

Université de Montréal

**Etude pilote sur l'innocuité et la faisabilité de l'emploi d'un système portable de thérapie
par pression négative réalisée sur un modèle expérimental de plaies ouvertes chez le cheval**

par Louis Kamus

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option biomédecine

Août 2017

©, Louis Kamus, 2017

Résumé et mots-clés

Objectifs : Évaluer l'efficacité du système de NPWT PICO® à contrôler la charge microbienne dans un modèle *ex vivo* de plaies cutanées chez le cheval ; évaluer la faisabilité de l'emploi de ce système portable sans réservoir pour le traitement de plaies expérimentales ouvertes et, à l'origine, évaluer son efficacité pour améliorer la guérison.

Design : Etudes expérimentales *ex vivo* et *in vivo*.

Animaux : Membres de cadavres équin (n = 9) et chevaux (n = 4).

Matériel et méthodes : Des plaies cutanées, pleine-épaisseur, ont été créées sur 9 membres de cadavres de chevaux et infectées avec un *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline (MRSA). Après 24h d'incubation, le PICO® (n = 4) ou un bandage conventionnel (n = 5) a été appliqué au hasard sur les plaies. Les CFU/mL ont été quantifiées pour chaque plaie à 0, 12 et 24 heures de traitement. A la suite des tests *in vivo*, le PICO® a été appliqué unilatéralement sur des plaies cutanées pleine-épaisseur créées sur la surface dorso-latérale du métacarpe et sur l'hémithorax de 4 chevaux, tandis que les plaies controlatérales ont reçues un soin de plaie standard avec un pansement non-adhérent.

Résultats : Les charges bactériennes en MRSA n'étaient pas significativement différentes entre les plaies traitées avec un bandage conventionnel et celles traitées avec la NPWT à aucun moment de l'étude. Tous les chevaux ont très bien toléré le PICO® mais des difficultés rencontrées avec l'adhésion et l'étanchéité ont empêché la réalisation de l'étude *in vivo* malgré l'emploi de différents adhésifs complémentaires.

Conclusion : Le PICO® n'a pas eu d'effet sur la charge en MRSA de plaies expérimentales contaminées *ex vivo* durant les premières 24h de traitement. Le design actuel du pansement PICO® doit être adapté davantage pour permettre son utilisation en pratique équine.

Mots-clés : cheval, guérison de plaie, tissu de granulation exubérant, thérapie par pression négative

Abstract and keywords

Objective: To assess the efficacy of PICO® NPWT system to control bioburden in an *ex vivo* model of cutaneous wounds in horses; to evaluate the feasibility of using this portable canister-free system to treat experimental open wounds in horses and, originally, to assess its efficacy to enhance healing.

Study design: Experimental *ex vivo* and *in vivo* studies.

Animals: Equine cadaver limbs (n = 9) and live horses (n = 4).

Methods: Full-thickness skin wounds were created on 9 cadaveric limbs of horses and infected with Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Following 24h of incubation, PICO® (n = 4) or a conventional dressing (n = 5) was randomly applied to the wounds. CFU/mL were quantified for each wound at 0, 12 and 24 hours of treatment. After preliminary *in vivo* testing, PICO® was unilaterally applied to full-thickness skin wounds created on the dorsolateral surface of the metacarpus and on the thoracic wall of 4 horses, whereas wounds on the contralateral sites received standard wound care with a non-adherent dressing.

Results: MRSA burden did not differ significantly between control and NPWT-treated wounds at any time during the study. All horses readily tolerated the PICO® but difficulties with adhesion and seal prevented the completion of the *in vivo* experiment despite the use of many adjunctive adhesives.

Conclusion: PICO® had no effect on the MRSA load of contaminated experimental *ex vivo* wounds during the first 24h of treatment. The current PICO® dressing design must be adapted further for use in equine practice.

Keywords: horse, wound healing, exuberant granulation tissue, negative pressure wound therapy

Table des matières

Résumé et mots-clés	ii
Abstract and keywords	iii
Table des matières	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations	vii
Remerciements	ix
Introduction	1
I. Recension littéraire.....	2
A. Guérison tissulaire	2
1. Hémostase	2
a) Réponse vasculaire	2
b) Formation du caillot sanguin	2
c) Plaquettes, premiers acteurs de la guérison tissulaire.....	4
2. Réponse inflammatoire aiguë	4
a) Neutrophiles	4
b) Macrophages.....	5
c) Mastocytes.....	7
3. Phase proliférative	8
a) Fibroplasie	9
b) Angiogénèse	10
c) Epithélialisation.....	11
4. Phase de remodelage	11
a) Contraction	11
b) Cicatrisation.....	12
B. Cas particulier du cheval	13

1.	L'importance des plaies dans l'espèce équine	13
2.	Particularité de la guérison cutanée chez le cheval	13
3.	Tissu de granulation exubérant équin (EGT)	16
a)	Définition.....	16
b)	Facteurs de risque.....	17
c)	Pathogénie	20
4.	Le parallèle entre les désordres fibro-prolifératifs (cutanés) de l'Homme et du cheval	23
C.	Gestion médicale du processus de guérison chez le cheval.....	25
1.	Prévention et traitement de l'EGT.....	25
a)	Prévention.....	25
b)	Traitement.....	27
2.	Médecine régénérative.....	28
3.	Traitement de plaie par pression négative (NPWT)	32
II.	Hypothèses et objectifs.....	36
III.	Article.....	37
A.	Corps	37
B.	Figures.....	48
C.	Tableaux	52
IV.	Discussion	53
	Conclusion.....	58
	Bibliographie	59

Liste des figures

Figure 1 : Illustration d'une plaie cutanée pleine épaisseur montrant les composants cellulaires et moléculaires présent 3 jours après le trauma.	5
Figure 2 : Illustration d'une plaie cutanée pleine épaisseur 5 jours après le trauma montrant l'angiogénèse, la fibroplasie et l'épithélialisation.	9
Figure 3 : Profil temporel des phases de la réparation cutanée.	14
Figure 4 : Une plaie sur l'aspect dorsal du tarse démontrant l'aspect typique de l'EGT.	16
Figure 5 : Aspect microscopique (a) de l'EGT et (b) d'un tissu de granulation plus différencié et en contraction.	17
Figure 6 : Modèle de plaies cutanées pleine épaisseur expérimentales 9 jours après la réalisation des plaies.	19
Figure 7 : Exemple de systèmes de NPWT. A, V.A.C. Via (KCI Medical Canada Inc.). B, PICO (Smith & Nephew).	34

Liste des abréviations

ADP	adénosine diphosphate (<i>adenosine diphosphate</i>)
ARNm	acide ribonucléique messager
CFU	unité formant colonie (<i>colony-forming unit</i>)
ECM	matrice extracellulaire (<i>extracellular matrix</i>)
EGF	facteur de croissance épidermique (<i>epidermal growth factor</i>)
EpSC	cellules souches épithéliales (<i>epithelial stem cells</i>)
ESC	cellules souches embryonnaires (<i>embryonic stem cells</i>)
FGF	facteur de croissance des fibroblastes (<i>fibroblast growth factor</i>)
GAP	jonctions communicantes (<i>gap junction</i>)
HIF	facteur induit par l'hypoxie (<i>hypoxia inducible factor</i>)
IGF	facteur de croissance ressemblant à l'insuline (<i>insulin-like growth factor</i>)
IL	interleukine (<i>interleukine</i>)
iNOS	oxyde nitrique synthase inductible (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
iPSC	cellules souches pluripotentes induites (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
IV	intraveineux (<i>intravenous</i>)
KGF	facteur de croissance des kératinocytes (<i>keratinocyte growth factor</i>)
MMP	métalloprotéinase matricielle (<i>matrix metalloproteinase</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (<i>methicillin resistant Staphylococcus aureus</i>)
MSC	cellules souches mésenchymateuses (<i>mesenchymal stem cells</i>)
NO	oxyde nitrique (<i>nitric oxide</i>)
NPWT	thérapie de plaie par pression négative (<i>negative pressure wound therapy</i>)

PBS	solution saline tamponnée au phosphate (<i>phosphate buffered solution</i>)
PDGF	facteur de croissance plaquette-dérivé (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PRP	plasma riche en plaquettes (<i>platelet-rich plasma</i>)
RM-ANOVA	analyse de variance à mesures répétées (<i>repeated measures analysis of variance</i>)
SD	écart type (<i>standard deviation</i>)
αSMA	actine α de muscle lisse (<i>α-smooth muscle actin</i>)
TGFβ	facteur de croissance transformant β (<i>transforming growth factor β</i>)
TIMP	inhibiteur tissulaire de métalloprotéinases (<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>)
TNFα	facteur de nécrose tumorale α (<i>tumor necrosis factor α</i>)
tPA	activateur du plasminogène tissulaire (<i>tissue plasminogen activator</i>)
TXA$_2$	thromboxane A $_2$ (<i>thromboxane A$_2$</i>)
uPA	activateur du plasminogène de type urokinase (<i>urokinase-type plasminogen activator</i>)
USDA	département de l'agriculture des Etats-Unis (<i>United States department of agriculture</i>)
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

Remerciements

A ma directrice, Dre Christine Theoret, qui m'a fait l'honneur et le plaisir de diriger ce travail avec disponibilité et bienveillance. Je suis encore plus qu'impressionné de l'expérience et des opportunités que vous m'avez offertes au cours de cette maîtrise. Beaucoup a été appris durant ce projet que ce soit sur le plan professionnel et personnel, et il semble que nous n'en avons pas encore terminé !

A ma co-directrice, Dre Sheila Laverty, pour son encadrement, sa disponibilité et ses conseils dont j'ai pu bénéficier.

A tous les membres de mon jury, Dre Sheila Laverty, Dre Milagros Freire Gonzalez, et son président, Dr Sylvain Nichols ; je vous remercie d'avoir donné de votre temps pour réviser ce mémoire. Merci pour votre contribution.

Au Dre Marie Archambault, merci pour vos conseils et pour votre participation dans la conception de ce projet.

Pour tous ceux qui m'ont aidé à compléter les différents aspects de cette étude. En particulier, Marie Rameau, merci beaucoup pour ton implication, ta disponibilité et ta ténacité ; Josée Labrie, merci pour ton aide et pour nous avoir ouvert aux arcanes de la bactériologie ; Hélène Richard, merci pour ton assistance et ton aide polyvalentes.

A l'ACVS Foundation, pour avoir financé en partie ce projet et à Smith & Nephew Canada pour la donation du matériel de pression négative.

A chacune des juments, sans qui ce projet et de futures recherches n'auraient pas été possibles.

A ma famille, qui me soutient et m'encourage toujours quel que soit la distance.

Et enfin, à ma très chère Catherine, pour ton amour, ta patience et ton support. Je ne serai pas là où je suis aujourd'hui si je ne t'avais pas à mes côtés.

Introduction

La gestion de plaie est une composante majeure de la pratique équine; en effet, l'instinct de fuite des chevaux les prédispose au trauma. Une vaste étude réalisée par l'United States Department of Agriculture (USDA) a montré que les plaies cutanées étaient une des conditions médicales les plus fréquentes affectant les équidés.¹ De plus, en Nouvelle-Zélande et en Australie, un sondage réalisé auprès de vétérinaires équins a montré que 25% des cas rencontrés étaient en rapport avec des plaies.^{2,3} Particulièrement dans le cas des chevaux destinés à une carrière athlétique, un traumatisme de la peau et des structures sous-jacentes peut rapidement devenir une situation potentiellement mortelle ou une cause de retraite.

Chez les chevaux, le processus de guérison mène souvent à une réponse inflammatoire chronique et une cicatrisation excessive associées à des résultats esthétiques et fonctionnels compromis, et ce, surtout lorsque les plaies sont sur les membres. Les plaies chroniques sont fréquemment associées à une complication spécifique au cheval : le tissu de granulation exubérant. Si le développement de cette complication n'est pas prévenu ou contrôlé, cela peut rapidement devenir un problème esthétique et fonctionnel pour l'animal.

Ce travail propose, dans un premier temps, une recension littéraire à travers une révision succincte du processus de guérison tissulaire et des particularités inhérentes à l'espèce équine, suivie de la présentation d'une sélection de différentes thérapies novatrices actuellement à l'étude chez le cheval. Dans un second temps, une étude sur la faisabilité de l'utilisation de la thérapie par pression négative pour des plaies ouvertes chez le cheval est présentée, suivie d'une discussion sur l'ensemble du travail.

I. Recension littéraire

A. Guérison tissulaire

A l'heure actuelle, le processus de guérison tissulaire est découpé en 4 phases qui se suivent et se superposent : l'hémostase, la réponse inflammatoire aiguë, la phase proliférative et la phase de remodelage.

1. Hémostase

Ethymologiquement emprunté au Grec, le mot hémostase signifie "arrêt d'un écoulement sanguin". Elle est aujourd'hui définie comme "la prévention d'une perte de sang". Ce processus est divisé en plusieurs étapes : vasoconstriction, formation d'un agrégat plaquettaire, formation d'un caillot sanguin et fibrose.

a) Réponse vasculaire

A la suite d'un traumatisme vasculaire, un phénomène de vasoconstriction se met en place provoquant la réduction du flot sanguin au site lésé.⁴ Ce processus résulte, tout d'abord, de l'action de substances relâchées par les tissus traumatisés qui provoquent un spasme myogénique local. Les phospholipides issus de la membrane lésée des cellules endothéliales sont les premiers facteurs de ce processus ; en effet, ils sont à l'origine de la cascade de l'acide arachidonique dont les produits régulent le tonus et la perméabilité vasculaire ainsi que l'agrégation plaquettaire. D'autre part, des réflexes nerveux originaires des vaisseaux traumatisés et tissus environnants viennent renforcer ce processus de vasoconstriction. Ce mécanisme adaptatif peut durer plusieurs minutes. Par la suite, une vasodilatation secondaire des vaisseaux *in situ* permet la diapédèse cellulaire ainsi que le passage de fluides et de protéines dans le milieu extravasculaire.

b) Formation du caillot sanguin

Par leur action conjointe, les phénomènes d'agrégation plaquettaire et de coagulation sanguine permettent la fermeture de la lésion vasculaire.

❖ Formation de l'agrégat plaquettaire

Issus de la fragmentation des mégacaryocytes de la moelle osseuse, les plaquettes ou thrombocytes jouent un rôle central dans l'hémostase.^{4,5} Elles ne possèdent pas de noyau et ont un cytoplasme riche en organites et granules protéiques. Ces éléments circulent librement dans le sang et sont capables d'endiguer une perte sanguine. Exposées à un endothélium traumatisé, au collagène extracellulaire, et autres protéines issues du trauma comme le facteur de von Willebrand, les plaquettes s'activent et adhèrent à l'espace extravasculaire. Elles subissent alors des modifications morphologiques et sécrètent de nombreux facteurs contenus dans leur cytoplasme et leurs granules. Par exemple, la thromboxane A₂ (TXA₂) et l'adénosine diphosphate (ADP) sont deux métabolites actifs majeurs sécrétés par les plaquettes au cours de ce processus. Ils amplifient l'activation plaquettaire et favorisent l'adhésion des plaquettes environnantes. La TXA₂ est aussi un puissant vasoconstricteur qui intervient dans la réponse vasculaire vu précédemment.

Ainsi, l'agrégat plaquettaire forme la première composante du caillot sanguin et promeut la coagulation sanguine ainsi que la formation de thrombine puis de fibrine.

❖ Coagulation sanguine et fibrose

La coagulation sanguine est le troisième mécanisme majeur de l'hémostase après la vasoconstriction et l'agrégation plaquettaire. Elle permet le renforcement de l'agrégat plaquettaire et par conséquent du "bouchon hémostatique". Ce processus est basé sur trois étapes.⁴ La première aboutit à la formation d'un complexe composé de plusieurs substances appelées "activateur de prothrombine". La formation de ce complexe est généralement considérée comme le résultat de deux cascades interconnectées : les voies extrinsèque et intrinsèque de la coagulation. La première est initiée au sein de l'endothélium lésé et des tissus environnants et la seconde prend origine dans le sang. Ces voies font intervenir plusieurs facteurs de coagulation

aboutissant à l'activateur de prothrombine. La seconde étape consiste en l'activation de la prothrombine en thrombine par ce complexe. Le fibrinogène circulant est alors transformé en fibrine par une enzyme : la thrombine. Cette fibrine solidarise l'agrégat plaquettaire et forme avec ce dernier le caillot. Celui-ci constitue la matrice extracellulaire provisoire qui sera le siège de tous les événements cellulaires et tissulaires du processus de guérison tissulaire.

c) Plaquettes, premiers acteurs de la guérison tissulaire

En dehors de leur rôle central dans l'hémostase, les plaquettes présentes au sein du caillot participent au processus de guérison tissulaire comme source de protéines et métabolites actifs.⁵ Elles stockent et relâchent une très grande variété de substances actives incluant des cytokines comme par exemple des facteurs de croissance et des chimiokines. Par l'intermédiaire de ces facteurs les plaquettes modulent la réaction inflammatoire, la prolifération et la différenciation cellulaire. Elles attirent et activent les leucocytes circulant et favorisent les interactions cellulaires. Enfin, elles participent aussi à la réponse immune innée de l'organisme en sécrétant des métabolites et protéines actifs ayant des propriétés antibactériennes et antifongiques ainsi qu'en modulant la relâche de cytokines pro-inflammatoires.

