stripping for great saphenous varicose veins. Br. J. Surg. 2011 Aug ; 98(8) : 1079-87.
9. Hamel-Desnos C.M., Desnos P.R., Wollmann J.C., Ouvry P., Mako S., Allaert F.A. Evaluation of the efficacy of polidocanol in the form of foam compared with liquid form in sclerotherapy of the greater saphenous vein: initial results. Dermatol. Surg. 2003 Dec ; 29(12) : 1170-5 ; discussion 1175.
10. Ouvry P., Allaert F.A., Desnos P., Hamel-Desnos C. Efficacy of polidocanol foam *versus* liquid in sclerotherapy of the great saphenous vein: a multicentre randomised controlled trial with a 2-year follow-up. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2008 Sep ; 36(3) : 366-70.
11. Rabe E., Otto J. Efficacy and safety of great saphenous vein sclerotherapy using standardised polidocanol foam (ESAF): a randomised controlled multicentre clinical trial. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2008 Feb ; 35(2) : 238-45.
12. Duffy D.M. Sclerosants: a comparative review. Dermatol. Surg. 2010 Jun ; 36 Suppl 2 : 1010-25.
13. Parsi K. Interaction of detergent sclerosants with cell membranes. Phlebology 2014 May 14 (Epub ahead of print).
14. Wong K, Connor D.E. Basic physiological and rheological properties of detergent sclerosants. Phlebology 2014 Mar 26 (Epub ahead of print).
15. Goldman M.P, Bergan J.J, Guex J.J. Sclerotherapy treatement of varicose and telangiectasic leg veins. 4th Ed. St Louis : Mosby/Elsevier ; 2007.
16. Duffy D.M, Hsu J.T.S. Procedures in cosmetic dermatology series. The Netherlands : Elsevier ; 2006. p. 71-106.
17. Sadick N. Manual of sclerotherapy. Lippincott Williams& Wilkins ; 2000.
18. Mc Ausland S. The modern treatment of varicose veins. Med. Press. Circular 1939 ; 201 : 404-10.
19. Orbach E.J. Clinical evaluation of a new technic in the sclerotherapy of varicose veins. J. Int. Coll. Surg. 1948 Jul-Aug ; 11(4) : 396-402.
20. Reiner I. The activity of anionic surface active compounds in producing vascular obliteration. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1946 May ; 62 : 49-54.
21. Orbach E.J. A new approach to the sclerotherapy of varicose veins. Angiology 1950 Aug ; 1(4) : 302-5.
22. Flückiger P. Non-operative retrograde sclerosing of varicose veins with varsyl foam. Schweizerische medizinische Wochenschrift Dec1956 ; 1 ; 86(48) : 1368-70.
23. Flückiger P. Intraoperative obliteration of varicose veins with sodium tetradecysulfate foam in Babcock's operation. Zentralbl. Phlebol. 1967 Nov 15 ; 6(4) : 514-8.

24. Knight R.M., Vin F. Ultrasonic guidance of injection into the superficial venous system. Phlébologie, 1989. Davy A, Stemmer R (eds) John Libbey Eurotext Ltd 1989 ; 339-41.

25. Schadeck M., Allaert F.A. Échotomographie de la sclérose. Phlébologie 1991 ; 44 : 79-84.

26. Cabrera Garrido J., Cabrera Garcia Olmedo J.R. Nuevo meodo de esclorosis en las varices tronculares. Pathologia Vasculares 1993 ; 1 : 55-72.

27. Cabrera Garrido J., Cabrera Garcia Olmedo J.R. Élargissement des limites de la sclérothérapie : nouveaux produits sclérosants. Phlébologie 1997 ; 50 : 181-8.

28. Monfreux A. Traitement sclérosant des troncs saphéniens et leurs collatérales de gros calibres par la méthode MUS. Phlébologie 1997 ; 50 : 351-3.

29. Benigni J.-P., Sadoun M. Télangiectasies et varices réticulaires. Traitement par la mousse d'aetoxisclérol à 0,25 %. Présentation d'une étude pilote. Phlébologie 1999 ; 51 : 283-90.

30. Frullini A. New technique in producing sclerosing foam in a disposable syringe. Dermatol. Surg. 2000 Jul ; 26(7) : 705-6.

