

Directives pour l'utilisation des substituts cutanés dans les plaies difficiles à cicatriser

(du 1^{er} avril 2018, révision prévue le 31 mars 2021)

L'utilisation des substituts cutanés peut accélérer la cicatrisation des plaies chroniques sous certaines conditions.

Swissmedic distingue les substituts cutanés suivants :

- Produits cellulaires vivants (produits de transplantation)
- Matériaux biologiquement actifs non vivants (produits thérapeutiques)
 - a. Cellulaires
 - b. Acellulaires

Pour pouvoir utiliser un substitut cutané, il faudra que la plaie ait été traitée dans les règles de l'art pendant quatre semaines avec un traitement concomitant des affections sous-jacentes et que la cicatrisation documentée montre peu ou pas de progression soit une réduction de surface de moins de 40 à 50 %.¹⁻⁶

On considère que le traitement de la plaie et des causes sous-jacentes est adéquat si les conditions suivantes sont remplies :

1. Un traitement adéquat des causes de la plaie nécessite un diagnostic correct selon les directives de l'AWMF⁷ (sociétés scientifiques et médicales allemandes):
 - a. En présence d'une insuffisance artérielle (en général ABI <0,9 ou > 1,3)⁽⁸⁻¹⁰⁾ la possibilité d'une revascularisation doit être considérée. Si une amélioration de la perfusion artérielle n'est pas possible par des moyens interventionnels ou chirurgicaux, l'utilisation d'un substitut cutané ne peut être faite qu'en l'absence d'une ischémie chronique critique.¹¹
 - b. En présence d'une insuffisance veineuse chronique (CEAP stade C2 à C6), une thérapie compressive adéquate doit être effectuée et une intervention chirurgicale doit être considérée.¹²⁻¹⁸
 - c. En présence d'un ulcère du pied diabétique, le diabète devra être équilibré. Une perfusion artérielle doit être garantie, l'ostéomyélite exclue et un soulagement ou une redistribution de la pression plantaire considérée.¹⁹⁻²² Une éducation thérapeutique du patient est indispensable.²³⁻²⁵

- d. Si la cause de l'ulcère n'est ni vasculaire ni diabétique, une confirmation par biopsie est nécessaire. En fonction du diagnostic, la décision de l'utilisation d'un substitut cutané peut- être décidée sur la base de la littérature publiée ou des rapports de cas.^{26,27}
- e. Les plaies tumorales et infectées sont contre-indiquées pour l'utilisation de substituts cutanés.

2. Traitement local

Le traitement local adéquat des plaies doit être effectué conformément aux normes internationales en vigueur. Il s'agit en particulier («Préparation du lit de la plaie») :²⁸

- a) Débridement des tissus nécrotiques et des couches de fibrine.
- b) Traitement respectivement prévention de l'infection
- c) Maintien du milieu humide

3. Documentation :

Les points susmentionnés doivent être documentés sous une forme appropriée.^{29,30}

En fonction de leurs propriétés et leur mécanisme d'action, une ré-application est généralement recommandée pour les substituts cutanés.³¹⁻³⁵ La fréquence de la ré-application varie selon le produit, l'intervalle est cependant généralement de 1 à 2 semaines (cf. instructions d'utilisation (IFU)). Si aucune tendance à cicatrisation n'est visible après 2 à 3 ré-applications, il faut renoncer à poursuivre la ré-application du même produit.

Dans certaines situations, comme dans le cas de plaies chroniques et post-opératoires, un substitut cutané peut être envisagé plus tôt, lorsqu'il y a de potentielles économies à réaliser, par exemple pour éviter une greffe de peau autologue. C'est en particulier le cas si :

- a) le lit de la plaie ne peut pas être suffisamment préparé pour une autogreffe de peau
- b) les autogreffes de peau antérieures n'ont pas réussi
- c) une greffe de peau autologue est contre-indiquée à cause du risque lié à l'opération
- d) une hospitalisation peut être évitée
- e) le patient refuse une greffe de peau autologue

I. Produits cellulaires vivants

Produit : Apligraf® (fabricant : Organogenesis Inc.)

Catégorie : Substitut cutané cellulaire vivant

Propriétés :

Apligraf® est une structure cellulaire cutanée vivante bicouche fabriquée selon des méthodes biologiques modernes ("bioengineered", "tissue engineered"), constituée d'une couche épidermique et d'une couche dermique. La couche épidermique, entièrement différenciée, se compose de kératinocytes allogènes humains vivants néonataux et de leurs cellules souches.³⁶ La couche inférieure dermique se compose de fibrilles de collagène bovin (6,6 % w/w) et de fibroblastes allogènes humains vivants néonataux. Ces deux types de cellule proviennent d'un prépuce de donneur. La couche épidermique représente environ 33 % et la couche dermique environ 67 % de tout l'Apligraf®. Le produit de transplantation contient du collagène bovin comme excipient et est commercialisé dans un milieu de transport complexe standardisé. Dans l'Apligraf®, les cellules vivantes (fibroblastes et kératinocytes) produisent, comme le fait notre peau, de nombreux facteurs de croissance, des cytokines et des modulateurs qui interagissent de manière positive avec l'environnement de la plaie et stimulent sa guérison. Les protéines les plus connues et les plus importantes pour la cicatrisation des plaies sont VEGF, PDGF-A et -B, EGF, FGF-1, -2 et -7, ProCollagen 1, fibronectine, tenascine, TIMP-1, TIMP-2, IL-1a, IL-6, IL-8, IL 11 et IGF-1, -2.³⁷⁻⁴⁰

Il a pu être démontré récemment qu'Apligraf® peut, en une semaine, transformer le profil génétique d'une plaie chronique en celui d'une plaie aiguë et ainsi accélérer la cicatrisation.⁴¹ L'étude a démontré qu'Apligraf présente trois modèles de transcription différents : activation des kératinocytes, modification du processus inflammatoire, modulation des signaux de facteurs de croissance et affaiblissement du chemin de signal Wnt/B-Catenin.