2. Réponse inflammatoire aiguë

a) Neutrophiles

Les neutrophiles sont les premiers globules blancs infiltrant la plaie. Leur arrivée est rapide et ils demeurent majoritaires durant les premières phases de la guérison. Leur première fonction est la défense contre les bactéries et les particules étrangères présentes dans la plaie. L'impact des neutrophiles sur la guérison cutanée est encore sujet à controverse⁶ car certaines études leur attribuent un rôle négatif (diminution de l'épithélialisation)⁷ et d'autres un rôle positif (stimulation de l'épithélialisation et l'angiogenèse).⁸ Cependant, ces acteurs sont aussi une source importante de cytokines pro-inflammatoires responsables de la stimulation et la différenciation du second type de globules blancs rencontré dans la plaie: les macrophages.

b) Macrophages

Les macrophages semblent jouer un rôle majeur dans le processus de guérison cutanée ; en effet, il existe de plus en plus d'évidences que ces cellules expriment différents phénotypes associés à différentes fonctions au cours de la progression du processus de guérison cutanée.

Les monocytes circulants migrent dans la plaie en réponse aux signaux chimioattractants. Au cours de la guérison, les macrophages semblent exercer différentes fonctions selon leur interaction avec le tissu environnant (Figure 1).^{9,10}

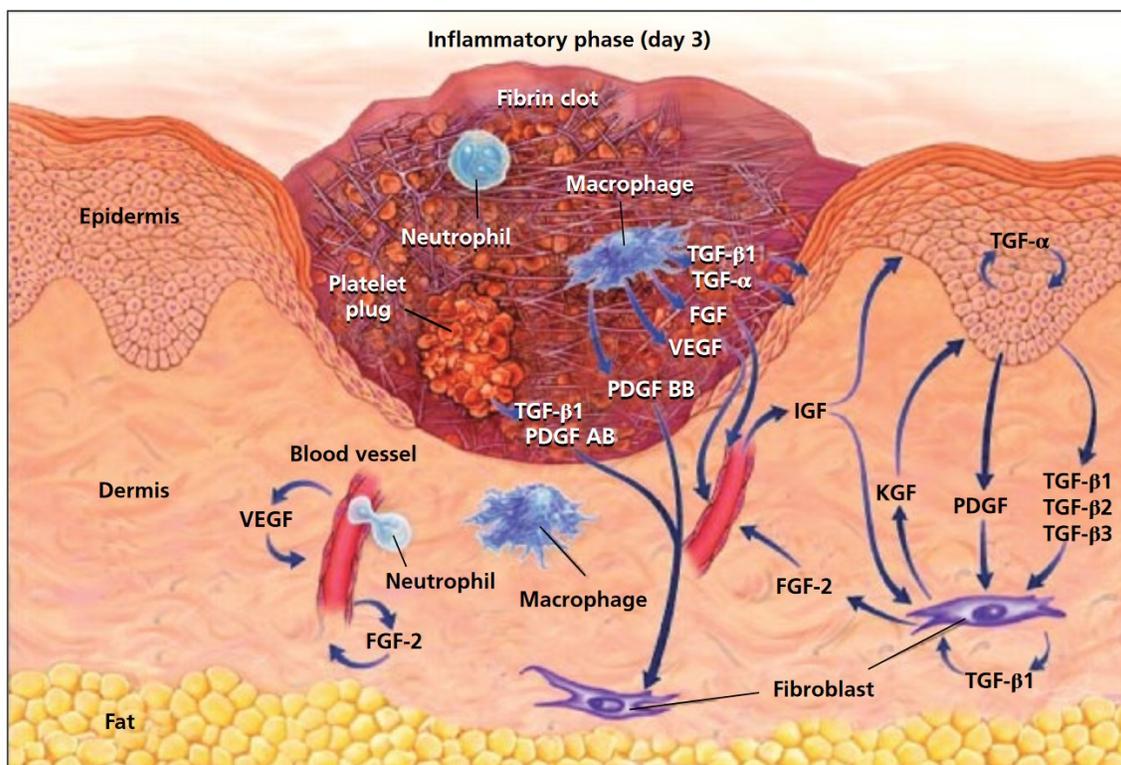


Figure 1 : Illustration d'une plaie cutanée pleine épaisseur montrant les composants cellulaires et moléculaires présent 3 jours après le trauma.

FGF, facteur de croissance des fibroblastes, IGF, facteur de croissance ressemblant à l'insuline, KGF, facteur de croissance des kératinocytes, PDGF, facteur de croissance plaquette-dérivé, TGF, facteur de croissance transformant, VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, .D'après Singer et al., 1999.¹¹

❖ Stimulation de l'inflammation

Au contact de différentes cytokines pro-inflammatoires, interférons ou produits microbiens le macrophage développe un phénotype "classique" inflammatoire. Il devient alors une source de nombreux facteurs pro-inflammatoires : interleukines (IL-1, IL-6, IL-12), facteur de nécrose tumorale α (TNF α), oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). Il produit aussi des facteurs chimioattractants, recrutant ainsi plus de leucocytes au sein de la plaie.

❖ Élimination des neutrophiles et des produits de l'apoptose cellulaire

Les neutrophiles présents dans la plaie ont pour rôle primaire de lutter contre d'éventuelles infections et particules étrangères. Cependant, une fois ce rôle rempli, ils sont éliminés car leur présence peut être délétère pour la plaie (modifications de la matrice extracellulaire (ECM), génération de stress oxydatif important). Ce contingent de cellules est classiquement éliminé par apoptose. Les nombreux débris cellulaires générés par ce processus sont éliminés par phagocytose des macrophages. Le rôle des macrophages est donc ici primordial. Ils sont le seul moyen effectif d'éliminer les neutrophiles car ils sont capables d'induire l'apoptose des neutrophiles, de la reconnaître et d'éliminer ses produits. Enfin, il a été suggéré que ce phénomène d'apoptose et d'élimination des débris pourrait provoquer un basculement du phénotype pro-inflammatoire des macrophages vers un phénotype favorisant la phase proliférative de la guérison cutanée.

❖ Stimulation de l'angiogenèse, de la prolifération des fibroblastes et de la production de l'ECM (Figure 1)

Il est considéré que les macrophages, de par leur sécrétion de facteurs de croissance, ont une influence sur la prolifération cellulaire, la synthèse de protéines, la production des protéases et de leurs inhibiteurs. Cependant, cette notion est critiquée dans la mesure où de nombreuses cellules (leucocytes, fibroblastes, kératinocytes, cellules endothéliales, adipocytes) produisent le même type de facteurs de croissance. Par exemple, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

(VEGF, pro-angiogénique majeur) est produit par les macrophages mais aussi en grande partie par les kératinocytes. D'autre part, dans la mesure où certains facteurs ont plusieurs effets sur différentes cellules de la guérison, il est aussi difficile de déterminer un effet principal.

❖ Fonction anti-inflammatoire et régénérative

Plusieurs études *in vitro* suggèrent que les macrophages sont capables d'évoluer de leur phénotype pro-inflammatoire "M1" vers un phénotype alternatif "M2" caractérisé par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et de facteurs de croissance stimulant les phases proliférative et de remodelage de la guérison cutanée. Les macrophages peuvent ainsi altérer l'ECM durant la phase de remodelage en sécrétant des enzymes spécifiques (Figure 2). Cependant, la réalité *in vivo* ne semble pas être aussi simple et il y a des preuves d'existence de macrophages hybrides, de phénotypes intermédiaires, entre ces deux états.

Bien que des travaux récents ont montré, avec un modèle de souris génétiquement modifiées, que le macrophage n'est pas forcément essentiel à la guérison tissulaire,¹² il semble quand même être une cellule inflammatoire majeure du processus de guérison responsable du débridement mais aussi de la sécrétion de nombreuses cytokines, du recrutement d'autres cellules inflammatoires et mésenchymateuses, ainsi que la stimulation de l'angiogenèse, la fibroplasie, l'épithélialisation et le remodelage tissulaire. De nombreuses recherches sont réalisées en ce sens afin de comprendre les différents phénotypes et fonctions de ces cellules ainsi que leur implication dans les différents processus pathologiques.

c) Mastocytes

Les mastocytes jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée. Ces cellules ont historiquement d'abord été associées aux réactions allergiques mais elles interviennent aussi dans d'autres situations comme la guérison cutanée.^{13,14}

Très présentes dans le derme, ces cellules stockent et produisent de nombreux médiateurs de l'inflammation. Elles sont impliquées dans le recrutement des cellules inflammatoires,

l'augmentation de la perméabilité vasculaire (histamine, VEGF) et la lutte contre les agents pathogènes (peptides antimicrobiens et recrutement des neutrophiles). Via différents facteurs de croissance, les mastocytes stimulent les kératinocytes (facteur de croissance des kératinocytes (KGF), facteur de croissance épithélial (EGF)) et les cellules endothéliales (VEGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF-2)).

Les mastocytes ont été associés à la formation de cicatrice ; en effet, ils sont retrouvés en faible nombre dans les plaies sans cicatrice (muqueuse orale et plaies fœtales) et en grand nombre dans les désordres fibro-prolifératifs cutanés chez l'Homme (chéloïdes et cicatrices hypertrophiques). Plusieurs mécanismes sont étudiés par rapport à l'action des mastocytes sur les fibroblastes : la production de médiateurs paracrines stimulant les fibroblastes (facteur de croissance transformant β (TGF- β), PDGF, histamine, chymase) et les interactions directes avec les fibroblastes via les jonctions GAP (communicantes).

Cependant, de nombreuses questions restent en suspens. Les mastocytes sécrètent aussi bien des cytokines pro-inflammatoires qu'anti-inflammatoires (IL-4, IL-10). Cela suggérerait potentiellement un rôle pro-inflammatoire dans les phases aiguës de la guérison et un rôle anti-inflammatoire dans les phases plus tardives de la guérison. Cette dualité pourrait avoir un lien avec les différentes caractéristiques de l'environnement de plaie qui évolue avec le processus de guérison ou alors avec la localisation (centre vs. périphérie) au sein de la plaie.

3. Phase proliférative

A la suite de la phase inflammatoire, différents processus visant à remplacer le tissu manquant au sein de la plaie vont se mettre en place : l'épithélialisation, la fibroplasie et l'angiogénèse.^{11,15,16}

La phase proliférative correspond macroscopiquement à l'apparition du tissu de granulation qui vient combler le vide créé par le trauma. Ce tissu de granulation est composé de trois éléments : les macrophages, les fibroblastes et le nouveau réseau vasculaire. Les macrophages participent au débridement et sont une source de facteurs stimulant la fibroplasie et l'angiogénèse. Les fibroblastes prolifèrent et synthétisent la nouvelle matrice extracellulaire. Le nouveau réseau

vasculaire apporte les nutriments et l'oxygène nécessaires au bon fonctionnement des tissus en formation.

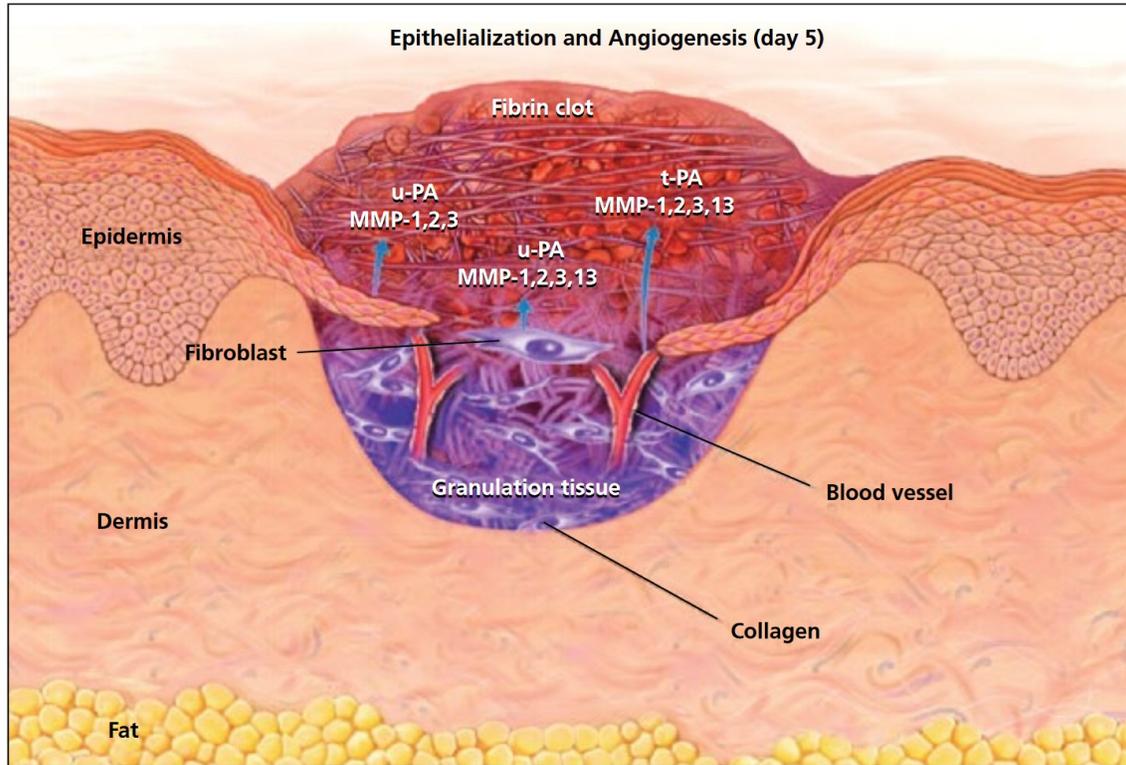


Figure 2 : Illustration d'une plaie cutanée pleine épaisseur 5 jours après le trauma montrant l'angiogénèse, la fibroplasie et l'épithélialisation.

uPA, activateur du plasminogène de type urokinase, *tPA*, activateur tissulaire du plasminogène, *MMP*, métalloprotéinase matricielle. D'après Singer et al., 1999.¹¹

a) Fibroplasie

La fibroplasie correspond au processus de migration des fibroblastes au sein de la matrice extracellulaire provisoire (le caillot sanguin) et à la production des nouvelles protéines (collagènes, protéines de matrice) qui vont constituer la nouvelle ECM.^{11,15,16} Les fibroblastes commencent leur prolifération assez tôt dans la matrice provisoire (environ 4 jours après le trauma). Cette matrice provisoire est un réservoir de cytokines et de facteurs de croissance et fournit les éléments nécessaires à la migration des fibroblastes (fibronectine). Cette migration est

modulée par plusieurs intervenants : les macrophages en tant que producteurs de facteurs chimioattractants et stimulants (PDGF, TGF- β , EGF, FGF) (Figure 1), l'état acide et l'hypoxie du centre de la plaie. Une fois en place, ces cellules développent une activité sécrétrice et profibrotique. Elles remplacent progressivement la matrice provisoire par une matrice riche en collagène (Figure 2). Dépendamment des niveaux de collagène, les fibroblastes vont par la suite diminuer leur synthèse de protéines et évoluer soit vers l'apoptose cellulaire soit vers une différenciation en myofibroblastes, acteurs principaux du processus de contraction.

b) Angiogénèse

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins au sein de la plaie est primordiale et permet l'acheminement d'oxygène et des nutriments nécessaires pour maintenir le métabolisme au sein du tissu de granulation. Ce processus complexe se fait en réponse à l'environnement hypoxique de la plaie et est modulé par de nombreux facteurs et cytokines ainsi que l'ECM.^{11,15-17} En réponse au trauma et l'absence d'interactions juxtacrines, les cellules endothéliales aux extrémités des capillaires s'activent, dégradent leur membrane basale et croissent au sein du caillot. Des extensions cytoplasmiques (pseudopodes) se forment et s'étendent au sein de l'ECM provisoire. Simultanément, les cellules endothéliales à la base du bourgeon vasculaire prolifèrent et fournissent de nouvelles cellules endothéliales pour la formation des nouveaux capillaires. Lorsque deux bourgeons vasculaires fusionnent, ils forment une arcade. Les cellules endothéliales forment par la suite une lumière pour permettre le passage des érythrocytes. Elles interagissent ensuite avec la nouvelle membrane basale et recrutent des péricytes et des cellules de muscle lisse pour stabiliser les nouveaux capillaires. Enfin, dans les dernières phases du processus de guérison, ces cellules subissent un processus d'apoptose et les vaisseaux régressent et involuent.

Ces différents processus interviennent sous l'influence de différents facteurs angiogéniques. Les cellules endothéliales prolifèrent et migrent en réponse aux stimuli angiogéniques (VEGF, FGF, angiopoïétines, TGF- β) et ce jusqu'à ce qu'une connexion s'établisse entre deux extrémités de nouveaux vaisseaux. Cette prolifération est aussi dépendante des composants de l'ECM provisoire (fibronectine, laminine). Une fois que la plaie est comblée par le tissu de granulation, les signaux angiogéniques sont modifiés et le réseau vasculaire régresse sous l'action de métalloprotéinases (MMP) et par l'apoptose des cellules endothéliales.

c) Epithélialisation

Le processus d'épithélialisation a pour but de rétablir un épithélium intact. Ce processus fait intervenir différentes étapes : migration des kératinocytes, prolifération des kératinocytes et différenciation du néo-épithélium en un épiderme stratifié.^{11,15,16} Les facteurs de croissance importants de ce processus sont EGF, KGF et TGF- α .