31. Tessari L. Nouvelle technique d'obtention de la scléro-mousse. Phlébologie 2000 ; 53 : 129.

32. Tessari L., Cavezzi A., Frullini A. Preliminary experience with a new sclerosing foam in the treatment of varicose veins. Dermatol. Surg. 2001 Jan ; 27(1) : 58-60.

33. Rabe E., Pannier-Fischer F., Gerlach H., Breu F.X., Guggenbichler S., Zabel M. German Society of Phlebology. Guidelines for sclerotherapy of varicose veins (ICD 10: I83.0, I83.1, I83.2, and I83.9). Dermatol. Surg. 2004 May ; 30(5) : 687-93 ; discussion 693.

34. Rabe E., Breu F., Cavezzi A., Smith P.C., Frullini A., Gillet J., Guex J.J., Hamel-Desnos C., Kern P., Partsch B., Ramelet A., Tessari L., Pannier F. For the Guideline Group. European guidelines for sclerotherapy in chronic venous disorders. Phlebology 2013 May 3 ; 29(6) : 338-54.

35. Marsden G., Perry M., Kelley K., Davies A.H. Guideline Development Group. Diagnosis and management of varicose veins in the legs: summary of NICE guidance. BMJ 2013 July 24 ; 347 : f4279.

36. Todd K.L. 3rd., Wright D. For the VANISH-2 Investigator Group. The VANISH-2 study: a randomized, blinded, multicenter study to evaluate the efficacy and safety of polidocanol endovenous microfoam 0.5% and 1.0% compared with placebo for the treatment of saphenofemoral junction incompetence. Phlebology 2014 Oct ; 29(9) : 608-18.

37. Wollmann J.C. Sclerosant foams: Stabilities, physical properties and rheological behavior. Phlebologie 2010 ; 39 : 208-17.

38. Wollmann J.C. An experimental model to pinpoint properties and behavior of sclerosing foams. American College of Phlebology 17th Annual Congress, san Diego ; California, August 27-31, 2003.

39. Wollmann J.C. The history of sclerosing foams. Dermatol. Surg. 2004 ; 30 : 694-703.

40. Monfreux A. Quelles mousses ? Pour quelles indications ? Phlébologie 2013 ; 66, 3 : 11-8.

41. Ratier P. L'apport du ratio 1/5 (méthode Monfreux) dans la sclérothérapie par mousse des troncs saphéniens. Phlébologie 2014, mars 2014.

42. Rial R., Hervas L.S., Monux G., Galindo A., Martin A., Hernando M., Martinez I., Hernando A., Serrano F.J. Polidocanol foam stability in terms of its association with glycerin. Phlebology 2013 May 3 ; 29(5) : 304-9.

43. Peterson J.D., Goldman M.P. An investigation on the influence of glycerin on sclerosant foam stability. Phlebology 2011 Sep ; 26(6) : 232-4.

44. Hamel-Desnos C.M., Ouvry P., Desnos P., Allaert F.A. Mousse de polidocanol à 3 % *versus* 1 % dans la sclérothérapie de la grande veine saphène : essai contrôlé randomnisé en double aveugle avec un suivi de 2 ans (3/1 study). Phlébologie 2008 ; 61 : 103-9.

45. Erkin A., Kosemehmetoglu K., Diler M.S., Koksal C. Evaluation of the minimum effective concentration of foam sclerosant in an ex-vivo study. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2012 Dec ; 44(6) : 593-7.

46. Ikponmwosa A., Abbott C., Graham A., Homer-Vanniasinkam S., Gough M.J. The impact of different concentrations of sodium tetradecyl sulphate and initial balloon denudation on endothelial cell loss and tunica media injury in a model of foam sclerotherapy. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2010 Mar ; 39(3) : 366-71.

47. McAree B., Ikponmwosa A., Brockbank K., Abbott C., Homer-Vanniasinkam S., Gough M.J. Comparative stability of sodium tetradecyl sulphate (STD) and polidocanol foam: impact on vein damage in an in-vitro model. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2012 Jun ; 43(6) : 721-5.

48. Orsini C., Brotto M. Immediate pathologic effects on the vein wall of foam sclerotherapy. Dermatol. Surg. 2007 Oct ; 33(10) : 1250-4.

49. Coleridge-Smith P. Sclerotherapy et foam sclerotherapy for varicose veins. Phlebology 2009 ; 24 : 260-9.

50. Eckmann D.M. Polidocanol for Endovenous Microfoam Sclerosant Therapy Expert. Opin. Investig. Drugs 2009 December ; 18(12) : 1919-27.