Indications (aperçu bibliographique) :

Avec plus de 250 publications dans des revues scientifiques professionnelles, Apligraf® est très bien documenté. Des études contrôlées randomisées prospectives ont été menées sur plus de 1500 patients.

Deux études contrôlées randomisées menées sur des patients présentant un ulcère de jambe veineux, respectivement un ulcère du pied diabétique ont montré une supériorité significative d'Apligraf® comparativement aux traitements standard et justifient son application si les mesures thérapeutiques adéquates ne montrent pas d'efficacité au bout de 4 semaines.^{34,35}

Une étude contrôlée randomisée a été consacrée aux plaies aiguës par excision (notamment, le cancer cutané) suivi d'un premier recouvrement avec Apligraf®. Mais ceci n'est ici pas analysé plus en détail.⁴²

Des études comparatives (comparative effectiveness studies) menées sur plus de 1300 patients ont également montré son efficacité en cas d'ulcères veineux et du pied diabétique.⁴³⁻

⁴⁵ La plus grande étude d'efficacité comparative publiée (comparative effectiveness study), menée dans 99 centres aux États-Unis, compare l'efficacité d'Apligraf® et d'Epifix® dans le traitement d'ulcères de pied diabétique.⁴³ Le taux de cicatrisation chez 218 patients avec 226 plaies est de 48 % pour Apligraf® et 28 % pour Epifix® observé sur 12 semaines, et de 72 % respectivement 47 % sur 24 semaines (p=0.01). Le temps nécessaire à la cicatrisation complète était de 13,3 semaines pour Apligraf® et de 26 semaines pour Epifix® de 26 semaines.

En cas de brûlures,^{46,47} d'épidermolyse bulleuse,⁴⁸⁻⁵¹ de dermatose neutrophilique (pyoderma gangrénosum),⁵² d'ulcères veineux^{53,54} et de nombreux autres types de plaie, des séries de cas, tout comme des observations de cas individuels démontrent la sécurité et l'efficacité d'Apligraf®.

Des études sur la rentabilité ont montré une réduction des coûts jusqu'à 12 % en une année, comparativement au traitement standard pour les ulcères de pied diabétique et un gain théorique pouvant aller jusqu'à 29 % en cas d'ulcères veineux.^{45,55}

Effets indésirables et contre-indications :

Avec plus 900.000 applications dans le monde, environ 0,004 % d'effets indésirables ont été décrits (en Suisse tout effet indésirable est enregistré, car Apligraf® considéré comme un produit de transplantation, est encadré par Swissmedic).

Les contre-indications sont l'hypersensibilité aux principes actifs ou à l'une des substances auxiliaires (collagène bovin) et les plaies cliniquement infectées.

Exigences pour le remboursement :

Documentation de la tendance à la cicatrisation retardée respectivement absence d'une réduction de la surface de 40-50 % après quatre semaines de traitement étiologique et local adéquat.¹⁻⁶

Avoir validé une formation de certification conformément aux directives de la société faitière SAfW et SSDV et saisie du certificat dans la base de données de la société faitière SAfW.

II. Matériaux cellulaires biologiquement actifs non vivants

Produit : Epifix® (fabricant : MiMedX Inc.)

Catégorie : Substitut cutané biologiquement actif non vivant cellulaire

Propriétés :

Epifix® est un substitut de peau allogène fabriqué à base de membrane amnios/chorion humaine. Pour l'obtention du produit Epifix®, la membrane amnios/chorion est déshydratée et stérilisée par le biais d'un procédé spécial (Purion™), qui résulte en un substitut de peau simple d'utilisation, pouvant être conservé à température ambiante.

La membrane amnios/chorion humaine, sur laquelle repose le produit, se compose de plusieurs couches : une seule couche de cellules épithéliales, une membrane basale et une matrice de tissu conjonctif avasculaire. Cette dernière contient des collagènes des types 4, 5 et 7, ainsi que des protéines spécialisées telles que fibronectine, laminine, protéoglycane et glycosaminoglycane. La membrane contient en outre divers facteurs de croissance tels que Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor β (TGF- β), Fibroblast Growth Factor (FGF) et Platelet Derived Growth Factor (PDGF).⁵⁶⁻⁶³ La membrane déshydratée est destinée à usage unique sur un seul patient.

Indications (aperçu bibliographique) :

La membrane amnios/chorion allogène déshydratée peut contribuer à accélérer la cicatrisation sur un grand nombre de plaies de nature diverse tels que l'ulcère du pied diabétique, l'ulcère variqueux qui sont particulièrement bien documentés dans la littérature. Des rapports de cas publiés ont également démontré des propriétés stimulant la cicatrisation en cas d'escarres et des plaies post-opératoires.