La migration des kératinocytes commence très tôt après le trauma (24-48h). Elle implique des altérations phénotypiques des cellules basales de l'épiderme et des annexes cutanées en périphérie de la plaie. Les cellules impliquées développent un phénotype migratoire et expriment des MMP afin de permettre leur déplacement dans l'ECM. Les intégrines jouent un rôle majeur dans la migration des kératinocytes car elles orientent leur migration grâce aux interactions qu'elles permettent avec la fibronectine de la matrice provisoire et le nouveau collagène de la nouvelle ECM.

Au cours de l'épithélialisation, les kératinocytes prolifèrent afin de fournir le nombre nécessaire de cellules pour couvrir la surface de la plaie. Lorsque les kératinocytes provenant des différentes parties de la plaie rentrent en contact les uns les autres, la migration cesse grâce au phénomène d'inhibition de contact, les cellules se fixent sur l'ECM, rétablissent leur membrane basale en remplaçant la matrice provisoire et se différencient afin de reconstituer un épiderme stratifié.

4. Phase de remodelage

a) Contraction

Lors du processus de contraction, les bords de la plaie sont tirés les uns vers les autres de façon centripète. En association avec l'épithélialisation, ce processus permet d'accélérer la fermeture de la plaie et diminue la taille de la cicatrice.^{11,15,16} La contraction, en effet, met à contribution la

peau environnante et ses annexes afin de limiter le besoin en tissu cicatriciel qui, lui, en est dépourvu. Cela amène aussi par conséquent une guérison plus esthétique.

Au cours de la fibroplasie, les fibroblastes se différencient progressivement en cellules exprimant un phénotype contractile : les myofibroblastes. Cette cellule est l'acteur principal de la contraction. Elle est caractérisée par un réseau intracellulaire de microfilaments d'actine α de muscle lisse (α SMA) similaires à ceux observés dans les cellules des muscles lisses. Les myofibroblastes sont organisés et alignés le long des lignes de contraction au sein de la plaie. Le processus de contraction fait intervenir plusieurs médiateurs et de nombreuses interactions entre cellules et avec l'ECM. La fibronectine est une des protéines majeures permettant les interactions entre les myofibroblastes et l'ECM.

Au fur et à mesure que la contraction progresse et que la tension au sein de l'ECM diminue, les myofibroblastes évoluent vers deux voies distinctes : la régression en fibroblaste quiescent ou l'apoptose.

b) Cicatrisation

La cicatrisation est le processus final de la guérison tissulaire. Il consiste en la conversion du tissu de granulation en un tissu cicatriciel.^{11,15,16} Ce tissu cicatriciel ne possède pas les caractéristiques physiques du tissu d'origine et est dépourvu de toute annexe cutanée. Au maximum, ce tissu atteindra seulement 70 à 80% de la force du tissu originel.

Ce processus fait intervenir une balance entre la synthèse et la dégradation de différents collagènes qui déterminera la force de la cicatrice. Au cours du remodelage, le collagène de type III est progressivement dégradé et du collagène de type I est progressivement synthétisé. Cet équilibre fragile entre synthèse et dégradation est associé aux MMP et aux inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPs). L'équilibre entre ces deux populations est critique pour la résolution de la guérison cutanée.

B. Cas particulier du cheval

1. L'importance des plaies dans l'espèce équine

La gestion de plaie est une composante majeure de la pratique vétérinaire équine car les chevaux sont prédisposés aux traumatismes de par leur instinct de fuite. L'USDA a montré, dans son dernier rapport, que les plaies sont une des conditions médicales les plus fréquentes affectant les chevaux.¹ Cela est aussi rapporté par les propriétaires de chevaux en au Royaume-Uni.¹⁸ L'étude d'une population anglaise de poneys de polo a montré que 21.6% des traitements vétérinaires administrés étaient en lien avec des plaies cutanées.¹⁹ De façon similaire, les vétérinaires équins australiens et néo-zélandais rapportent que 25% de leurs consultations sont en rapport avec des plaies.^{2,3} Au Mexique, dans une population de chevaux de travail, la prévalence des conditions pathologiques en lien avec la peau était de 20.6%, les plaies cutanées étant la condition la plus prévalente à hauteur de 6.8%.²⁰ Spécifiquement dans les cas des chevaux promis à une carrière athlétique, les traumatismes cutanés et des structures sous-jacentes peuvent devenir des conditions menaçant le pronostic vital ou à l'origine de la mise à la retraite de l'animal. Chez les Thoroughbred de course, il a été montré que les mises à la retraite étaient dues à des pathologies musculosquelettiques dans 70% des cas, 7% de ceux-ci étant associés à des plaies.²¹ Enfin, l'USDA a montré que les euthanasies étaient en lien avec des plaies dans 24% des cas chez les poulains et 16% chez les adultes.

2. Particularité de la guérison cutanée chez le cheval

Chez le cheval, la cicatrisation de plaies traumatiques par première intention n'est un succès que dans ¼ des cas où elle est tentée²² et la cicatrisation par seconde intention est fréquemment sujette à des complications. Cela peut s'expliquer par la différence qui existe entre le processus de guérison chez le cheval et celui rencontré chez d'autres espèces (Figure 3). Une grande partie des particularités inhérentes au cheval a pu être identifiée grâce à la comparaison des processus de guérison du cheval et du poney. Historiquement, c'est en 1985 qu'une différence a été rapportée pour la première fois en matière de guérison par seconde intention entre les deux espèces.²³ Par la suite, différents rapports contradictoires ont été publiés^{24,25} et ce n'est qu'au début des années 2000 qu'une équipe a publié une série d'études comparatives sur le sujet.^{22,24-30} Parallèlement, une autre

équipe a travaillé sur une famille de facteurs de croissance ayant un rôle dans le processus de guérison cutanée chez le cheval.³¹⁻³⁴ Ces différents travaux ont permis une meilleure compréhension de la guérison tissulaire équine et ont posé les bases de l'étude d'une complication majeure de la cicatrisation par seconde intention chez le cheval: le tissu de granulation exubérant (EGT).

La phase inflammatoire du processus de guérison est très particulière chez l'espèce équine. En effet, une étude rétrospective a montré que, malgré le plus haut risque de contamination, les plaies de poney étaient moins sujettes aux infections et à un retard dans la guérison cutanée comparativement aux plaies de cheval.²² Une infection de plaie se développe lorsque la réponse inflammatoire de l'organisme ne suffit pas à combattre la charge bactérienne. Dès lors, cela suggère que la réponse inflammatoire aiguë chez le cheval est moins efficace que celle du poney.

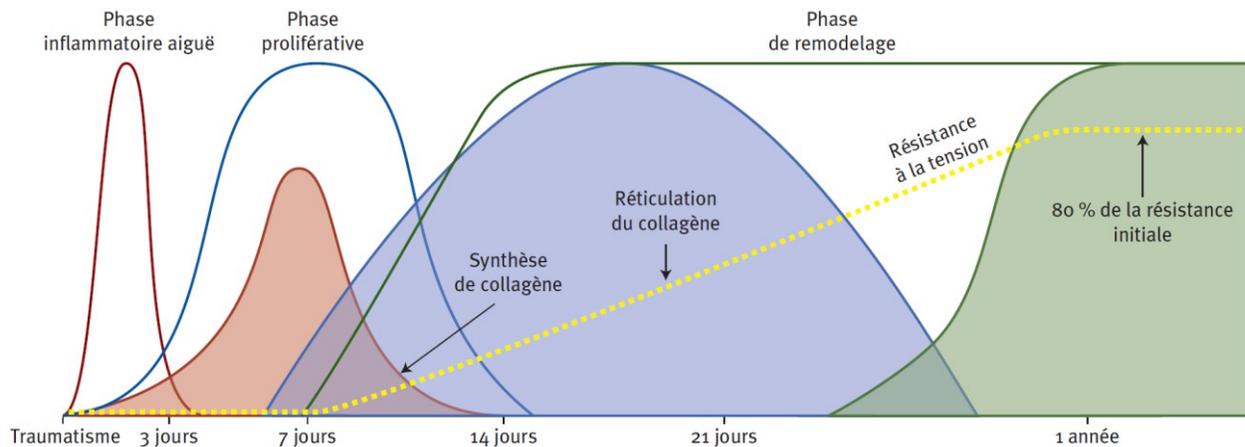


Figure 3 : Profil temporel des phases de la réparation cutanée.

Les lignes montrent le profil de guérison d'un animal de laboratoire. Les zones ombragées superposées indiquent le profil de la cicatrisation de plaies cutanées sur le membre du cheval. La ligne en pointillés indique l'augmentation de la résistance à la tension au cours de la guérison. D'après Theoret et al. 2012

La guérison par seconde intention est donc souvent nécessaire. Les résultats des études comparatives expérimentales ont montré que le poney guérissait plus vite, par seconde intention, que le cheval et que l'efficacité de cette guérison était liée à des différences dans les phases de

la guérison.^{28,30} L'infiltration leucocytaire chez le cheval est plus lente, moins importante et persiste jusqu'à 4 semaines après le trauma.³⁰ La production de radicaux libres (H_2O_2 , O^\bullet) et de médiateurs de l'inflammation ($TNF\alpha$, IL-1, TGF- β , chimioattractants) par les leucocytes est aussi plus importante chez le poney.^{26,29} Ces facteurs sont importants pour la lutte antibactérienne, le renforcement de la réponse inflammatoire, l'induction de la fibroplasie et la contraction. Ces résultats supportent le profil inflammatoire spécifique du cheval : une réponse inflammatoire aiguë faible suivie par une inflammation chronique. L'étude des niveaux en TGF- β vient renforcer cette caractéristique de la réponse inflammatoire. Des niveaux plus élevés ont été observés chez le poney²⁶ et, parallèlement, il a été montré que, chez le cheval, les niveaux de TGF- β 1 persistaient dans les plaies de membres par rapport aux plaies de corps.^{33,34} Cela supporte encore l'idée d'une faible réponse inflammatoire initiale et d'une inflammation subséquente chronique chez le cheval. Ce profil inflammatoire et les différences entre les membres et le corps semblent justifier le fait que les plaies de membres, chez le cheval, soient plus sujettes à complication.^{23,28,35}

La phase proliférative du processus de guérison cutanée est aussi particulière. La formation du tissu de granulation chez le cheval est extrêmement rapide comparativement au poney.²⁸ Ce tissu de granulation apparaît désorganisé, sujet à une inflammation chronique et est associé à une excessive prolifération des fibroblastes.³⁰ Il est vraisemblable que cette formation anormale de tissu de granulation soit associée à la réponse inflammatoire chronique et à la présence constante de médiateurs de l'inflammation au cours de la guérison. Ce profil d'hypergranulation est la première étape avant l'apparition d'un tissu de granulation exubérant (cf. section suivante).

À l'inverse du poney, l'épithélialisation est le processus qui prédomine lors de la guérison cutanée chez le cheval²⁸; en effet, le processus d'épithélialisation pallie au manque de contraction lorsque celle-ci est limitée. Par exemple, lors de guérison par seconde intention, les plaies de membre guérissent à 70% par épithélialisation et à 30% par contraction chez le cheval.²⁸ Cette différence n'est pas associée aux capacités contractiles des (myo)fibroblastes²⁷ ni à leur nombre mais plutôt à l'organisation de ces cellules au sein du tissu de granulation.³⁰ Chez le cheval, les myofibroblastes sont complètement désorganisés contrairement aux myofibroblastes de poney qui sont alignés et organisés selon un schéma particulier. Dès lors, chez le cheval, une cicatrice plus importante sera observée.

Enfin, chez l'espèce équine, la localisation des plaies est aussi associée à certaines particularités de la guérison cutanée. Sur les membres, contrairement aux plaies de corps, les plaies sont sujettes à des mouvements et des tensions cutanées importants. Les lignes de tension et la mobilité fragilisent les tissus nouvellement formés au sein de la plaie et ralentissent par conséquent le processus de guérison.

3. Tissu de granulation exubérant équin (EGT)

Le développement d'un tissu de granulation exubérant est une complication très fréquente de la guérison par seconde intention chez le cheval. Ce désordre fibro-prolifératif cutané semble résulter d'un dysfonctionnement de la phase proliférative de la guérison cutanée.



Figure 4 : Une plaie sur l'aspect dorsal du tarse démontrant l'aspect typique de l'EGT.

D'après Theoret et al. 2017.³⁶

a) Définition

Le EGT est macroscopiquement irrégulier, composé de nombreuses crevasses et croît en dehors des marges de la plaie (Figure 4). Il est associé à des dépôts de fibrine au niveau de ses crevasses et à un exsudat inflammatoire qui lui donnent un aspect souvent qualifié de purulent.²⁸ D'un point de vue histologique, ce tissu apparaît immature et est caractérisé par une organisation tissulaire et cellulaire chaotique.³⁰ De nombreuses fibres de collagène désorganisées, une forte population fibroblastique et myofibroblastique caractéristique, un réseau vasculaire superficiel dense et une population granulocytaire significative sont observables (Figure 5).³⁷ Ce tissu est une barrière physique pour les processus d'épithélialisation et de contraction des plaies atteintes.

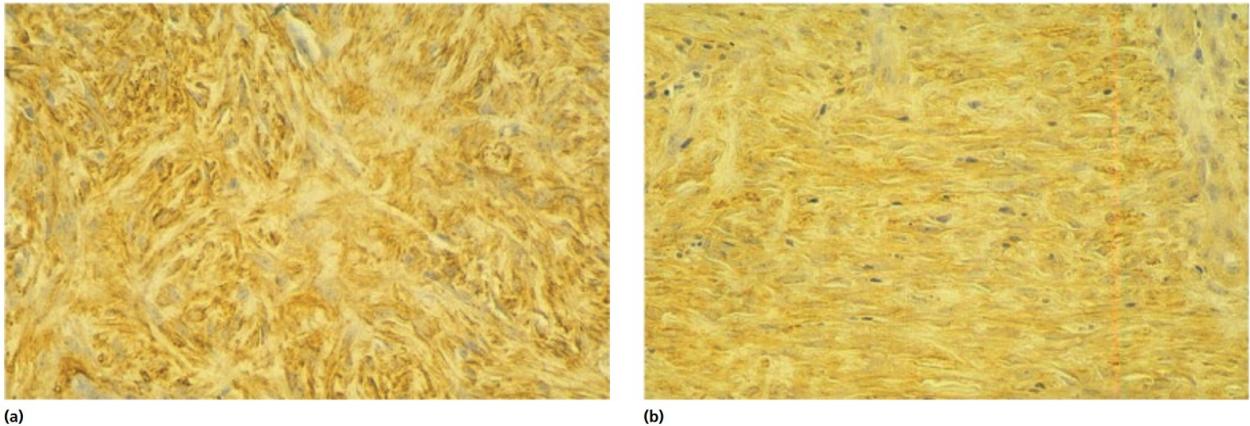


Figure 5 : Aspect microscopique (a) de l'EGT et (b) d'un tissu de granulation plus différencié et en contraction.

(a) L'EGT présente un grand nombre de cellules et de capillaires arrangés de façon chaotique et semble très immature par rapport (b) aux cellules arrangées de façon régulière et les capillaires parallèles du tissu de granulation plus différencié. D'après Wilminck et al. 2004.³⁰

Les mécanismes sous-jacents à la formation de l'EGT ne sont pas encore complètement élucidés et de nombreuses recherches sont réalisées en ce sens. Cependant, certains facteurs prédisposants et mécanismes pathogéniques ont été identifiés.

b) Facteurs de risque

❖ Espèce

Mis à part l'Homme, l'espèce équine est la seule touchée par ces désordres fibro-prolifératifs cutanés spontanés. Néanmoins, il apparaît que les chevaux soient plus sujets à ce problème que les poneys.²⁸ Ces derniers sont aussi touchés par cette complication mais dans une moindre mesure; en effet, l'EGT sur un poney a tendance à régresser spontanément lorsque les plaies sont laissées sans bandage à l'inverse de l'EGT chez le cheval qui est récalcitrant et nécessite une résection chirurgicale.

❖ Localisation

L'EGT est une complication rencontrée quasiment uniquement sur les membres.^{23,28,35} A l'inverse, les plaies du corps ont tendance à cicatrifier sans complications particulières (Figure 6). Différentes raisons ont été évoquées pour expliquer cette préférence anatomique:³⁵

- Une proximité par rapport au sol et le risque accru de contamination
- Une relative faible épaisseur de tissus associée à un réseau vasculaire peu dense
- Des contraintes mécaniques (grande mobilité articulaire et des structures sous-jacentes)
- Un processus de contraction faible

Ces différentes raisons peuvent être reliées à différents mécanismes identifiés dans la pathogénèse de l'EGT (cf. I.B.2.c). Les plaies appendiculaires sont aussi plus souvent protégées par un bandage que le sont les plaies de corps, pour des raisons pratiques. Dans la mesure où l'emploi d'un bandage favorise le développement d'EGT (cf. ci-dessous), cela pourrait aussi en partie expliquer cette localisation préférentielle.