Les caractéristiques cliniques des produits à base de membrane amnios ont été largement décrites par des études in-vitro. Les preuves scientifiques sont apportées par des études qui ont mis en évidence la présence d'une grande quantité de facteurs de croissance tels que PDGF-AA & BB, bFGF, TGF-B1 et EGF.⁵⁹ Il est en outre bien démontré que ces facteurs de croissance sont éliminés sur une période de temps suffisamment longue.⁵⁶ D'autres études in vitro ont confirmé que les tissus de membranes amniotiques favorisent la prolifération cellulaire et la migration cellulaire.^{61,62}

Une étude clinique randomisée contrôlée prospective menée sur 25 patients présentant un ulcère du pied diabétique a comparé l'application d'Epifix® pendant deux semaines avec un

traitement de plaie standard. La réduction de la surface de la plaie après quatre semaines a été de 97,1 % avec l'Epifix® comparé à 32 % pour le traitement de plaie standard. Le nombre d'ulcères guéris après quatre et six semaines de traitement était de 77 %, respectivement 92 % pour la membrane amniotique comparativement à 0 % et 8 % pour le traitement de plaie standard.⁶⁴ Dans une étude rétrospective, 18 patients contrôlés après 9 à 12 mois ont présenté une cicatrisation complète de l'ulcère du pied diabétique obtenue sous Epifix®. 17 des 18 patients ont montré une cicatrisation durable après cette période.⁶⁵ Une comparaison entre l'application hebdomadaire d'Epifix® et l'application toutes les deux semaines sur des patients ayant un ulcère du pied diabétique a montré une cicatrisation complète sur 92,5 % des patients après une période d'étude de 12 semaines. Le temps cicatrisation avec application hebdomadaire est de 2,4 semaines comparativement à 4,1 semaines avec une application toutes les deux semaines. En moyenne, 2,4 membranes ont été nécessaires pour les patients ayant eu une l'application hebdomadaire comparativement à 2,3 pour le groupe ayant bénéficié d'une application toutes les deux semaines.³³

Deux grandes études randomisées contrôlées prospectives menées dans plusieurs centres ont démontré la supériorité du traitement avec Epifix®, comparativement à un traitement standard chez les patients présentant un ulcère veineux. Une étude sur 84 patients a comparé l'application d'Epifix® avec bandages compressifs multi-couches versus avec bandages compressifs multi-couches seuls, sur quatre semaines. Le critère d'évaluation d'une réduction supérieure à 40 % de la surface de la plaie après une période d'étude de quatre semaines a été atteint chez 62 % des patients qui ont bénéficié de l'application d'Epifix®, contre 32 % des patients ayant seulement eu un bandage multi-couche ($p=0.005$).⁶⁶ Une seconde étude menée sur 109 patients dans 15 centres a montré qu'une cicatrisation complète a pu être obtenue chez 71 % des patients après 16 semaines d'application d'Epifix®, avec bandage compressif multi-couche contre 44 % avec le bandage compressif multi-couche seul.⁶⁷

Une étude randomisée contrôlée prospective multicentrique a comparé chez 60 patients présentant des ulcères du pied diabétique, les résultats obtenus avec l'application d'Epifix®, d'Apligraf® et ceux obtenus avec un traitement standard. Sur une période d'étude de quatre semaines, une cicatrisation complète a été obtenue sur 85 % des cas traités avec Epifix® contre 35 % des cas traités avec Apligraf®, et 30 % des groupes contrôlés avec un traitement standard. Après 12 semaines, une cicatrisation complète a pu être obtenue chez 97 % des patients traités avec Epifix® contre 73 % des cas traités avec Apligraf® et 51 % des groupes contrôlés avec un traitement standard.⁶⁸ Une étude rétrospective menée sur 218 patients avec ulcère du pied diabétique, qui ont été traités dans 99 centres, a montré une cicatrisation

complète après 12 semaines dans 28 % des plaies traitées avec Epifix® contre 48 % des plaies traitées avec Apligraf® respectivement après 24 semaines, et 47 % avec Epifix® contre 72 % avec Apligraf®. Les deux dernières études randomisées contrôlées prospectives ont démontré une plus forte accélération de la cicatrisation de la plaie pour Epifix® en comparaison avec Apligraf®, dans l'analyse rétrospective cependant une efficacité supérieure de l'Apligraf® a été observée.⁴³ Les deux études ont montré une très bonne efficacité des substituts de peau en comparaison avec un traitement standard.

Outre ces études randomisées contrôlées, de nombreuses autres applications d'Epifix® ont été documentées sur des séries de cas portant sur divers types de plaies chroniques et plaies post-opératoires qui étaient réfractaires aux traitements standard.⁶⁹

Effets indésirables et contre-indications :

Aucun effet indésirable n'a été documenté jusqu'à présent dans la littérature quant aux applications décrites. L'application est contre-indiquée en cas de plaies tumorales et de plaies cliniquement infectées.

Exigences pour le remboursement :

Documentation de la tendance à la cicatrisation retardée respectivement absence d'une réduction de la surface de 40-50 % après quatre semaines de traitement étiologique et local adéquat. ¹⁻⁶

Avoir validé une formation de certification conformément aux directives de la société faîtière SAfW et SSDV et saisie du certificat dans la base de données de la société faîtière SAfW.

Produit : NuShield (fabricant : Organogenesis Inc.)