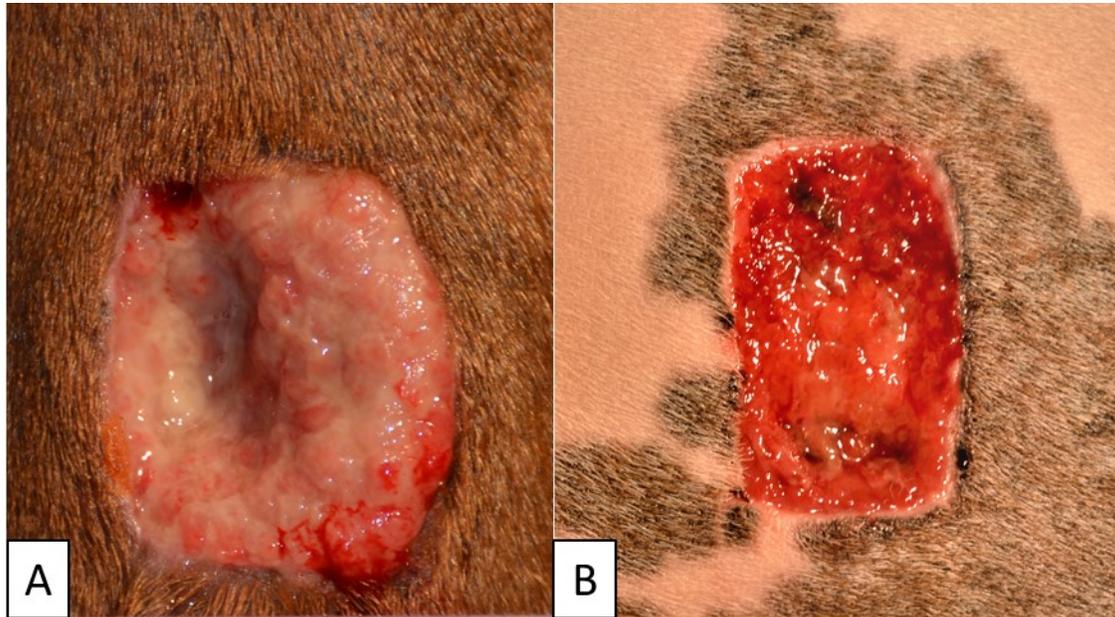


Figure 6 : Modèle de plaies cutanées pleine épaisseur expérimentales 9 jours après la réalisation des plaies.

A, sur un membre distal montrant de l'EGT. B, sur un hémithorax montrant un tissu de granulation normal et un liseré d'épithélialisation.

❖ Bandage / Plâtre

L'emploi d'un bandage ou d'un plâtre sur une plaie appendiculaire favorise le développement d'un EGT.^{24,34,36,38-45} Des mécanismes ont été proposés pour expliquer cet effet.³⁶

- Une stimulation de l'angiogenèse due à l'augmentation du gradient en oxygène entre la surface de la plaie et les tissus plus profonds
- Une faible tension en oxygène au sein des tissus de la plaie favorisant la fibroplasie
- Un environnement humide, chaud et acide propice à la migration et la prolifération cellulaires

Il semblerait que l'effet occlusif soit la majeure préoccupation dans le cadre des bandages et des plâtres. Dès lors, le choix du type de pansement utilisé au contact de la plaie est important; en effet, il a été montré que l'emploi de bandages occlusifs favorisait la formation d'EGT.⁴⁶ Par

ailleurs, la manière dont le bandage est réalisé ainsi que la pression appliquée par l'opérateur mettant en place le bandage, pourraient tout aussi bien intervenir.

❖ Facteurs inflammatoires

Tout élément pro-inflammatoire au stade de la fibroplasie favorise le développement de l'EGT et entretient l'état inflammatoire chronique de la plaie. Cela peut être un séquestre osseux, du tissu nécrotique, un corps étranger, une réaction périostée, ou tout processus infectieux. Des produits caustiques ou irritants ainsi que la cryothérapie ont été essayés pour le traitement de l'EGT afin de limiter le développement du tissu de granulation. Ces traitements provoquent toutefois une nécrose tissulaire au sein de la plaie et ont pour effet d'encourager l'état inflammatoire chronique et de favoriser le développement d'EGT.

c) Pathogénie

Le mécanisme exact à l'origine de l'EGT n'est pas encore complètement élucidé. Cependant, l'EGT semble s'inscrire dans la continuité des particularités de la guérison cutanée chez le cheval.

❖ Réponse inflammatoire, contraction et fibroplasie

Lors d'un trauma cutané sur un membre, le cheval exprime une réponse inflammatoire particulière (cf. I.B.1.). Celle-ci contribue en grande partie au développement de l'EGT. L'association d'une faible réponse inflammatoire aiguë suivie d'une inflammation chronique subséquente retarde la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Ultimement, cela limite la contraction de la plaie, favorise la prolifération des fibroblastes et la production d'ECM.

La faible réaction inflammatoire aiguë est associée à une faible concentration en TGF- β 1 dans les plaies appendiculaires.^{26,33} Lors de l'inflammation chronique subséquente cette cytokine persiste

dans l'environnement de la plaie. Ce facteur de croissance stimule non seulement la production d'ECM mais aussi la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Dès lors, des niveaux faibles initiaux en TGF- β 1 favorisent la prolifération des fibroblastes au détriment de leur transformation en myofibroblastes. De plus, comparativement au poney, le cheval présente un défaut d'organisation des myofibroblastes au sein des plaies appendiculaires.³⁰ A l'inverse, chez le poney, les myofibroblastes sont bien organisés et suivent un schéma régulier. Ces défauts de différenciation et d'organisation nuisent au processus de contraction et favorisent la fibroplasie en ne limitant pas le volume du tissu de granulation par contraction.

Le tissu conjonctif du cheval possède une grande réactivité comparativement à celui d'autres espèces.⁴⁷ Il semble alors pertinent de s'attendre à ce que la persistance du TGF- β 1 et la prolifération des fibroblastes dans les plaies appendiculaires engendrent une production excessive de collagène et de composants de l'ECM. Une équipe a étudié l'expression d'ARNm associés au collagène de type I, une collagénase (MMP-1) et un inhibiteur de métalloprotéinases (TIMP-1) dans les plaies de corps et de membre chez le cheval.⁴⁸ Il a été montré que les niveaux d'ARNm du collagène de type I étaient significativement plus élevés dans les plaies de membre et que les niveaux d'ARNm de TIMP-1 étaient significativement plus élevés dans les plaies de membre durant les première et quatrième semaines de la guérison. Ces résultats suggèrent un déséquilibre de l'équilibre entre la production et le remodelage de l'ECM en faveur de son développement et de son accumulation. Une autre équipe a montré *in vitro* la surexpression d'un gène procollagénique (COL1A1) et la diminution de l'expression d'une collagénase (MMP-2) par des fibroblastes cultivés à partir du derme de membre chez le cheval.⁴⁹ Néanmoins, considérant la multitude de métalloprotéinases et leurs inhibiteurs, il est difficile d'extrapoler ces résultats à l'ensemble du métabolisme de l'ECM.

L'inflammation, le défaut de contraction et le développement de l'EGT sont des phénomènes qui s'entretiennent les uns les autres. Si ce cycle inflammatoire n'est pas brisé, le processus de guérison ne peut se terminer.

❖ Angiogenèse et hypoxie cellulaire

Le développement d'EGT est associé à deux phénomènes en lien avec l'angiogénèse : l'exacerbation de l'angiogénèse au sein de l'EGT et l'état hypoxique de ce dernier.

Une récente étude visant à identifier les gènes impliqués dans le processus de guérison cutanée chez le cheval⁵⁰ a permis l'identification et l'étude des gènes associés à la régulation de l'angiogénèse.^{51,52,53} Ces études ont montré une sous-expression de protéines anti-angiogéniques dans les plaies appendiculaires chez le cheval. Cela coïncide avec l'exacerbation du processus d'angiogénèse observée dans les plaies de membre.⁴²

Parallèlement et paradoxalement, il semble que l'hypoxie tissulaire soit aussi une composante de l'EGT. Comparativement aux plaies de corps, une occlusion plus fréquente des micro-vaisseaux du tissu de granulation a été observée dans les plaies de membre⁴² et pourrait potentiellement être liée à une hypertrophie des cellules endothéliales.⁵⁴ De plus, une équipe a démontré l'état hypoxique transitoire des plaies de membre par rapport aux plaies de corps durant la phase inflammatoire de la guérison.⁵⁵ Une récente étude a confirmé ces résultats.⁴⁵ Il est intéressant de noter que les résultats de cette seconde étude suggèrent un lien entre l'état hypoxique et les perturbations métaboliques observées au sein de l'EGT.

Donc, malgré la présence de nombreux vaisseaux il semble que l'état hypoxique du tissu de granulation prédomine, favorise l'angiogénèse et encourage le développement de l'EGT ; en effet, l'hypoxie est aussi connue pour stimuler la prolifération des fibroblastes et la production subséquente d'ECM. Chez le cheval, une étude *in vitro* a démontré que l'hypoxie stimulait la prolifération de fibroblastes dermiques, favorisait l'expression d'un gène procollagénique (COL1A1) et limitait l'expression d'une métalloprotéinase (MMP-2) par l'intermédiaire d'un facteur activé par l'hypoxie (HIF-1).⁴⁹ Ces résultats vont dans le sens d'une production accrue et un défaut du renouvellement de l'ECM.

❖ Apoptose déficiente

Une dérégulation du processus d'apoptose devrait contribuer à l'entretien de la fibroplasie et la persistance de l'EGT. Chez le cheval, un dysfonctionnement de l'apoptose est suggéré car un déséquilibre des signaux régulant ce processus a été observé.⁴² De plus, chez l'Homme, il a été montré que le TGF- β 1 avait un effet anti-apoptotique sur les fibroblastes.^{56,57} Dès lors, la

persistance de niveaux élevés de TGF- β 1 dans les plaies de membre chez le cheval^{26,33} pourrait expliquer la limitation du processus d'apoptose au sein de l'EGT.

4. Le parallèle entre les désordres fibro-prolifératifs (cutanés) de l'Homme et du cheval

La cicatrisation est un processus normal de la guérison tissulaire. Or, en médecine humaine, un grand nombre de patients atteints de plaies chroniques développent des complications associées à ce processus. Ces désordres fibro-prolifératifs cutanés sont liés à un dysfonctionnement et une altération du métabolisme de l'ECM (déséquilibre entre la production et la dégradation). Ils peuvent se développer dans différentes situations telles que les brûlures, lacérations, abrasions, plaies chirurgicales, etc. Ces complications qui peuvent engendrer prurit, douleur et contractures, ont un impact dramatique sur la qualité de vie aussi bien physique que psychologique des patients.

Deux types de désordre fibro-prolifératif sont fréquemment rencontrés chez l'Homme : les chéloïdes et les cicatrices hypertrophiques. Ces deux entités sont associées à une croissance excessive du tissu cicatriciel.⁵⁸ Une cicatrice hypertrophique ne dépasse pas les bords originels de la plaie et peut régresser spontanément. A l'inverse, la chéloïde croît au-delà des bords de la plaie. Elle ne régresse jamais spontanément et se reforme fréquemment même après une excision chirurgicale. L'hypergranulation est un autre type de désordre fibro-prolifératif rencontré chez l'Homme. Cette affection, beaucoup plus rare, présente une grande similarité avec l'EGT. Cliniquement, on observe une croissance exagérée du tissu de granulation en dehors des bords de la plaie avec un aspect irrégulier et friable.⁵⁹ De manière assez similaire au cheval, l'origine de ces désordres fibro-prolifératifs cutanés est attribuée à une réponse inflammatoire prolongée ou excessive.

La pathogénie de la chéloïde est complexe et n'est pas encore complètement élucidée. Plusieurs facteurs ont été mis en cause dans le développement de cette complication. Les fibroblastes sont classiquement incriminés de par leur production excessive de collagène et le dépôt d'ECM qui en découle.^{60,61} Ces mêmes fibroblastes ne semblent pas évoluer au cours du processus de guérison vers les voies classiques de la différenciation en myofibroblaste, l'apoptose ou de la quiescence cellulaire. Les kératinocytes et leurs voies de signalisation ont aussi récemment été impliqués.⁶² Il

a aussi été montré que certains facteurs de croissance (TGF- β 1 et TGF- β 2, VEGF, PDGF α) et leurs récepteurs étaient surexprimés au sein de la chéloïde. Cette surexpression favorise l'état pro-inflammatoire, la fibroplasie et le développement de la chéloïde. Par ailleurs, la présence d'une hypoxie tissulaire significative semble aussi impliquée dans le développement des chéloïdes.^{61,63} Enfin, il a été montré que la présence de fortes lignes de tension au niveau de la peau favorisait le développement de chéloïdes.⁶⁴

L'hypergranulation, étant une affection beaucoup plus rare, a fait l'objet de très peu d'études en médecine humaine et le mécanisme exact à l'origine de cette affection reste inconnu.⁵⁹ Néanmoins, il semblerait qu'une réaction inflammatoire aberrante et prolongée associée à des facteurs favorisant tels qu'une infection, un corps étranger, un traumatisme répété et une réaction immunitaire anormale (allergie, hypersensibilité) interviennent dans la genèse de cette complication. Par ailleurs, il est intéressant de noter que cette complication est parfois appelée "Band-Aid disease" en référence à un mode de pansement inadéquat.

Le cheval et l'Homme sont les seules espèces atteintes naturellement par ce type de désordres et, en termes de pathogénèse, les chéloïdes semblent partager de nombreuses similarités avec l'EGT équin. Une étude a cherché à comparer, sur le plan histologique, les deux entités afin d'évaluer la pertinence du modèle équin pour comprendre les désordres fibro-prolifératifs cutanés observés chez l'Homme.³⁷ Des sections de EGT équin et de chéloïde ont été comparées sous colorations histochimiques et immunohistochimiques pour évaluer la présence d'ulcération, de collagène, de myofibroblastes, de fibres élastiques ainsi que le degré d'inflammation, de fibrose, de vascularisation et l'orientation des fibres de collagène. Des fibres désorganisées de collagène ont été observées en grande quantité dans le derme profond et moyen des deux types de lésions. Le nombre de fibroblastes était élevé dans les deux échantillons bien que seul l'EGT possédait des myofibroblastes. De plus, contrairement à la chéloïde, le derme superficiel et l'épithélium de l'EGT étaient essentiellement composés de tissu de granulation associé à un infiltrat inflammatoire marqué, de nombreux capillaires et des ulcérations de surface. Malgré certaines différences, les auteurs ont conclu qu'il semblait raisonnable d'établir des parallèles entre les deux affections et que d'autres études étaient nécessaires afin d'élucider les mécanismes pathogéniques à l'origine de l'EGT et de la chéloïde.

A ce jour, aucune étude comparative n'a été réalisée entre l'EGT et l'hypergranulation chez l'Homme. Cependant, considérant les grandes similarités cliniques entre ces deux conditions, cette voie encore inexplorée pourrait apporter des éclaircissements en termes de pathogénie.

Comme dans le cas de l'EGT chez le cheval, le traitement des chéloïdes et de l'hypergranulation est sujet à controverse et de nombreuses modalités thérapeutiques ont été testées. Néanmoins, aucun traitement ne semble faire consensus au sein de la communauté scientifique. Dès lors, l'étude conjointe de ces entités devrait permettre l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques en médecine humaine et vétérinaire.

C. Gestion médicale du processus de guérison chez le cheval

1. Prévention et traitement de l'EGT

Si le développement de l'EGT n'est pas prévenu ou contrôlé, il peut rapidement devenir un problème esthétique et fonctionnel pour l'animal. De nombreuses recherches en médecine vétérinaire sont menées afin de déterminer le protocole le plus approprié pour améliorer la guérison des plaies chroniques et prévenir la formation d'EGT. Cependant, à ce jour, aucune méthode conventionnelle ne fait l'unanimité pour accélérer la guérison, prévenir ou traiter cette complication.

a) Prévention

Tout facteur pouvant créer ou entretenir une inflammation chronique peut potentiellement engendrer l'apparition d'EGT. Il est donc recommandé d'éliminer toutes ces sources d'inflammation chronique lors de la première évaluation et durant le suivi d'une plaie.³⁶ Cela peut être un corps étranger, du tissu nécrotique ou infecté, un séquestre osseux aussi bien que tout agent topique irritant pour la plaie. Bien que l'application d'un bandage puisse, dans certaines

circonstances, favoriser le développement d'EGT, son emploi protège la plaie et les structures sensibles de l'environnement extérieur.

La fibroplasie est favorisée par la mise en place d'un bandage ou d'un plâtre.^{24,34,36,38-45} Dans certains cas, aussitôt qu'un tissu de granulation sain a rempli le lit de la plaie, il peut être envisagé de laisser la plaie cicatriser à l'air libre. Chez les poneys, il a été observé que des plaies sans bandages guérissaient plus vite, sans EGT tandis que des plaies similaires gérées avec bandage voyaient leur cicatrisation rallongée et compliquée par de l'EGT.²⁵ Cependant, comme montré précédemment, le processus de guérison chez le cheval est très singulier et diffère en de nombreux points de celui rencontré chez les poneys. De plus, dans une étude testant l'effet d'un bandage et l'application d'une crème antibactérienne sur des plaies cutanées ouvertes chez le cheval, aucune différence en terme de temps de cicatrisation n'a été observée entre les plaies traitées avec ou sans bandage (l'EGT était excisé au besoin).³⁸ Enfin, une plaie laissée à l'air libre est plus sensible à l'environnement et peut subir des contaminations ou traumatismes pouvant initier un processus inflammatoire chronique. Dès lors, le choix de couvrir la plaie avec un bandage est à considérer au cas par cas en fonction du cheval, de son environnement, des moyens disponibles et du type de plaie. Le choix du pansement est aussi très important : il dépend de l'évolution de la plaie et de son suivi. Par exemple, un pansement non-occlusif peut avoir les mêmes effets négatifs qu'un pansement occlusif, généralement déconseillé chez le cheval, s'il n'est pas changé à une fréquence adaptée et que l'exsudat s'accumule. Par ailleurs, si l'EGT est géré au cours du traitement, l'emploi d'un bandage n'est pas forcément contre-indiqué et peut permettre l'emploi d'autres modalités thérapeutiques au contact de la plaie pour prévenir toute récurrence du problème. De même, l'immobilité fournie par l'emploi d'un plâtre peut être essentielle pour favoriser la guérison de plaies dans des zones soumises à beaucoup de mouvement.

L'emploi d'une greffe cutanée est aussi recommandé pour aider à prévenir l'apparition d'EGT³⁶ car le greffon apporte une protection de la surface de la plaie en diminuant l'exposition à l'environnement. Une équipe a rapporté une série de cas de greffes cutanées pleine épaisseur sur des membres de chevaux avec un bon taux de réussite (acceptation de 5 greffes sur 6) sur des plaies aiguës et en cours de granulation.⁶⁵ De plus, il semble que le tissu greffé ait une action directe inhibitrice sur le tissu de granulation. Il a été montré que cet effet est probablement lié à une diminution de l'action du TGF- β 1, un remodelage de l'ECM du au déséquilibre entre les

MMPs et leurs inhibiteurs (TIMP-1) ainsi qu'à la génération d'oxyde nitrique (NO).⁶⁶ La cumulation de ces différents effets conduirait à l'apoptose des cellules vasculaires et des fibroblastes provoquant ainsi la résorption du tissu de granulation. D'autre part, le greffon agit aussi comme une source additionnelle de kératinocytes participant à l'épithélialisation de la plaie. L'emploi d'une greffe cutanée peut donc faire partie des stratégies de prévention de l'EGT.

b) Traitement

Un tissu de granulation exubérant doit être traité lorsqu'il outrepassé les marges de la plaie.^{28,36,67}

Le traitement le plus souvent choisi par les vétérinaires est simple et consiste en l'excision chirurgicale de l'EGT. Le but est de retirer l'excès de tissu non-sain et non-viable tout en préservant l'épithélium en formation sur le pourtour de la plaie. Ce traitement a deux avantages : il supprime le tissu superficiel inflammatoire et potentiellement contaminé et il stimule le processus de guérison (épithélialisation et contraction) en levant la barrière physique imposée par l'EGT. Cependant, toute excision chirurgicale d'EGT doit absolument être associée à une réévaluation complète de la plaie ; en effet, toute cause sous-jacente d'inflammation chronique doit être éliminée afin d'éviter une récurrence du problème. Il peut donc être nécessaire, en plus d'une évaluation directe de la plaie, de faire appel à d'autres techniques diagnostiques telles que la radiographie ou l'échographie. Si aucun facteur pro-inflammatoire favorisant l'EGT ne peut être mis en évidence, il est fort probable que le problème soit relié tout simplement à l'état inflammatoire chronique inhérent aux plaies appendiculaires chez le cheval.

Différentes modalités thérapeutiques ont donc été proposées et étudiées pour limiter la récurrence de l'EGT souvent fréquente dans ce cas. Celles-ci incluent les agents térébrants/caustiques, la cryothérapie/cautérisation, les anti-inflammatoires stéroïdiens, la kétansérine, le gel de silicone, les greffes cutanées, et quelques autres. Par ailleurs, plusieurs nouvelles modalités pouvant servir au traitement de l'EGT équin ont récemment émergé. L'une d'entre-elles sera abordée en détail dans ce travail.

2. Médecine régénérative

Dans le cadre de la gestion des plaies, le but ultime de la médecine régénérative est de parvenir à développer un traitement capable de régénérer une peau fonctionnelle dans son intégralité (annexes cutanées, réseaux vasculaire et nerveux).⁶⁸ Cette peau doit pouvoir s'intégrer, sans cicatrice, à l'organisme receveur. Il faut donc considérer différentes approches :

- L'utilisation de cellules souches
- L'utilisation de molécules bioactives avec ou sans cellules souches
- L'utilisation de biomatériaux ou matrices pour favoriser la régénération tissulaire *in situ*
- La transplantation de tissus ou organes développés en laboratoire

A l'heure actuelle, les thérapies régénératives employées chez le cheval sont de l'ordre de l'expérimentation. Elles ne sont, pour le moment, soumises à aucune réglementation et leur utilisation n'est pas encore justifiée par des essais précliniques ou cliniques. Celles-ci ne sont donc pas encore recommandées pour une utilisation clinique chez le cheval.

❖ Cellules souches

Une cellule souche est une cellule indifférenciée capable de se diviser indéfiniment et de donner naissance à des cellules indifférenciées et des cellules plus spécialisées par différenciation. Ces cellules souches sont aussi caractérisées par leur capacité à donner naissance à un ou plusieurs types cellulaires. On parlera alors de cellules unipotentes (capables de donner naissance uniquement à des cellules de son propre type), multipotentes (capables de donner naissance à plusieurs types de cellules de la même famille), pluripotentes (capables de donner naissance à presque tous les types de cellules) et totipotentes (capable de donner naissance à tous les types de cellules et, par conséquent, à un organisme complet).

- Cellules souches mésenchymateuses (MSC)

Les MSC sont des cellules souches adultes, multipotentes. Dans les dernières années, l'arrivée des MSC sur le marché vétérinaire a créé un certain engouement parmi les vétérinaires. Malheureusement, de nombreux praticiens utilisent ces cellules souches malgré une absence d'évidence scientifique solide.

Il n'existe pas encore de preuve supportant l'emploi clinique des MSC dans le cadre de la guérison cutanée chez le cheval. De plus, ces cellules multipotentes ne devraient pas, en théorie, être en mesure de régénérer l'intégralité des annexes cutanées. Cependant, il existe deux rapports de cas d'utilisation de MSC sur des plaies chez le cheval. Le premier rapporte l'utilisation locale (intradermique) de MSC à partir de sang périphérique sur 4 chevaux ayant des plaies appendiculaires récalcitrantes aux traitements conventionnels.⁶⁹ Les auteurs rapportent une réponse visuelle et clinique positive au traitement. Le second rapport de cas traite de l'emploi de MSC isolées à partir de liquide amniotique et cultivées dans du PRP (plasma enrichi en plaquettes) sur des escarres de décubitus chez un poulain nouveau-né.⁷⁰ Selon les auteurs, les escarres traités avec la combinaison MSC/PRP ont guéri plus vite que ceux traités avec le PRP seul ou avec un gel d'aloès.

Il est intéressant de noter que les auteurs de travaux récents considèrent que la communication paracrine des MSC est le mécanisme primaire derrière les effets régénératifs attribués aux MSC.⁷¹ Cela suggère que le milieu de culture obtenu à partir de MSC cultivés *in vitro* pourrait être utilisé comme traitement. Dans cette optique, une équipe a montré que l'encapsulation de MSC équines n'interférait pas avec leur production de facteurs contribuant positivement à la guérison cutanée et que les effets de ces cellules encapsulées étaient similaires à ceux du milieu de culture de celles-ci.⁷²

Il a aussi été montré qu'il était possible d'obtenir des cellules souches épithéliales (EpSC) à partir des follicules pileux au niveau de la couche basale de l'épiderme et d'induire leur différenciation en kératinocytes ou en adipocytes.^{73,74} La même équipe a testé ces EpSC équines, dans un contexte clinique, sur la guérison de plaies ouvertes.^{74,75} Des différences significatives sur le plan

histologique (*in vitro* et *in vivo*) ont été mises en évidence dans un modèle de plaies expérimentales traitées avec du PRP ou avec une combinaison de EpSCs et PRP. Dans leur second protocole visant à comparer des EpSCs allogéniques et autologues, aucune différence en termes de réponse immunitaire cellulaire précoce, vascularisation ou fibroplasie n'a pu être démontrée bien que les auteurs aient observé des différences au niveau macroscopique. Cependant, aucun essai n'a été réalisé sur la cicatrisation par seconde intention de plaies appendiculaires chez le cheval.

- Cellules souches embryonnaires (ESC)

Les ESC sont des cellules souches pluripotentes. Chez le cheval, deux études rapportent la description de lignées cellulaires de type embryonnaire.^{76,77} Cependant, leur caractère pluripotent n'a pas pu être démontré. La culture difficile de ces cellules, l'état expérimental des recherches et les conditions éthiques et réglementaires entourant leur utilisation préviennent toute application clinique de ces cellules en médecine équine à l'heure actuelle.

- Cellules souches pluripotentes induites (iPSC)

Ces cellules sont des cellules somatiques reprogrammées vers un état pluripotent similaire aux ESC. L'emploi de ces cellules est intéressant dans la mesure où elles sont une source de cellules pluripotentes qui ne nécessite pas l'utilisation d'un embryon. Les premières lignées d'iPSC équines ont été produites en 2011.⁷⁸ Une étude a récemment présenté un protocole permettant de développer des kératinocytes à partir d'iPSC équines dans le but de développer un substitut de peau équine.⁷⁹ Cette même équipe a aussi publié des résultats préliminaires suggérant que, bien que l'injection intradermique d'iPSC allogènes dans un cheval immunocompétent provoque une réaction cellulaire modérée, aucun rejet n'est observé.⁸⁰

Ces études montrent que l'utilisation d'iPSC est encore du domaine expérimental et que d'autres expériences doivent être conduites afin de tester le potentiel et l'immunogénicité des différentes lignées d'iPSC avant d'envisager leur utilisation clinique.

❖ Biomatériaux / matrices

Bien qu'il existe différents types de matrices disponibles sur le marché approuvées pour une utilisation chez le cheval, il n'y a à ce jour que deux études publiées dans ce domaine. Une première étude rapporte la comparaison entre 3 pansements biologiques (une greffe d'épaisseur partielle de peau allogénique, du péritoine allogénique et de la sous-muqueuse d'intestin grêle de porc) dans un modèle de plaie appendiculaire expérimental chez le cheval.⁸¹ Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre ces pansements et un pansement non-biologique conventionnel. Une autre équipe de chercheurs a aussi comparé un gel de fibrine conventionnel acellulaire avec un gel de fibrine préparé avec du PRP. Ils ont montré que l'inclusion de plaquettes dans le gel modifiait son architecture et augmentait sa concentration en facteurs de croissance.⁸² Ce type de gel pourrait favoriser la migration, prolifération, différenciation et organisation des cellules au cours de la régénération tissulaire.

❖ Substituts de peau

La production de substituts de peau chez le cheval à partir de cellules cutanées est possible et a été réalisée. Une première équipe de chercheurs a produit un tissu avec une architecture épidermique en cultivant des kératinocytes équins dans une matrice tridimensionnelle acellulaire composée de protéines de membrane basale.⁸³ Les kératinocytes au sein de cette matrice ont proliféré, se sont différenciés et ont formé des couches basale et supra-basale d'épiderme. Une seconde équipe a réussi à produire un tissu dermo-épidermique à partir de fibroblastes, de kératinocytes équins et d'une matrice tridimensionnelle de collagène I.⁸⁴ Le tissu obtenu était similaire à de la peau équine d'un point de vue macroscopique, histologique, ultrastructurel et immunohistochimique.

Toutefois, l'absence de réseaux vasculaire et nerveux dans ces substituts constitue la limite qui doit encore être franchie avant d'envisager leur utilisation clinique.

3. Traitement de plaie par pression négative (NPWT)

Le principe de cette thérapie est d'appliquer une pression négative à une plaie grâce à un dispositif de succion. Selon les systèmes, différentes interfaces de contact sont utilisées (mousse, gaze, etc...) puis la plaie est recouverte d'un pansement occlusif afin de maintenir la pression négative appliquée. Cet environnement subatmosphérique provoque l'aspiration de l'exsudat et des sécrétions à travers l'interface de contact jusqu'à un réservoir. Dans le cadre de plaies peu exsudatives, certains appareils récents gèrent cet exsudat par évaporation à travers le bandage et sont donc dépourvus de réservoir.

L'idée de l'emploi de la pression négative sur des plaies est ancienne mais son application en médecine humaine moderne est relativement récente. L'intérêt pour cette thérapie date de la fin des années 1990.⁸⁵⁻⁸⁷ Les premières études ont été pratiquées chez les cochons et évaluaient l'effet de la NPWT sur des plaies cutanées pleine épaisseur. A -125mmHg, une accélération dans la formation du tissu de granulation, une augmentation du flot sanguin et la diminution de la charge bactérienne ont été observés.^{87,88} Depuis lors, la NPWT a suscité de nombreuses recherches et fait partie des traitements d'appoint les plus fréquemment utilisés pour la gestion des plaies en médecine humaine.⁸⁹ Bien qu'originellement développée (et toujours utilisée) pour la gestion des plaies chroniques, cette modalité de traitement fait maintenant partie des thérapies de première ligne pour les plaies traumatiques aiguës telles que les plaies de dégageage et de cisaillement, les fractures ouvertes, ainsi que les plaies chirurgicales, les déhiscences de plaies chirurgicales, les greffes cutanées, les lambeaux cutanées et les sepsis abdominaux.⁹⁰⁻⁹²

Le but de la NPWT est d'aspirer l'exsudat de la plaie, rapprocher les bords de la plaie mécaniquement, diminuer l'œdème, favoriser la vascularisation du lit de la plaie et potentiellement stimuler les cellules des phases inflammatoire et de prolifération de la guérison.⁹³ Bien que de nombreuses applications de la NPWT soient rapportées dans la littérature scientifique humaine, les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques en lien avec cette technologie ne sont pas encore complètement élucidés et sont sujets à débat.^{93,94} Plusieurs mécanismes d'action de la NPWT ont été proposés et ont été étudiés. Ils incluent, par exemple, l'aspiration de l'exsudat (incluant les cytokines et protéinases),⁹⁵⁻¹⁰¹ la contraction mécanique de la

plaie,⁹⁵ la réduction de l'œdème,^{85,86,98,102-105} la modulation de la perfusion tissulaire, l'amélioration de la qualité du tissu de granulation⁹⁶, et la diminution de la charge bactérienne.^{87,88}

Il est aussi suggéré que les macro- et microdéformations appliquées à la plaie et particulièrement aux cellules au sein de celle-ci ainsi que le gradient hypoxique créé par la NPWT favorise le recrutement, la prolifération et la différenciation de ces cellules. Cela contribuerait à promouvoir l'angiogénèse et la fibroplasie.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ En effet, il semble, par exemple, que les contraintes mécaniques imposées aux fibroblastes favorisent leur prolifération et leur production de collagène.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ La déformation de l'ECM et les contraintes mécaniques imposées sur les cellules des bords de la plaie seraient aussi la cause de l'augmentation de la prolifération cellulaire et de la production de tissu de granulation.

En termes de néovascularisation, il est admis que la NPWT augmente la perfusion au sein de la plaie bien que des zones d'hypoperfusion sont aussi observées au niveau des bords de la plaie à la suite d'un traitement avec la NPWT.^{111,112} L'oxyde nitrique semble aussi jouer un rôle dans les modifications vasculaires induites par traitement avec la NPWT. Le blocage de l'oxyde nitrique synthase diminue les effets normalement observés sur la perfusion vasculaire.¹¹³ L'implication des foams à base de polyuréthane dans certains systèmes de NPWT a aussi été suggérée. Les plaies traitées par NPWT avec ce type de foam montrent une vascularisation plus importante que les plaies traitées sans foam.¹¹⁴ L'utilisation de la NPWT avec une pression intermittente favorise aussi l'angiogénèse comparativement à l'emploi d'une pression continue.¹¹⁵⁻¹¹⁸ L'effet de la NPWT sur la vascularisation semble complexe et associé à une balance entre une stimulation hypoxique et une augmentation du flot sanguin. L'augmentation de la perfusion est bénéfique car elle permet l'apport des nutriments et de l'oxygène tandis que sa diminution favorise, via une stimulation hypoxique, la fibroplasie et l'angiogénèse.

La NPWT semble aussi agir au niveau moléculaire dans le processus de guérison cutanée. Une revue systématique sur le sujet a été publiée en 2014 et a inclus 16 articles sur le sujet. Les auteurs ont conclu que les différents profils d'expression des cytokines et des facteurs de croissance sous pression négative suggèrent que c'est la modulation des cytokines vers un profil anti-inflammatoire, et la médiation par des mécano- et chimiorécepteurs des signaux cellulaires qui influencent l'angiogénèse, le remodelage de l'ECM et la formation de tissu de granulation.¹¹⁹

L'effet de la NPWT sur le microbiome des plaies est sujet à controverse dans la littérature. Dépendamment des études, une diminution⁸⁶, une augmentation^{115,120,121} ou une absence d'effet¹²²⁻¹²⁵ sur la charge bactérienne est rapportée. La variabilité des résultats trouvés est probablement en

lien avec la grande variabilité des protocoles employés. Différentes méthodes de prélèvements, de culture, modèles et types de plaies ont été utilisés. Il est intéressant de noter que l'effet de la NPWT pourrait aussi se situer à l'échelle même du micro-organisme; en effet, une équipe a récemment rapporté que la NPWT avait un effet sur la croissance et les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*.¹²⁶ Une revue systématique de la littérature a été publiée en 2017 sur l'influence de la NPWT sur la croissance bactérienne et a conclu qu'il existe des preuves montrant que la NPWT a un effet sélectif sur les espèces bactériennes en limitant, par exemple, la prolifération des bacilles à Gram négatif non-fermentaires.¹²⁷ Cette limitation sélective de ces espèces laisserait alors la place à d'autres bactéries opportunistes tels que les coques à Gram positif.