Catégorie : Substitut cutané biologiquement actif non vivant cellulaire

Propriétés :

NuShield® est une membrane placentaire complète qui, grâce au procédé BioLoc® breveté, contient toutes les couches du placenta : le chorion et l'amnios, et plus spécifiquement la couche intermédiaire spongieuse, également désignée par Spongy Layer (SL)⁵⁶, particulièrement riche en acide hyaluronique, protéoglycanes et glycoprotéines.⁷⁰⁻⁷² La couche intermédiaire SL se situe entre le chorion et l'amnios, et sépare ainsi les cellules maternelles (chorion) des cellules fœtales (amnios). Le procédé BioLoc® particulièrement doux assure que toutes les couches naturellement présentes sont conservées et confère au tissu de remarquables propriétés de résistance et de flexibilité. Ce substitut est d'un maniement très facile et conserve la teneur en protéines originelle. NuShield® contient plus de 200 protéines, notamment aussi les protéines de la matrice extracellulaire (EZM) telles que le collagène, la laminine et la fibronectine, ainsi que des facteurs de croissance angiogéniques, régénératifs et anti-inflammatoires.^{40,73} Les principaux facteurs angiogéniques sont aFGF, ANG, ANGPTL4, bFGF, EG-VEGF, PlGF, TSP-1, VEGF, les facteurs anti-inflammatoires sont TIMP-1, TIMP-2, TIMP-4, IL-1F5, IL-1Ra et les facteurs régénératifs Galectin-7, HGF, IGFBP-1, IGFBP-5, IGF-I, IGF-II, PDGF, SDF-1, TGF-β1.⁷³

Indications (aperçu bibliographique) :

NuShield® est indiqué pour recouvrir des plaies aiguës et chroniques, superficielles et profondes, par exemple des plaies avec os et tendon exposés, des ulcères de pied diabétique, des ulcères veineux, des plaies traumatiques, des escarres des plaies opératoires (déhiscences).

Les membranes placentaires s'utilisent déjà depuis plus de 100 ans dans le traitement des plaies, en chirurgie plastique reconstructrice ou pour les transplantations de la cornée, et leur application est par conséquent largement documentée.⁷⁴

Bien que NuShield ne nécessite pas d'études cliniques pour l'autorisation, Organogenesis Inc. rassemble néanmoins actuellement des données d'observation prospectives. Les expériences rassemblées jusqu'à présent dans différents types de plaies (escarres, nécrose des tissus mous, ulcères veineux et plaies traumatiques) ont montré que son utilisation est simple et que les résultats sont prometteurs avec d'excellents effets cosmétiques.

Une étude in vitro a mis en évidence la présence de cytokines et de facteurs de croissance jusqu'à 7 jours.⁷⁵ L'étude a analysé les protéines essentielles pour la cicatrisation de la plaie déjà mentionnées précédemment. Une seconde analyse a pu démontrer que NuShield a permis de réduire et a positivement influencé la réponse immunitaire des fibroblastes grâce au rôle de médiateur pro-inflammatoire des cytokines TNF- α et IL-1B.

Pour mesurer la teneur en protéines dans la matrice extracellulaire, une étude in vitro a montré que les glycoprotéines HGF, TGF-B1 et IL-1ra se trouvent essentiellement dans la couche intermédiaire (SL), tandis que le collagène 1 se trouve dans la couche épithéliale de l'amnios, et le collagène 3 plutôt dans le chorion. L'acide hyaluronique a été trouvé dans les trois couches, les protéines bFGF, VEGF et TIMP-1 sont en revanche majoritairement présentes dans le chorion.⁷⁶

Une étude menée in vitro (Gene Expression Profile) a pu démontrer que les fibroblastes et les cellules endothéliales connaissent une modification de leur code génétique, lorsqu'ils sont traités avec une membrane placentaire dévitalisée déshydrogénée.⁷⁷ De plus, les fibroblastes traités aux collagènes 3, KGM, IL-6 et HGF ont montré une modification positive lors de tests et les facteurs régénératifs GM-CSF et TGF β 3 ont été fortement régulés sur les cellules endothéliales.

Effets indésirables et contre-indications :

Jusqu'à ce jour, aucun effet indésirable n'a été répertorié.

Les contre-indications sont l'hypersensibilité aux principes actifs utilisés dans le traitement des tissus (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Vancomycin et Gentamicin) et les plaies cliniquement infectées.

Exigences pour le remboursement :

Documentation de la tendance à la cicatrisation retardée respectivement absence d'une réduction de la surface de 40-50 % après quatre semaines de traitement étiologique et local adéquat.¹⁻⁶

Avoir validé une formation de certification conformément aux directives de la société faitière SAfW et SSDV et saisie du certificat dans la base de données de la société faitière SAfW.

III. Matériaux biologiquement actifs non vivants acellulaires

Produit : Kerecis™ Omega3 Wound (fabricant : Kerecis Ltd.)

Catégorie : Substitut de peau acellulaire biologiquement actif non vivant

Propriétés :

Kerecis™ Omega3 Wound est une matrice dermique acellulaire tri-dimensionnelle (ADM) biomédicale, fabriquée à partir de peau de poisson (cabillaud de l'Atlantique Nord, *Gadus morhua*), riche en acides gras polyinsaturés omégas 3 (omega-3 polyunsaturated fatty acids, PUFA).⁷⁸ Ses propriétés stimulant la cicatrisation sont entre autres dues aux propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes des PUFA.⁷⁹⁻⁸¹ Mais elles s'expliquent également par les peptides antimicrobiennes spécifiques présentes dans la peau de poisson, responsables d'une réponse immunitaire étendue.⁸² L'ADM sert de structure support pour la croissance des cellules épidermiques en périphérie de la plaie et permet ainsi un recrutement plus rapide des fibroblastes et kératinocytes secondaires, avant sa conversion en tissu de peau fonctionnel.^{32,81}

Par ailleurs, l'ADM contient du collagène, des fibrines, des protéoglycanes ainsi que des glycoprotéines et, hormis une concentration élevée en PUFA, sa composition et sa structure vue au microscope électronique est analogue à celles de la peau humaine.^{32,82,83} Cette concentration élevée en PUFA est obtenue grâce à un procédé de traitement plus doux qu'avec l'ADM provenant de mammifères possible du fait qu'il ne peut y avoir de transmission de virus ou de prions entre cette peau de poisson et la peau humaine en raison d'une incompatibilité interespèces^{81,84}.

Comme l'ADM à base de peau de poisson est progressivement résorbé et remodelé dans la plaie, il n'est pas nécessaire de retirer le matériau résiduel.^{32,81}

Indications (aperçu bibliographique) :

Kerecis™ Omega3 Wound a été testé et utilisé dans diverses études cliniques sur de nombreuses plaies complexes et chroniques d'étiologie variée.^{32,85}

Dans une étude randomisée contrôlée de non-infériorité, l'effet de Kerecis™ Omega3 Wound a été étudié comparativement à des cellules de la sous-muqueuse de l'intestin grêle porcin (SIS) sur 81 sujets volontaires avec 162 biopsies à l'emporte-pièce de 4 mm sur l'avant-bras à une distance de 2 cm.⁷⁸ Une cicatrisation significativement plus rapide a pu être démontrée à chaque contrôle pour Kerecis™ Omega3 Wound (OR 4.75). Aucun anticorps n'a été retrouvé

lors de nombreux tests, ce qui prouve la sécurité et la non-infériorité du produit comparativement à SIS.

Une étude rétrospective multicentrique menée en Allemagne chez 23 patients avec 25 plaies complexes et chroniques traitées avec Kerecis™ Omega3 Wound.⁸⁵ montre un temps de cicatrisation de 9 à 41 semaines et une diminution de la douleur.

D'autres études de séries de cas menées dans un seul centre, documentées et publiées, démontrent de manière anecdotique l'efficacité sur des plaies complexes de différentes étiologies telles que veineuses, artério-veineuses, diabétiques, post-traumatiques et post-opératoires ainsi que des escarres de diverse catégorie.^{32,86}

Effets indésirables et contre-indications :

Dans une étude RCT un taux d'érythème de 19,5 % a été décrit, qui n'a cependant pas contraint à interrompre la thérapie et n'a eu aucun effet négatif sur le taux de guérison plus rapide comparativement à un autre substitut de peau d'origine porcine.⁷⁸

Les contre-indications sont l'allergie au poisson ainsi que les plaies cliniquement infectées.

Exigences pour le remboursement :

Documentation de la tendance à la cicatrisation retardée respectivement absence d'une réduction de la surface de 40-50 % après quatre semaines de traitement étiologique et local adéquat.¹⁻⁶

Avoir validé une formation de certification conformément aux directives de la société faîtière SAfW et SSDV et saisie du certificat dans la base de données de la société faîtière SAfW.

Pour le comité de la société faîtière SAfW :

Dr. méd. Maria Iakova, FMH Médecine interne

Dr. méd. Dieter Mayer, FMH Chirurgie et chirurgie vasculaire

Pour le comité de la SSDV :

Prof. Dr. méd. Jürg Hafner, FMH Dermatologie et vénéréologie

Prof. Dr. méd. Peter Itin, FMH Dermatologie et vénéréologie

PD Dr. méd. Severin Läuchli, FMH Dermatologie et vénéréologie

References

1. Snyder RJ, Kirsner RS, Warriner III RA, A. Lavery LA, Hanft JR, Sheehan P. Consensus Recommendations On Advancing The Standard Of Care For Treating Neuropathic Foot Ulcers In Patients With Diabetes. *Ostomy Wound Management*. 2010;56 (Suppl. 4):S1-S24.
2. Steed DL, Attinger C, Brem H, et al. Guidelines for the prevention of diabetic ulcers. *Wound Repair Regen*. 2008;16(2):169-174.
3. Robson MC, Cooper DM, Aslam R, et al. Guidelines for the treatment of venous ulcers. *Wound Repair Regen*. 2006;14(6):649-662.
4. Sheehan P, Jones P, Caselli A, Giurini JM, Veves A. Percent change in wound area of diabetic foot ulcers over a 4-week period is a robust predictor of complete healing in a 12-week prospective trial. *Diabetes Care*. 2003;26(6):1879-1882.
5. Gelfand JM, Hoffstad O, Margolis DJ. Surrogate endpoints for the treatment of venous leg ulcers. *J Invest Dermatol*. 2002;119(6):1420-1425.
6. Phillips TJ, Machado F, Trout R, Porter J, Olin J, Falanga V. Prognostic indicators in venous ulcers. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43(4):627-630.
7. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften Deutschland: Lokalthherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronisch venöse Insuffizienz. *Leitlinien-Registernummer 091 - 001 2012*;
<http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/091-001.html>.
8. Lawall H, Huppert P, Espinola-Klein C, Zemmrich CS, Ruemenapf G. German guideline on the diagnosis and treatment of peripheral artery disease - a comprehensive update 2016. *Vasa*. 2017;46(2):79-86.
9. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2017.
10. Aboyans V, Bjorck M, Brodmann M, et al. Questions and answers on diagnosis and management of patients with Peripheral Arterial Diseases: a companion document of

the 2017 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Endorsed by: the European Stroke Organisation (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J*. 2017.