Figure 7 : Exemple de systèmes de NPWT. A, V.A.C. Via (KCI Medical Canada Inc.). B, PICO (Smith & Nephew).

D'après www.kci-medical.ca et www.smith-nephew.com.

De nombreux systèmes et pansements de NPWT sont actuellement sur le marché (Figure 7). Dans le cadre de cette thérapie, plusieurs paramètres sont modifiables : la pression utilisée, le type de pansement, l'emploi ou non d'interfaces au contact de la plaie et l'utilisation de matériaux pour combler les espaces morts dans certaines plaies. Un panel d'experts a publié dans les dernières années une évaluation des différentes modalités de traitement existantes pour la NPWT.¹²⁸ Dans

les dernières années, une technique de NPWT avec instillation concomitante d'une solution topique au sein de la plaie a été développée et semble aussi avoir différents effets bénéfiques sur la guérison dépendamment de la solution employée.^{129,130}

En dehors des études précliniques réalisées sur des animaux de laboratoire, il existe quelques études vétérinaires sur le sujet. Des rapports de cas ont décrit l'emploi de cette thérapie chez le chat,¹³¹⁻¹³³ le chien^{134,135} et certains animaux exotiques.¹³⁶⁻¹³⁸ Plusieurs études rétrospectives et prospectives ont aussi été réalisées chez le chat¹³⁹ et le chien.^{96,140-143} Chez le cheval la littérature est beaucoup plus succincte. Un unique rapport de cas chez le cheval a rapporté l'utilisation d'un système de NPWT non-portable sur une plaie extensive de l'encolure et a conclu que cette modalité de traitement facilitait et accélérât la cicatrisation par seconde intention.¹⁴⁴ Une équipe a récemment travaillé sur l'effet antibactérien de trois mousses différentes pour la NPWT sur un modèle de plaie *ex vivo* chez le cheval.¹⁴⁵

Plusieurs effets notables de la NPWT pourraient être utiles dans le cadre de la gestion des plaies traumatiques chez le cheval. La prévention du phénomène de rétraction, la diminution de la taille de la plaie, la réduction de la charge bactérienne et de l'œdème ainsi que la promotion de la fibroplasie favorisent une meilleure cicatrisation par seconde intention ou la préparation de la plaie pour une future reconstruction. Chez le chien, la NPWT promeut la mise en place d'un lit de plaie sain et accélère l'apparition d'un tissu de granulation sain, non-exubérant et démontrant une meilleure organisation histologique des fibres de collagène.⁹⁶ Ces effets reflètent la faible propension des plaies traitées à développer un EGT. Avec le développement, au cours des dernières années, de petites unités portables sans réservoir de NPWT^{146,147}, l'application de cette modalité de traitement à l'espèce équine est facilitée.

Il est intéressant de noter que parallèlement, en médecine humaine, des résultats préliminaires prometteurs ont été publiés sur l'emploi de la NPWT avec un pansement siliconé sur des chéloïdes.¹⁴⁸ Cependant des études prospectives sont nécessaires afin de confirmer ces résultats.

II. Hypothèses et objectifs

Hypothèses :

- ❖ Un traitement avec le système de NPWT PICO permet la diminution de la charge bactérienne dans un modèle *ex vivo* de plaie cutanée
- ❖ La mise en place du système de NPWT PICO est très bien tolérée par les chevaux et permet l'administration d'une pression négative continue à des plaies cutanées ouvertes dans un modèle expérimental chez ces chevaux.
- ❖ Des plaies cutanées ouvertes expérimentales traitées avec un système de NPWT démontrent un processus de guérison supérieur comparé à des plaies traitées de manière conventionnelle.

Objectifs :

- ❖ Evaluer l'efficacité du système de NPWT PICO à contrôler la croissance bactérienne dans un modèle *ex vivo* de plaie cutanée chez le cheval.
- ❖ Evaluer la faisabilité de l'emploi d'une unité de succion légère et jetable pour administrer une pression négative continue à des plaies cutanées ouvertes dans un modèle expérimental chez le cheval.
- ❖ Evaluer l'efficacité de l'appareil à améliorer le processus de guérison

III. Article

A. Corps

Experimental study on the feasibility of using a disposable canister-free negative-pressure wound therapy (NPWT) device on open wounds in horses

Louis Kamus DMV, Marie Rameau, Marie Archambault DMV, PhD, Diplomate ACVM,
Christine L. Theoret DMV, PhD, Diplomate ACVS
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

Abstract

Objective: To assess the efficacy of PICO NPWT system to control bioburden in an *ex vivo* model of cutaneous wounds in horses; to evaluate the feasibility of using this portable canister-free system to treat experimental open wounds in horses and, originally, to assess its efficacy to enhance healing.

Study design: Experimental *ex vivo* and *in vivo* studies.

Animals: Equine cadaver limbs (n = 9) and live horses (n = 4).

Methods: Full-thickness skin wounds were created on 9 cadaveric limbs of horses and infected with Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Following 24h of incubation, PICO (n = 4) or a conventional dressing (n = 5) was randomly applied to the wounds. CFU/mL were quantified for each wound at 0, 12 and 24 hours of treatment. After preliminary *in vivo* testing, PICO was unilaterally applied to full-thickness skin wounds created on the dorsolateral surface of the metacarpus and on the thoracic wall of 4 horses, whereas wounds on the contralateral sites received a standard wound care with a non-adherent dressing.

Results: MRSA bacterial burden did not differ between control and NPWT-treated wounds at any time during the study. All horses readily tolerated the PICO but difficulties with adhesion and seal prevented the completion of the *in vivo* experiment despite the use of many adjunctive adhesives.

Conclusion: PICO had no effect on the MRSA load of contaminated experimental *ex vivo* wounds during the first 24h of treatment. The current PICO dressing design must be adapted further for use in equine practice.

Introduction

Wounds have a major economic impact on the horse industry.^{18,19,21,149,150} A large study by the United States Department of Agriculture found that wound/trauma/injury was the most common medical condition affecting horses, with a prevalence of 4.7% in horses six months or older.¹⁴⁹ It was the leading cause of death in foals less than 6 months old, accounting for 23.9% of deaths, and was the leading cause of mortality after old age.¹⁴⁹

In fact, the wound healing process in horses is distinct to that documented in other species, and often results in delayed healing and extensive scarring, with compromised functional and aesthetic outcomes.¹⁵¹ Second intention healing in horses is often fraught with complications. These complications mostly affect wounds on the distal limb where healing is characterized by a weak acute inflammatory response¹⁵² followed by chronic inflammation, often leading to the development of Exuberant Granulation Tissue (EGT)¹⁵³ and a subsequent delay in epithelialization, contraction and wound closure. Excessive environmental contamination in the horse's environment and the proximity of the wound to the ground are often contributing factors. To date, there is no conventional method objectively proven to accelerate healing or to successfully prevent EGT. Consequently, there is a dire unmet need to investigate available adjunctive treatment modalities already shown to support wound healing in human medicine. Negative pressure wound therapy (NPWT) has become the first line of treatment for surgical wounds, skin grafts, chronic wounds as well as acute accidental contaminated wounds in man.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Several notable effects of NPWT may be particularly useful to the management of accidental wounds in horses. For example, the prevention of wound retraction, decrease in wound size, reduction of wound bioburden and wound edema, and early onset of fibroplasia should be beneficial to wounds healing by second intention or for wounds being prepared for reconstruction. However, the cumbersome design of classic NPWT devices renders them unsuitable for equine practice. A new lightweight, portable (canister-free) and disposable unit of NPWT, PICO from Smith & Nephew (Lachine, Canada), should facilitate the use of this modality by equine practitioners.

A few case reports have described the use of negative pressure to treat wounds in cats, dogs and exotic animals. Retrospective and prospective studies have also been done in cats^{157,158} and dogs.¹⁵⁹⁻¹⁶⁴ In addition to occurring earlier, the granulation tissue filling a wound treated by NPWT in dogs has been noted to be smoother, not exuberant, and histologically demonstrates well-organized collagen fibers.¹⁵⁹ This suggests a decreased likelihood for NPWT-treated wounds to develop EGT. In horses, the literature is more scarce. A single case report in a horse describes the use of a non-portable NPWT device, with a canister, on an extensive open wound of the neck

and concludes that second intention healing is facilitated and accelerated by NPWT.¹⁶⁵ The antibacterial effect of NPWT using 3 different foams in an equine *ex vivo* wound model was also recently reported.¹⁴⁵

Our study aimed 1- to assess the efficacy of the PICO NPWT system to control bacterial growth in an *ex vivo* model of cutaneous wounds in horses, 2- to evaluate the feasibility of using this disposable, lightweight vacuum unit to administer continuous negative pressure to experimental open wounds in horses and 3- originally, to assess the efficacy of the device to enhance the healing process (Figure 1).

Material and methods

Negative-pressure wound therapy device

The simplified NPWT device (PICO, Smith & Nephew) consists of a vacuum unit and a four-layered dressing connected through tubing. The vacuum unit is powered with two AA lithium batteries and is programmed to deliver a continuous negative pressure of -80 mmHg.¹⁶⁶ A green light on the pump illuminates to indicate that an airtight seal has been obtained, while an orange indicator light and a lack of wrinkling of the dressing are indicative of leaks. The patented four-layered dressing consists of a primary contact silicone layer, an airlock layer that allows even distribution of negative pressure, an absorbent layer that moves exudate away from the wound and an outer vapor transmission layer that allows one-way transpiration of exudate. The manufacturer suggests applying bands of adhesive polyurethane film (OPSITE, Smith & Nephew) over the silicone edges of the dressing to improve the seal between the dressing and the skin.

***Ex vivo* experiment**

Nine equine thoracic limbs were obtained from a local slaughter-house on the day of testing. Limbs were disarticulated at the intercarpal joint and at the fetlock joint, to keep only the cannon area, which was clipped, scrubbed with 2% chlorhexidine gluconate soap and subjected to depilation with hair removal cream (Veet, Reckitt Benckiser, Berkshire, UK). After an aseptic preparation including a 5-minute 4% chlorhexidine gluconate scrub followed by an 70% alcohol rinse, a rectangular (2X3cm) full-thickness skin excision was surgically created on the dorsolateral surface of the cannon. Based on the results of a pilot study undertaken in our laboratory (data not shown), wounds were artificially contaminated with a bacterium. Briefly, a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, ST8 m2340, bacterial culture collection of the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal) previously isolated from a skin wound of a horse presented to the veterinary teaching hospital, was inoculated on blood agar (Columbia blood agar w/ 5% sheep blood, Oxoid, Nepean, Canada) and incubated for 24h at

37°C to prepare an inoculum in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) from a 0.5 McFarland. Wounds were infected by direct application of this inoculum (500µL) on each wound surface immediately following their creation. Limbs were then incubated (CO₂ water-jacketed incubator, NuAire, Plymouth, MN) at 37°C during the entire experiment.

After a 24h infection period, treatments were begun (time 0 referred to as t0): four wounds were treated with NPWT (PICO, dressing 10x20cm, Smith & Nephew) and five wounds received a conventional bandage (control group) consisting of a non-adherent dressing (Telfa Island Dressing, Covidien-Medtronic, Saint-Laurent, Canada) and a sterile conforming bandage (Easifix, Smith & Nephew) (Figure 2).

Wounds were sampled immediately prior to treatment (t0), then 12h and 24h later (t12 and t24), with dressings removed from the wounds to allow sampling, and then replaced. Based on the results of a pilot study undertaken in our laboratory (data not shown), sampling was performed with a cytobrush (Cytobrush Plus GT sterile, Cooper Surgical Company, Trumbull, CT) by gently brushing the surface of the wound bed for 10 seconds. The tip of the cytobrush was then placed in a sterile Eppendorf tube and mixed for 15 seconds by vortex before dilution series (1:10) were performed. An aliquot of 100µL of each dilution was spread on MRSA-selective agar (MRSA Select, Bio-Rad, Mississauga, Canada) and incubated for 24h. Bacterial burden, expressed as Colony-Forming Units per mL (CFU/mL), was counted manually for each dilution at each time of sampling, and expressed as a mean.

Preliminary *in vivo* experiment

The protocol was evaluated and approved by the ethics board on animal use of the Université de Montréal, which follows the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (approval # 15-Rech-1811).

A pilot study was performed on two mares from the teaching herd of the veterinary faculty. The aims of this arm of the study were to verify 1- the ability to secure the PICO dressing to the (unwounded) skin at the distal limb and the thoracic wall, and 2- determine patient tolerance of the device.

Limb: The distal extremity of the right forelimb of one mare was clipped and scrubbed with 2% chlorhexidine gluconate soap. Hair removal cream (Veet, Reckitt Benckiser) was used on the canon, fetlock and pastern according to manufacturer instructions. A PICO dressing (15x20cm) was applied to the dorsolateral surface of the cannon with the suction port positioned proximally and the evacuation tubing coursing towards the mare's trunk. Bands of adhesive polyurethane film (OPSITE, Smith & Nephew) were applied at the junction between the silicone edges of the

dressing and the skin. The pump was then connected to the evacuation tubing exiting the dressing and attached to the horse's neck using the pouch and strap supplied with the device (Figure 3).

Thorax: The same skin preparation was used on the right hemithorax of a second teaching mare and the PICO system was applied using a 10x20cm dressing. The pump was then connected to the dressing and attached to the horse's neck using the pouch and strap supplied with the device.

Both mares were monitored during one hour for vacuum leakage, maintenance of the dressing and for tolerance to the system.

***In vivo* experiment**

This study was experimental, prospective, controlled and randomized with a paired design.

Six healthy horses (6 mares) with no evidence of dermatological disease, wounds or scarring on distal forelimbs were included. Mean age of the horses was 9 years (range 5-15). Breeds included Quarter Horse (2), Paint Horse (1), Thoroughbred (1) and mixed breed (2). Horses were dewormed and vaccinated (tetanus, encephalitis, influenza, rabies) and allowed an acclimation period of 2 weeks following purchase. Hemithoraxes and distal forelimbs were clipped, scrubbed with 2% chlorhexidine gluconate soap and depilated with hair removal cream (Veet, Reckitt Benckiser). Horses were sedated with detomidine hydrochloride (0.01 mg/Kg, intravenously [IV]) and butorphanol tartrate (0.04 mg/Kg, IV). Local anesthesia was performed using 2% lidocaine hydrochloride: an inverted L-block was used just below the carpus to desensitize the dorsolateral surface of the cannon while an inverted L-block performed distant from the wounding area desensitized the hemithorax. Based on our previously established limb/body wound model,¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ full-thickness skin wounds were created on the distal extremity of both thoracic limbs (two, 6cm² wounds per limb) and on both lateral mid-thoracic walls (two, 15cm² wounds per hemithorax, with a 5cm tunneling of the distal muscular plane of each wound) (Figure 4). All wounds were left to heal by second intention. All wounds on the right or left limb/body were randomly assigned to either the control or NPWT for 7 days, after which wounds would be left without treatment until complete healing.

NPWT: The protocol was established in consultation with the manufacturer (Smith & Nephew) and based on a review by the British Association of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgeons.¹⁷⁰ The limb assigned to the NPWT was bandaged as per control limb for the first 24h postoperatively, to control hemorrhage. Wounds on the thoracic wall were left unbandaged during this time. After 24h, the limbs were unbandaged and the PICO dressings were applied to treated wounds in both anatomical locations. Wounds on the treated limbs and thoracic walls were supposed to receive a 7-day treatment using a 15x20 dressing connected to the PICO pump (Figure 1).

Control: Limb wounds received a traditional half-limb bandage consisting of a low-adherent gauze-like dressing (MELOLITE, Smith & Nephew) covered by cotton wool roll held in place with an adhesive tertiary layer. Bandages were changed every other day and maintained for a total of 7 days, after which the wounds were left uncovered. Wounds on the thoracic wall were left unbandaged for the duration of the study, as per clinical practice.

Originally, dressings were to be changed every other day, to coincide with times at which wound progression was documented macroscopically and photographically. Wounds were to be evaluated for the quality of granulation tissue, the presence of EGT, and the healing rate. Under sedation and local anesthesia, full-thickness wound margin samples were harvested from one wound per site (treated body; control body; treated limb; control limb) at days 0 (time of wound creation), 1, 3, 8, and 17, and at the time of full healing. These samples were intended for light and immunofluorescent microscopy to assess features of inflammation and healing and for RT-qPCR to measure the expression of a pre-selected panel of genes.

Statistics

Data were analyzed using the SPSS software program (SPSS Advanced Statistics 8.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL).

Ex vivo experiment: Repeated-measures ANOVA were performed to determine the overall main effect of treatment (NPWT vs. control) with additional *post-hoc* comparisons by the student t-test to compare means, with significance set at $p \leq 0.05$. The alpha level for each comparison was adjusted using the Benjamini-Hochberg sequential procedure.

Results

***Ex vivo* experiment**

The mean MRSA bacterial burden did not differ between control wounds and those treated with the PICO NPWT system, at any time during the study (t0: $p = 0.12$, t12: $p = 0.39$, t24: $p = 0.26$) (Table 1). In the NPWT group, the mean bacterial burden at t0 (24h following contamination with MRSA) was not different from means at t12 ($p = 0.029$, not significant after correction) and t24 ($p = 0.025$, not significant after correction). Likewise, in the control group, the mean bacterial burden at t0 was not different from means at t12 ($p = 0.13$) and t24 ($p = 0.054$).

Preliminary *in vivo* experiment

Vacuum was achieved upon first application in both mares, as confirmed by the green light and wrinkling of the dressing pad occurring within 30s. The vacuum was successfully maintained, with the mares under observation, for a pilot period of one hour. The mares showed no signs of pain or discomfort. Voluntary movement and manipulation of the mares did not preclude maintenance of vacuum during the experiment.

***In vivo* experiment**

Since no difficulties were encountered with the application or maintenance of the PICO system on cadaver limbs during the *ex vivo* experiment or during the preliminary *in vivo* study, it was decided to proceed with the main *in vivo* experiment.

Two groups of two horses started the experiment at a 24h interval from one another.

A mild skin rash was noted on the thoracic wall of one mare following application of the hair removal cream prior to wounding. This complication resolved in 48h and was not observed in the other mares. Although no significant hemorrhage occurred during the first 24h after wounding, subcutaneous edema developed around thoracic wounds, particularly along the distal border where tunneling was performed.

Difficulties were encountered during the first application of the PICO dressing, at both anatomic locations, in the first group of two mares. In spite of a thorough initial cleansing with Chlorhexidine gluconate 4% soap (HibiScrub, Mölnlycke Health Care, Oakville, Canada) followed by careful drying of the skin surrounding the wound margins, the silicone adhesive layer of the PICO dressing did not stick to the skin. The addition of an adhesive polyurethane film (OPSITE, Smith & Nephew) over the dressing's edges did not improve adhesion as this film also failed to stick to the skin (Figure 5). As a consequence of the ineffective seal, the vacuum was not achieved at this stage of the experiment. In an effort to preclude the possibly negative effect of the subcutaneous edema developing around the thoracic wounds, the PICO dressing was applied immediately at both anatomic locations following wound creation in the second group of two horses. An effective vacuum was achieved in the thoracic area but successfully maintained for only 15 to 20 minutes. A satisfactory vacuum was not obtained on the limb wounds in any of the four mares. The PICO hardware was well tolerated by all the mares, for a 24h period in their stalls.

In view of these unexpected difficulties, an additional set of tests was then undertaken on an unwounded mare to determine the best configuration to successfully apply the PICO dressing. Various elements and conditions were tested in an effort to improve the dressing adhesion and vacuum pump efficacy. The initial skin preparation was revised since, during the experimental wound study, two mares were observed to sweat profusely following sedation, which may have reduced the stickiness of the PICO dressing. Consequently, an antiperspirant spray (MEN REXONA Adventure, Unilever Canada Inc., Toronto, Canada) was applied locally following skin preparation, though this did not improve adhesion of the dressing. A liquid dressing (SKIN-PREP, Smith & Nephew) was also used to prepare the skin following cleansing and before dressing application, but this also failed to improve adhesion of the PICO dressing to the horse's

skin. The adhesion of the dressing on the distal limb was tested with and without prior treatment with hair removal cream to assess the cream's and the hair's potential effect on the adhesive properties of the PICO dressing. Although good dressing adhesion was obtained in both cases, the pump was unable to maintain an effective vacuum. The vertical depressions between the splint bones and the suspensory ligament were filled with gauze to eliminate dead space, however, this did not help to achieve an effective vacuum.

Various adjunctive adhesives were also tested at the periphery of the thoracic wounds of the four mares in which application of the PICO device failed: cyanoacrylate glue (Krazy Glue, Krazy glue Inc., High Point, NC), spray adhesive (Mueller Tuffner Pre-tape spray, Mueller sport medicine Inc., Prairie du Sac WI), gel adhesive (RENASYS Adhesive *gel patch*, Smith & Nephew) and silicone gel patches (CicaCare, Smith & Nephew) all failed to improve adhesion sufficiently for vacuum to be maintained. Other elements were superimposed on the edges of the PICO dressing: a spray dressing (OPSITE SPRAY, Smith & Nephew), a liquid dressing (NewSkin Liquid bandage, Moberg Pharma North America LLC, Cedar Knolls, NJ) and an adhesive elastic band (TENSOPLAST, BSN Medical Canada, Laval, Canada); these also failed to enhance adhesion of the PICO dressing.

The application of a stoma paste (Stomahesive, ConvaTec, Dorval, Canada) to the edges of the PICO dressing generated variable results (Figure 6). Adhesion of the dressing was sufficient to allow an effective and stable vacuum to be achieved and maintained for 24 to 48h on the thoracic wounds of three mares and on the thoracic skin of one unwounded mare. The mares received a 7-day NPWT with daily dressing change; indeed, focal liquefaction of the stoma paste was consistently observed 24h after application and precluded vacuum maintenance, obliging frequent dressing change. Moderate cutaneous irritations and subcutaneous edema were observed on all mares at the first change of the dressing (Figure 7). In these mares, the PICO NPWT system was well tolerated by three individuals for the week-long trial, whereas one individual required the installation of a shoulder protection to shield the vacuum pump.

A special dressing designed for complex anatomical areas (PICO Multi-site, Smith & Nephew) was tested, with the stoma paste, on two distal forelimbs: one with and one without wounds. Moreover, a breathable bandage consisting of cotton undercast padding (Webril, Covidien-Medtronic), stretch bandage (Curity, Covidien-Medtronic) and bandaging tape (VetRap, 3M Canada, London, Canada) was applied over the PICO dressing. This design enabled the achievement and the maintenance of a vacuum for 4 consecutive days. However, cutaneous irritations were noted in both cases after dressing removal at 4 days: the mare with experimental

wounds had minor irritations whereas the unwounded mare developed severe cutaneous irritations associated with cellulitis (Figure 8).

The third group of two horses intended for participation in the *in vivo* wound experiment was ultimately excluded from the study due to the difficulties encountered with the application of the PICO dressing on the first four horses' wounds. For the same reason, macroscopic, histologic and molecular analyses intended to assess the effectiveness of NPWT (third aim) were not completed.

Discussion

The first part of our study aimed to assess the ability of the PICO system to control bacterial growth in cutaneous wounds in horses. For ethical reasons, this part of the experiment was conducted in cadaver limbs to avoid *in vivo* contamination by the MRSA strain used as a marker in this experiment. This bacterium is a good indicator in this system because it is not part of the horse's commensal flora^{171,172} and is rarely identified in horses' wounds.¹⁷³ Moreover, our cadaver model enabled us to study specifically the effect of the NPWT system in the absence of a contribution from the immune system. Various mechanisms have been proposed to explain the beneficial effect of NPWT on wound healing: elimination of wound exudates (deleterious cytokines and proteases), reduction of wound edema,⁸⁷ alteration of blood flow and early onset of a healthy bed of granulation tissue,¹⁵⁹ and enhanced wound contraction.^{174,175} Indeed, a direct effect of negative pressure on the growth and the virulence factors of *Staphylococcus aureus* has been previously reported.¹⁷⁶ Despite a decreased bacterial load observed *in vivo* in experimental wounds in pigs treated with NPWT,⁸⁷ this effect was not reproduced using our *ex vivo* model. Similarly, other *in vitro* and *in vivo* studies performed in other species have variably shown a decrease¹⁷⁶ or an increase in bacterial load,^{177,178} or an absence of effect.^{179,180} Our *ex vivo* model is closer to reality than an *in vitro* model but is nevertheless subjected to limitations such as desiccation and tissue decay which were both observed after 24h. Perfusing the vasculature of the cadaver limbs with a physiologic solution, as recently described by Van Hecke *et al*,³² might have protected the tissues against these pitfalls. Indeed, increasing the lifespan of the cadaver limbs might have allowed a longer treatment with the NPWT, which, according to the study performed *in vivo* on the wounds of pigs, may be necessary because significant decreases in bacterial levels occurred only after 5 days of treatment.⁸⁷ However, the impact of NPWT on tissue perfusion should also be considered to explain bacterial control in such a clinical setting since it would lead to increased delivery of immune cells to the wound bed.

Our *in vivo* experiment aimed to assess the feasibility of using a small, portable unit (PICO) to administer negative pressure to open wounds in horses. The highly-evaporative dressing (with a purported capacity of 300 mL of wound exudate) of the PICO system obviates the need for a

canister to manage exudate, rendering the system both disposable and ultra-portable (the vacuum pump is $8.5 \times 8.5 \times 2.5$ cm in size and weights <120g). This lightweight design is very appealing for veterinary wound management since many patients cannot be confined to a cage or a stall for the duration of therapy. A recent retrospective study described clinical experience with the PICO system to successfully manage free skin grafts on the limbs in seven dogs.¹⁶⁰ In our study, the majority of horses readily tolerated the PICO system during 7 days since it allowed normal mobility. Supplementary device protection was required for only one mare, demonstrating that the design of the PICO vacuum pump is well suited for use in horses.

Difficulties were however encountered with the dressing component of the PICO system, although preliminary testing on unwounded hairless limb/thoracic skin and during the *ex vivo* experiment did not foretell these problems, encouraging our team to proceed with the *in vivo* experiment. A good result was obtained when a PICO dressing was applied, alone, on unwounded skin after hair removal and skin preparation as described in the Materials and methods section. The PICO dressing stayed in place and negative pressure was achieved and maintained for 5 days during this preliminary experiment. This was unfortunately not reproducible in the mares in our *in vivo* experiment and could imply that inflammation and edema caused by wounding and tunneling of the thoracic wounds may have contributed to the problems encountered. A satisfactory vacuum could not be obtained for limb wounds when using only the PICO dressing, possibly because the vertical cleft in the region distal to the splint bones created an air pocket that may have counteracted the force of the pump. According to the manufacturer, the primary contact silicone layer is designed to minimize pain upon removal and to adapt to skin irregularities and scattered small hairs on the patient's skin. Compared to humans, horses have a very high pilosity and thicker individual hairs, especially on the distal limb. No major difficulties in adhesion of the PICO dressings were reported in a recent study in dogs.¹⁶⁰ We are not aware of studies directly comparing horse and dog skin that could help explain the adhesion problems encountered in our study. However, horse skin characteristics are known to differ from those of other species.¹⁸¹ Horses have thicker skin¹⁸² especially over the dorsal and lateral surfaces of limbs compared to the rest of the body.¹⁸³ Horse skin is well endowed with numerous sweat glands (apocrine glands), physiologic control of sweating is different, and horses sweat more and in different patterns from most other species. Also, apart from being strongly alkaline, horse's sweat contains a high concentration of a glycoprotein called latherin, which is believed to act as a wetting agent to facilitate heat dissipation through the oily coat of horses.¹⁸⁴ Moreover, surface lipids of horse skin have been studied and are different from those of humans. They include a high percentage of lactones, sterol esters, cholesterol and wax diesters.^{185,186} As yet unestablished, we suspect that

these characteristics may have led to the adhesion difficulties encountered in our study. Interestingly, during the trial, a PICO dressing that failed to adhere to horse skin was then applied successfully to the intact skin of one of the researchers, confirming our impression that the current design of the PICO dressing, while perfectly suited to human patients, is not optimized for horse skin. To enhance the adhesion capacity of the primary contact silicone layer, different adjunctive products and approaches were tested but failed. The best functional outcome was obtained with a stoma paste applied to the edges of the PICO dressing pad, enabling a better contact with the thoracic skin and facilitating the work of the vacuum pump. Similar results were achieved on the distal limb with a combination of stoma paste, a more flexible PICO dressing (PICO Multi-Site, Smith & Nephew) and a traditional half-limb bandage without the secondary layer. However, although the PICO system functioned with these modifications, complications including moderate to severe cutaneous irritations and cellulitis preclude the use of stoma paste to ensure adequate adhesion of the currently available PICO dressing in horses.

In conclusion, our data suggest that there is no effect of NPWT on the bacterial load of contaminated experimental wounds with MRSA during the first 24h of treatment in an *ex vivo* setting and that the current design of the PICO dressing is not suited for horse skin though the device is well tolerated by equine patients. A dressing with a wider adhesive edge, a superior adhesive and more flexible pad would likely be better adapted for use in equine practice.

Acknowledgment

We would like to thank Josée Labrie and Claudia Duquette for technical assistance and Guy Beauchamp for the statistical analysis.

Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest related to this report.

Grant and financial support

This study was partially supported by an unrestricted research grant from the ACVS foundation and an in-kind donation from Smith & Nephew Canada. The funding has no role in the conception or execution of the study. The laboratory work associated with bacteriology was financially supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (M. Archambault, RGPIN-191461; Christine Theoret, RGPIN-253624)

B. Figures

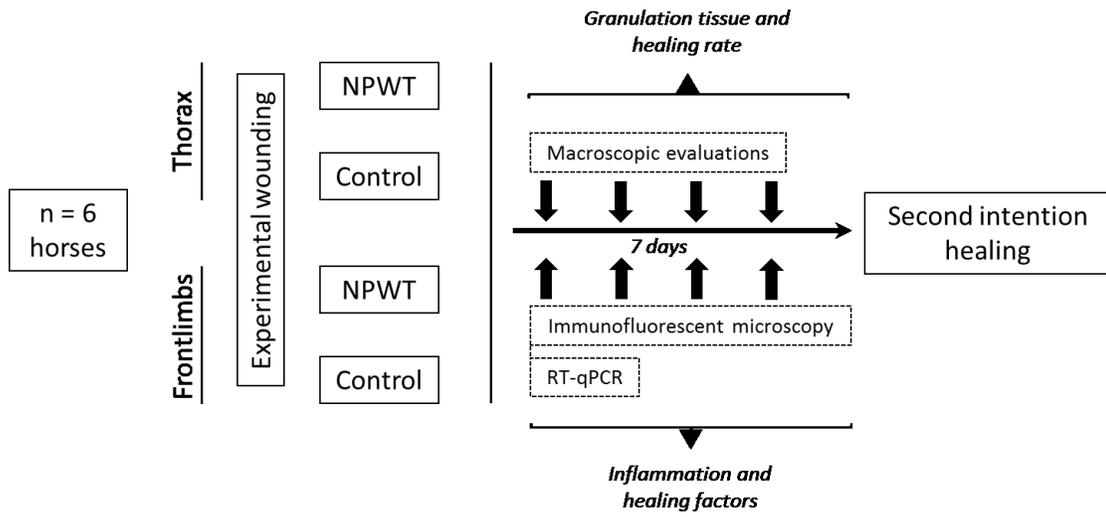


Figure 1: Schema of original *in vivo* study design



Figure 2: *Ex vivo* experiment on equine cadaveric limbs. Four wounds were treated with NPWT (right) and five wounds received a conventional bandage (left) as a control group consisting of a non-adherent dressing and a sterile conforming bandage.

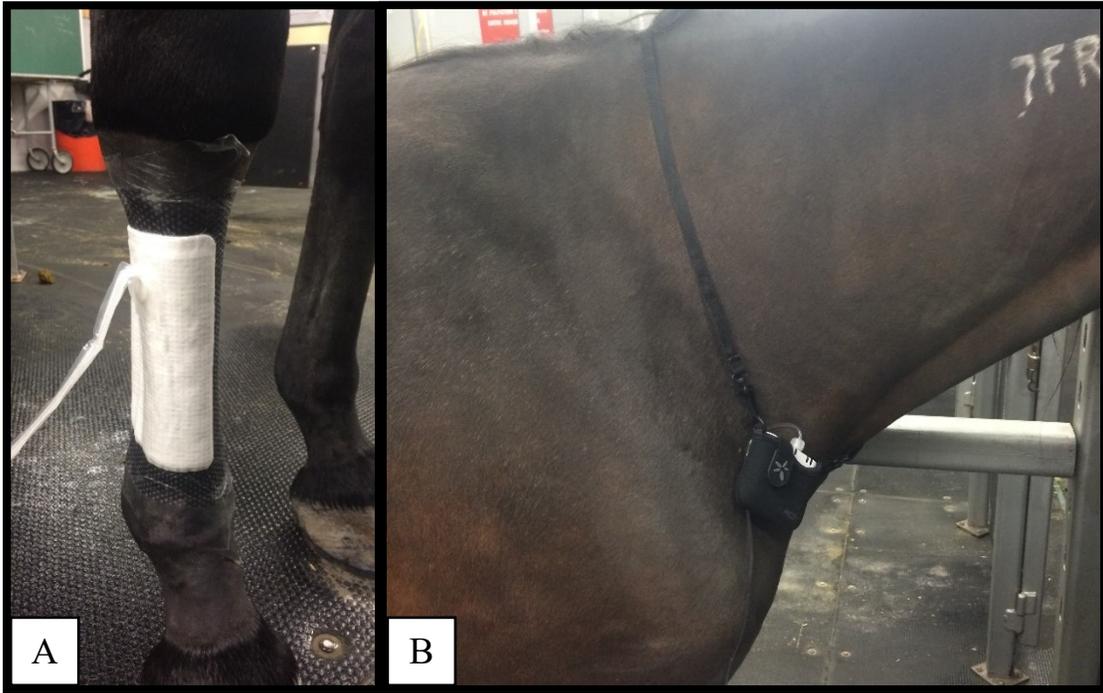


Figure 3: Preliminary *in vivo* experiment. A, PICO dressing (15x20cm) in place, over the dorso-lateral and lateral surfaces of the cannon of an unwounded horse. B, PICO vacuum pump in the pouch supplied by the manufacturer, held in place around the neck of a horse using the strap provided by the manufacturer.