11. Teraa M, Conte MS, Moll FL, Verhaar MC. Critical Limb Ischemia: Current Trends and Future Directions. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(2).
12. Hyder ON, Soukas PA. Chronic Venous Insufficiency: Novel Management Strategies for an Under-diagnosed Disease Process. *R I Med J (2013)*. 2017;100(5):37-39.
13. Dissemond J, Protz K, Hug J, Reich-Schupke S, Kroger K. [Compression therapy of chronic leg ulcers : Practical aspects]. *Z Gerontol Geriatr*. 2017.
14. Dissemond J. [Chronic leg ulcers]. *Hautarzt*. 2017;68(8):614-620.
15. Wright DD. The ESCHAR trial: should it change practice? *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*. 2009;21(2):69-72.
16. Gohel MS, Barwell JR, Taylor M, et al. Long term results of compression therapy alone versus compression plus surgery in chronic venous ulceration (ESCHAR): randomised controlled trial. *BMJ*. 2007;335(7610):83.
17. Gohel MS, Barwell JR, Earnshaw JJ, et al. Randomized clinical trial of compression plus surgery versus compression alone in chronic venous ulceration (ESCHAR study)--haemodynamic and anatomical changes. *Br J Surg*. 2005;92(3):291-297.
18. Barwell JR, Davies CE, Deacon J, et al. Comparison of surgery and compression with compression alone in chronic venous ulceration (ESCHAR study): randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;363(9424):1854-1859.
19. Mills JL, Sr. The application of the Society for Vascular Surgery Wound, Ischemia, and foot Infection (WIFI) classification to stratify amputation risk. *J Vasc Surg*. 2017;65(3):591-593.
20. Hingorani A, LaMuraglia GM, Henke P, et al. The management of diabetic foot: A clinical practice guideline by the Society for Vascular Surgery in collaboration with the American Podiatric Medical Association and the Society for Vascular Medicine. *J Vasc Surg*. 2016;63(2 Suppl):3S-21S.
21. Zhan LX, Branco BC, Armstrong DG, Mills JL, Sr. The Society for Vascular Surgery lower extremity threatened limb classification system based on Wound, Ischemia, and foot Infection (WIFI) correlates with risk of major amputation and time to wound healing. *J Vasc Surg*. 2015;61(4):939-944.

22. Mills JL, Sr., Conte MS, Armstrong DG, et al. The Society for Vascular Surgery Lower Extremity Threatened Limb Classification System: risk stratification based on wound, ischemia, and foot infection (WIFI). *J Vasc Surg.* 2014;59(1):220-234 e221-222.
23. Sekhar MS, Mk U, Vyas N, Rodrigues GS. Development and Evaluation of Patient Information Leaflet for Diabetic Foot Ulcer Patients. *Int J Endocrinol Metab.* 2017;15(3):e55454.
24. Mishra SC, Chhatbar KC, Kashikar A, Mehndiratta A. Diabetic foot. *BMJ.* 2017;359:j5064.
25. Chin YF, Yeh JT, Yu HY, Weng LC. Knowledge of the Warning Signs of Foot Ulcer Deterioration Among Patients With Diabetes. *J Nurs Res.* 2017.
26. Ghasemi F, Anooshirvani N, Sibbald RG, Alavi A. The Point Prevalence of Malignancy in a Wound Clinic. *Int J Low Extrem Wounds.* 2016;15(1):58-62.
27. Romanelli M. Atypical wounds. Introduction. *J Tissue Viability.* 2013;22(4):91.
28. Sibbald RG, Goodman L, Woo KY, et al. Special considerations in wound bed preparation 2011: an update(c). *Adv Skin Wound Care.* 2011;24(9):415-436; quiz 437-418.
29. Herberger K, Heyer K, Protz K, et al. [German national consensus on wound documentation of leg ulcer : Part 2: Routine care - classification of variable characteristics]. *Hautarzt.* 2017;68(11):896-911.
30. Heyer K, Herberger K, Protz K, et al. [German national consensus on wound documentation of leg ulcer : Part 1: Routine care - standard dataset and minimum dataset]. *Hautarzt.* 2017;68(9):740-745.
31. O'Donnell TF, Jr., Passman MA, Marston WA, et al. Management of venous leg ulcers: clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery (R) and the American Venous Forum. *J Vasc Surg.* 2014;60(2 Suppl):3S-59S.
32. Yang CK, Polanco TO, Lantis JC, 2nd. A Prospective, Postmarket, Compassionate Clinical Evaluation of a Novel Acellular Fish-skin Graft Which Contains Omega-3 Fatty Acids for the Closure of Hard-to-heal Lower Extremity Chronic Ulcers. *Wounds.* 2016;28(4):112-118.
33. Zelen CM, Serena TE, Snyder RJ. A prospective, randomised comparative study of weekly versus biweekly application of dehydrated human amnion/chorion membrane allograft in the management of diabetic foot ulcers. *Int Wound J.* 2014;11(2):122-128.
34. Veves A, Falanga V, Armstrong DG, Sabolinski ML, Apligraf Diabetic Foot Ulcer S. Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected

- neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care*. 2001;24(2):290-295.
35. Falanga V, Margolis D, Alvarez O, et al. Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. Human Skin Equivalent Investigators Group. *Arch Dermatol*. 1998;134(3):293-300.
 36. Carlson M, Faria K, Shamis Y, Leman J, Ronfard V, Garlick J. Epidermal stem cells are preserved during commercial-scale manufacture of a bilayered, living cellular construct (Apligraf(R)). *Tissue Eng Part A*. 2011;17(3-4):487-493.
 37. Brem H, Young J, Tomic-Canic M, Isaacs C, Ehrlich HP. Clinical efficacy and mechanism of bilayered living human skin equivalent (HSE) in treatment of diabetic foot ulcers. *Surg Technol Int*. 2003;11:23-31.
 38. Osborne CS, Schmid P. Epidermal-dermal interactions regulate gelatinase activity in Apligraf, a tissue-engineered human skin equivalent. *Br J Dermatol*. 2002;146(1):26-31.
 39. Schmid P. Immunohistologic characterization of Graftskin (Apligraf). *Wounds*. 2000;12(suppl A):4A-11A.
 40. Data on file, Organogenesis, Inc. In.
 41. Stone RC, Stojadinovic O, Rosa AM, et al. A bioengineered living cell construct activates an acute wound healing response in venous leg ulcers. *Sci Transl Med*. 2017;9(371).
 42. Eaglstein WH, Alvarez OM, Auletta M, et al. Acute excisional wounds treated with a tissue-engineered skin (Apligraf). *Dermatol Surg*. 1999;25(3):195-201.
 43. Kirsner RS, Sabolinski ML, Parsons NB, Skornicki M, Marston WA. Comparative effectiveness of a bioengineered living cellular construct vs. a dehydrated human amniotic membrane allograft for the treatment of diabetic foot ulcers in a real world setting. *Wound Repair Regen*. 2015;23(5):737-744.
 44. Rice JB, Desai U, Cummings AK, Birnbaum HG, Skornicki M, Parsons N. Burden of venous leg ulcers in the United States. *J Med Econ*. 2014;17(5):347-356.
 45. Marston WA, Sabolinski ML, Parsons NB, Kirsner RS. Comparative effectiveness of a bilayered living cellular construct and a porcine collagen wound dressing in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2014;22(3):334-340.
 46. Pham C, Greenwood J, Cleland H, Woodruff P, Maddern G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. *Burns*. 2007;33(8):946-957.

47. Waymack P, Duff RG, Sabolinski M. The effect of a tissue engineered bilayered living skin analog, over meshed split-thickness autografts on the healing of excised burn wounds. The Apligraf Burn Study Group. *Burns*. 2000;26(7):609-619.
48. Natsuga K, Sawamura D, Goto M, et al. Response of intractable skin ulcers in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients to an allogeneic cultured dermal substitute. *Acta Derm Venereol*. 2010;90(2):165-169.
49. Fivenson DP, Scherschun L, Cohen LV. Apligraf in the treatment of severe mitten deformity associated with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Plast Reconstr Surg*. 2003;112(2):584-588.
50. Falabella AF, Valencia IC, Eaglstein WH, Schachner LA. Tissue-engineered skin (Apligraf) in the healing of patients with epidermolysis bullosa wounds. *Arch Dermatol*. 2000;136(10):1225-1230.
51. Falabella AF, Schachner LA, Valencia IC, Eaglstein WH. The use of tissue-engineered skin (Apligraf) to treat a newborn with epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*. 1999;135(10):1219-1222.
52. Duchini G, Itin P, Arnold A. A case of refractory pyoderma gangrenosum treated with a combination of Apligraf and systemic immunosuppressive agents. *Adv Skin Wound Care*. 2011;24(5):217-220.
53. Hedayati N, Carson JG, Chi YW, Link D. Management of mixed arterial venous lower extremity ulceration: A review. *Vasc Med*. 2015;20(5):479-486.
54. Romanelli M, Gilligan AM, Waycaster CR, Dini V. Difficult-to-heal wounds of mixed arterial/venous and venous etiology: a cost-effectiveness analysis of extracellular matrix. *Clinicoecon Outcomes Res*. 2016;8:153-161.
55. Redekop WK, McDonnell J, Verboom P, Lovas K, Kalo Z. The cost effectiveness of Apligraf treatment of diabetic foot ulcers. *Pharmacoeconomics*. 2003;21(16):1171-1183.
56. Koob TJ, Lim JJ, Masee M, Zabek N, Denozziere G. Properties of dehydrated human amnion/chorion composite grafts: Implications for wound repair and soft tissue regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(6):1353-1362.
57. Koob TJ, Lim JJ, Masee M, et al. Angiogenic properties of dehydrated human amnion/chorion allografts: therapeutic potential for soft tissue repair and regeneration. *Vascular cell*. 2014;6:10.
58. Koob TJ, Lim JJ, Zabek N, Masee M. Cytokines in single layer amnion allografts compared to multilayer amnion/chorion allografts for wound healing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015;103(5):1133-1140.

59. Koob TJ, Rennert R, Zabek N, et al. Biological properties of dehydrated human amnion/chorion composite graft: implications for chronic wound healing. *Int Wound J.* 2013;10(5):493-500.
60. Maan ZN, Rennert RC, Koob TJ, Januszyk M, Li WW, Gurtner GC. Cell recruitment by amnion chorion grafts promotes neovascularization. *J Surg Res.* 2015;193(2):953-962.
61. Masee M, Chinn K, Lei J, Lim JJ, Young CS, Koob TJ. Dehydrated human amnion/chorion membrane regulates stem cell activity in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016;104(7):1495-1503.
62. Masee M, Chinn K, Lim JJ, Godwin L, Young CS, Koob TJ. Type I and II Diabetic Adipose-Derived Stem Cells Respond In Vitro to Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane Allograft Treatment by Increasing Proliferation, Migration, and Altering Cytokine Secretion. *Advances in wound care.* 2016;5(2):43-54.
63. Willett NJ, Thote T, Lin AS, et al. Intra-articular injection of micronized dehydrated human amnion/chorion membrane attenuates osteoarthritis development. *Arthritis research & therapy.* 2014;16(1):R47.
64. Zelen CM, Serena TE, Denozieri G, Fetterolf DE. A prospective randomised comparative parallel study of amniotic membrane wound graft in the management of diabetic foot ulcers. *Int Wound J.* 2013;10(5):502-507.
65. Zelen CM, Serena TE, Fetterolf DE. Dehydrated human amnion/chorion membrane allografts in patients with chronic diabetic foot ulcers: A long-term follow-up study. *Wound Medicine.* 2014;4:1-4.
66. Serena TE, Carter MJ, Le LT, Sabo MJ, DiMarco DT, EpiFix VLUSG. A multicenter, randomized, controlled clinical trial evaluating the use of dehydrated human amnion/chorion membrane allografts and multilayer compression therapy vs. multilayer compression therapy alone in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2014;22(6):688-693.
67. Bianchi C, Cazzell S, Vayser D, Reyzelman AM, Dosluoglu H, Tovmassian G. A multicentre randomised controlled trial evaluating the efficacy of dehydrated human amnion/chorion membrane (EpiFix((R))) allograft for the treatment of venous leg ulcers. *Int Wound J.* 2018;15(1):114-122.
68. Zelen CM, Gould L, Serena TE, Carter MJ, Keller J, Li WW. A prospective, randomised, controlled, multi-centre comparative effectiveness study of healing using dehydrated human amnion/chorion membrane allograft, bioengineered skin substitute or standard of care for treatment of chronic lower extremity diabetic ulcers. *Int Wound J.* 2015;12(6):724-732.

69. Selected Case Studies of PURION (R) Processed Dehydrated Human Amnion/Chorion Allografts (dHACM). In: MiMedx, ed. *EpiFix(R) Clinical Case Book* 2014:1-20.
70. Gupta A, Kedige SD, Jain K. Amnion and Chorion Membranes: Potential Stem Cell Reservoir with Wide Applications in Periodontics. *Int J Biomater.* 2015;2015:274082.
71. Vo A, Diller R, Kellar R. Characterization and Clinical Applications of Amniotic Membranes. *J of Pharmacol & Clin Res.* 2017;4(4):555645.
72. Parry S, Strauss JF, 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med.* 1998;338(10):663-670.
73. McQuilling JP, Vines JB, Kimmerling KA, Mowry KC. Proteomic Comparison of Amnion and Chorion and Evaluation of the Effects of Processing on Placental Membranes. *WOUNDS.* 2017;29(5):E36-E40.
74. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2008;15:88-99.
75. McQuilling J. Evaluation of Growth Factor Release and Stimulation of Proliferation of Wound Microenvironment Cells with Amnion/Chorion Grafts. Paper presented at: SAWC Fall 2017.
76. McQuilling J, Mowry KC. Assessment of Composition and Specificity of Extracellular Matrix and Growth Factor Targets Within Dehydrated Amnion/Chorion. *Grafts.* 2018;(in Print).
77. McQuilling J, Mowry KC. Human Amnion/Chorion Grafts Alter the Gene Expression Profile of Cells Associated with the Wound Microenvironment. *In Vitro.* 2018;(in Print).
78. Baldursson BT, Kjartansson H, Konradsdottir F, Gudnason P, Sigurjonsson GF, Lund SH. Healing rate and autoimmune safety of full-thickness wounds treated with fish skin acellular dermal matrix versus porcine small-intestine submucosa: a noninferiority study. *Int J Low Extrem Wounds.* 2015;14(1):37-43.
79. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 2014;510(7503):92-101.
80. McDaniel JC, Belury M, Ahijevych K, Blakely W. Omega-3 fatty acids effect on wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(3):337-345.
81. Magnusson S, Baldursson BT, Kjartansson H, Rolfsson O, Sigurjonsson GF. Regenerative and Antibacterial Properties of Acellular Fish Skin Grafts and Human Amnion/Chorion Membrane: Implications for Tissue Preservation in Combat Casualty Care. *Mil Med.* 2017;182(S1):383-388.

82. Rakers S, Gebert M, Uppalapati S, et al. 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Exp Dermatol.* 2010;19(4):313-324.
83. Rakers S, Niklasson L, Steinhagen D, et al. Antimicrobial peptides (AMPs) from fish epidermis: perspectives for investigative dermatology. *J Invest Dermatol.* 2013;133(5):1140-1149.
84. Magnusson S, Baldursson BT, Kjartansson H, et al. [Decellularized fish skin: characteristics that support tissue repair]. *Laeknabladid.* 2015;101(12):567-573.
85. Dorweiler B, Trinh TT, Dünschede F, al. e. Die marine Omega-3-Wundmatrix zur Behandlung komplizierter Wunden. *Gefässchirurgie.* 2017;22:558–567.
86. Baldursson BT, Magnusson S, Kjartansson H, Sigurjonsson GF, al e. 87% of Wounds Improved or Healed after 4 Weeks of Treatment with AcellularFish Skin -A Retrospective Study on 68 Wounds. Paper presented at: SAWC Spring2016.