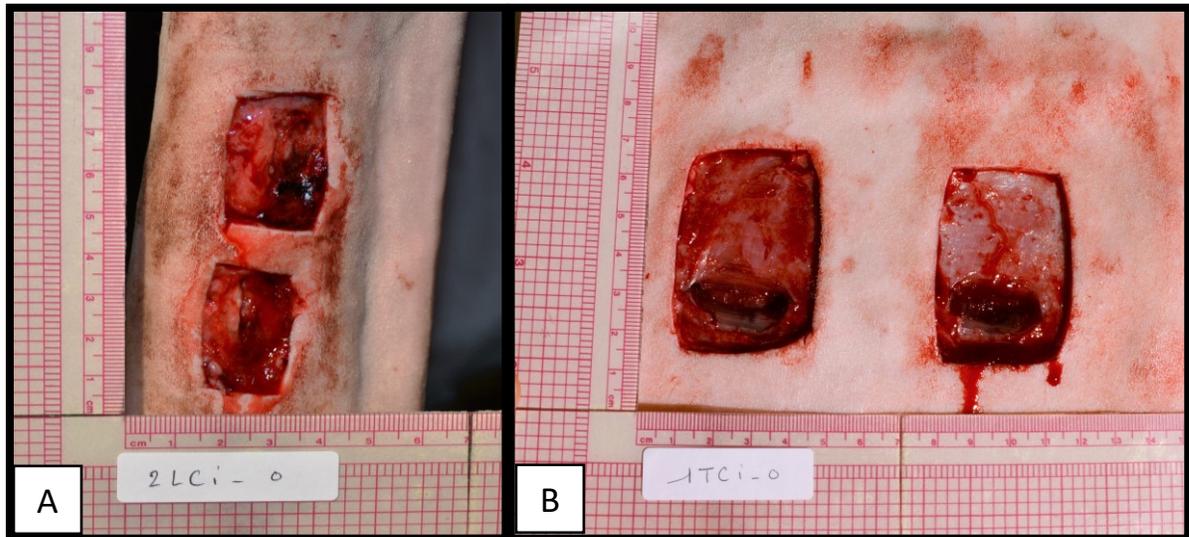


Figure 4: Wound model for *in vivo* experiment. A, distal limb, B, thorax, showing muscular tunneling along the distal border.



Figure 5: Test application of the PICO dressing to thoracic wounds in association with polyurethane adhesive film (OPSITE, Smith & Nephew) strips placed over the dressing edges to improve adhesion.



Figure 6: Application of a stoma paste (Stomahesive®, ConvaTec, QC, Canada) to the edges of the PICO dressing in a effort to improve adhesiveness and enable effective vacuum to be achieved.

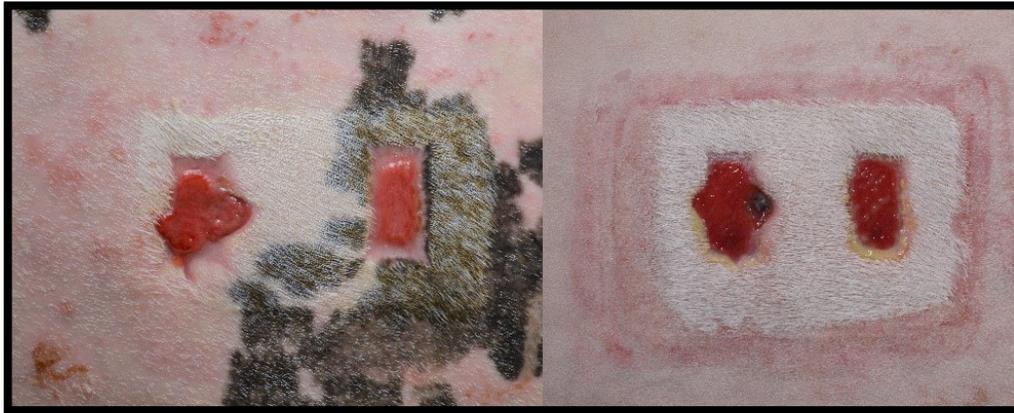


Figure 7: Cutaneous irritations and subcutaneous edema caused by stoma paste. Irregularities seen at the wound edges are the result of wound harvesting during the experiment intended for histological and molecular analyses.



Figure 8: Severe cutaneous irritations caused by the stoma paste on the distal limb of an unwounded mare. Irritations follow the edges of the PICO Multi-site dressing.

C. Tableaux

Table 1: Mean (SD) of MRSA bacterial count (log CFU/mL) of NPWT treated (PICO) and control wounds (Telfa). No differences were found.

Sampling time	MRSA burden (Mean \pm SD)		p-value (t test)
	Telfa (logCFU/mL) \pm SD	PICO (logCFU/mL) \pm SD	
t0	8.0 \pm 0.7	7.5 \pm 0.5	0.12
t12	8.3 \pm 0.3	8.0 \pm 0.4	0.39
t24	8.4 \pm 0.2	8.1 \pm 0.5	0.26

IV. Discussion

Le processus de guérison de plaie chez le cheval est très particulier et différent de ce qui est documenté chez les autres espèces. Les particularités de ce processus de guérison et les complications associées justifient le grand intérêt qui y est porté par plusieurs équipes de recherche en médecine vétérinaire. Au niveau des plaies appendiculaires, les complications sont abondantes et la guérison est généralement très lente, et ce, même avec les traitements conventionnels. Dans le cas de l'EGT, par exemple, aucun traitement pratique ne fait consensus parmi les vétérinaires pour prévenir son apparition et le traiter. De là naît l'intérêt d'investiguer les différents traitements adjuvants utilisés en médecine humaine pour soigner les plaies chroniques.

La thérapie par pression négative fait désormais partie des traitements d'appoint de première ligne en médecine humaine.⁸⁹ Comme nous l'avons vu, de nombreux effets de cette thérapie pourraient être bénéfiques pour la gestion de plaie traumatique chez le cheval, surtout à l'aspect distal du membre. Cependant, un seul rapport de cas existe en médecine équine¹⁴⁴ et les différents appareils utilisés classiquement en médecine vétérinaire souffrent d'un design peu pratique pour une utilisation chez le cheval. Dès lors, l'apparition sur le marché de nouvelles unités portables, sans réservoir et jetables de NPWT, justifie l'intérêt qui leur est porté ici.

A - Étude principale

Notre étude principale *in vivo* visait à évaluer la faisabilité de l'emploi d'une petite unité portable (PICO) pour administrer une pression négative à des plaies ouvertes chez le cheval. La grande capacité évaporatoire du pansement (avec une capacité présumée de 300mL d'exsudat de plaie) du système PICO permet d'éliminer le réservoir requis pour gérer l'exsudat dans les unités standards, rendant le système à la fois jetable et ultra-portable (les dimensions de la pompe à vide sont $8.5 \times 8.5 \times 2.5$ cm et son poids <120g). Ce design léger est très attractif pour la gestion de plaie en médecine vétérinaire où de nombreux patients ne peuvent être immobilisés dans une cage ou un box pour la durée du traitement. Les dispositifs classiquement utilisés en médecine vétérinaire utilisent une pression négative de -125mmHg. Le choix de cette pression est à la fois extrapolé de la médecine humaine et de certaines études menées chez le cochon.⁸⁸ Certaines études suggèrent, cependant, que des pressions situées entre -75mmHg et -100mmHg seraient plus appropriées pour optimiser le processus de guérison.^{117,187,188} De plus, un consensus établi par la British Association of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgeons basé sur une revue

systematique des études menées en médecine humaine a rapporté que la majorité des effets bénéfiques de la NPWT était retrouvée dans un intervalle thérapeutique allant de -50mmHg à -150mmHg.¹²⁸ Une diminution de la pression est recommandée pour réduire la douleur due au traitement et une augmentation pour gérer une plus grande quantité d'exsudat. A l'inverse des systèmes classiquement utilisés en médecine vétérinaire, le système PICO livre quant à lui une pression négative continue de -80mmHg. Une étude rétrospective clinique récente a décrit l'emploi de ce système de NPWT pour la gestion, avec succès, de greffes de peau sur les membres de sept chiens.¹⁶⁰

Ce système a été éprouvé par notre équipe de recherche dans deux expériences préliminaires: un test pilote sur des juments d'enseignement pour évaluer la mise en place et la tolérance du dispositif (présenté dans l'article), et une étude *ex vivo* sur le contrôle de la croissance bactérienne par le système de NPWT. Les premiers tests préliminaires, menés sur deux juments d'enseignement, n'ont montrés aucun problème à la mise en place et à la maintenance du traitement sur une peau intacte de thorax et de membre. Malgré l'absence de plaies dans cet essai, les résultats positifs nous encourageaient à procéder avec l'étude *in vivo* sur des plaies expérimentales. L'étude *ex vivo* a, elle aussi, montré que le système pouvait être mis en place et maintenu sur des membres cadavériques de cheval ayant reçu des plaies expérimentales. Cela nous encourageait aussi à procéder avec l'expérience *in vivo* bien que le protocole *ex vivo* était affranchi des mouvements volontaires de l'animal, des tensions exercées sur les structures cutanées et de l'influence de l'organisme vivant.

Dans notre étude, la majorité des chevaux ont bien toléré le système de NPWT durant 7 jours car il ne restreint pas la mobilité. Une seule jument a eu besoin d'une protection d'épaule supplémentaire. Cela démontre que le design de la pompe PICO est bien adapté aux chevaux.

Des difficultés ont été rencontrées avec le pansement du système PICO, bien que les tests préliminaires sur de la peau intacte épilée, soit sur le membre ou sur le thorax, ainsi que l'expérience *ex vivo*, n'aient pas montré ces problèmes. Il n'a pas été possible de maintenir en place un pansement PICO et une pression négative sur les plaies expérimentales *in vivo*. Cela suggère que l'inflammation et l'œdème causés par les plaies et la tunnellation des plaies thoraciques ont contribué aux problèmes rencontrés. Aucun vide satisfaisant n'a pu être obtenu sur un membre lorsque le pansement PICO été employé seul, probablement parce que la dépression verticale située distalement aux os métacarpiens rudimentaires crée une poche d'air qui contrecarre la force de la pompe. D'après le fabricant, la couche primaire de contact en silicone a pour but de minimiser la douleur lors du retrait et de s'adapter aux irrégularités cutanées

et petits poils éparses sur la peau du patient. Contrairement aux humains, les chevaux possèdent une pilosité très importante et des poils plus épais, particulièrement sur les membres. Aucune difficulté majeure à la mise en place des pansements PICO n'a été rapportée lors d'une expérimentation récente chez l'espèce canine.¹⁶⁰ A notre connaissance, il n'existe pas d'étude comparant les peaux de cheval et de chien. Cependant, la peau de cheval diffère de celle des autres mammifères de par de nombreuses caractéristiques.¹⁸¹ Les chevaux possèdent une peau plus épaisse¹⁸² particulièrement sur les aspect dorsal et latéral des membres par rapport au reste du corps.¹⁸³ La peau équine possède de nombreuses glandes sébacées (glandes apocrines), le contrôle physiologique de la sudation est différent, et les chevaux transpirent plus et selon des patrons différents comparativement aux autres espèces. Par ailleurs, en dehors de sa forte alcalinité, la sueur équine contient une glycoprotéine, la latherine, en grande quantité. Cette protéine semble jouer un rôle comme agent humidifiant afin de faciliter la dissipation de la chaleur à travers le pelage gras des chevaux.¹⁸⁴ De plus, les lipides de surface de la peau équine ont été étudiés et ils sont différents de ceux rencontrés chez l'Homme. Ils rassemblent un haut pourcentage de lactones, de stérides, de cholestérol et de cérides.^{185,186} Bien que non prouvé, nous suspectons que ces caractéristiques aient pu amener les difficultés rencontrées à l'adhésion du pansement PICO durant l'étude. Surprenamment, durant les essais, un pansement PICO appliqué sans succès sur un membre de cheval a, par la suite, été appliqué avec succès sur la peau intacte de l'un des chercheurs. Cela a confirmé notre impression que le design actuel du pansement PICO, bien que parfaitement adapté à la peau humaine, n'est pas du tout optimisé pour la peau équine. Afin d'améliorer l'adhésion de la couche de contact primaire siliconée, différents produits d'appoint et approches ont été testés, sans succès. Le meilleur résultat fonctionnel a été obtenu avec une pâte à stomie appliquée sur les bords du pad du pansement PICO permettant ainsi un meilleur contact avec la peau thoracique et facilitant le travail de la pompe à vide. Des résultats similaires ont été obtenus sur le membre distal avec une combinaison de pâte à stomie, un pansement PICO plus flexible (PICO Multi-Site, Smith & Nephew) et un bandage traditionnel de membre distal sans couche secondaire. Cependant, bien que le système de NPWT ait fonctionné avec ces modifications, les complications associées à cette combinaison, telles que des irritations cutanées modérées à sévères et une cellulite, préviennent l'utilisation de la pâte à stomie pour améliorer l'adhésion, sur la peau de cheval, du pansement PICO dans sa forme actuellement disponible sur le marché.

B - Étude secondaire

Parallèlement, afin d'évaluer la capacité du système de NPWT à contrôler la croissance bactérienne dans des plaies cutanées chez le cheval, une expérimentation *ex vivo* annexe a été entreprise. Pour des raisons éthiques, cette expérimentation a été réalisée sur des membres cadavériques afin d'éviter toute contamination *in vivo* par la souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) utilisée dans cette expérience. Cette bactérie est un bon marqueur pour l'expérience car elle ne fait pas partie de la flore commensale cutanée du cheval^{171,172} et elle est rarement identifiée dans des plaies chez le cheval en dehors du milieu hospitalier.¹⁷³ De plus, notre modèle cadavérique nous a permis d'étudier l'effet du système de NPWT affranchi de la contribution du système immunitaire opérant dans un contexte clinique. En effet, l'absence de vascularisation des membres dans le modèle *ex vivo* les affranchit de tout apport en cellules immunitaire, médiateurs, oxygène et nutriments nécessaires à la réaction inflammatoire et immunitaire. La contribution du système immunitaire n'est pas négligeable, d'autant plus que la NPWT agit sur la perfusion tissulaire et donc sur la réponse immunitaire. Différents mécanismes ont été proposés afin d'expliquer l'effet bénéfique de la NPWT sur la guérison de plaie : l'élimination de l'exsudat de plaie (cytokines et protéinases délétères), la réduction de l'œdème de plaie,⁸⁵ l'altération du flux sanguin, l'apparition précoce d'un lit de tissu de granulation sain,⁹⁶ et le renforcement de la contraction de plaie.^{174,175} Un effet direct de la pression négative sur les facteurs de croissance et de virulence de *Staphylococcus aureus* a aussi déjà été rapporté.⁷⁹ Notre modèle *ex vivo* est plus proche de la réalité par rapport à un modèle *in vitro* mais est, néanmoins, sujet à certaines limitations telles que la dessiccation et la dégradation des tissus qui ont été toutes deux observées après 48h. Cela pourrait expliquer l'absence de croissance bactérienne significative au cours de l'expérience. Perfuser le système vasculaire des membres cadavériques avec une solution physiologique, comme décrit par Van Hecke et al,³² aurait pu protéger les tissus contre ces problèmes. Une durée de vie augmentée des pièces cadavériques aurait, en effet, permis un traitement avec la NPWT plus long, ce qui pourrait être nécessaire afin d'observer un effet sur le microbiome. Cependant, notre modèle n'évalue que les effets "directs" de la NPWT et il est évident que dans un contexte clinique, c'est le cumul des effets "directs" et "indirects" qui définit l'impact de la NPWT sur la charge bactérienne.

Les recherches effectuées sur la NPWT en médecine humaine suggèrent fortement que cette technologie pourrait être avantageuse pour l'espèce équine. Il est donc nécessaire de poursuivre la recherche dans le domaine de la NPWT afin d'améliorer d'une quelconque façon les systèmes déjà existants. Cela se traduit par la recherche d'un meilleur design, un meilleur adhésif ou par la

recherche d'éléments intrinsèques à la peau du cheval qui pourraient expliquer les défauts d'adhésion rencontrés. De nombreuses recherches sont en cours sur le microbiome et ses interactions avec l'hôte en médecine humaine. Il est évident que l'accès à de nouvelles technologies, telles que le séquençage de nouvelle génération, permettra de mieux comprendre ce microbiome et ses éventuelles relations avec le processus de guérison cutanée chez le cheval. Cela devrait permettre le développement de stratégies thérapeutiques et de gestion des plaies de nouvelle génération.

Conclusion

La guérison tissulaire chez le cheval est un phénomène passionnant. La fréquence des traumatismes cutanés chez cette espèce et la grande particularité du mécanisme de régénération tissulaire suscitent de nombreuses recherches. Dans cette recension, après une rapide révision du processus de guérison tissulaire et des particularités inhérentes à l'espèce équine, certaines des thérapies novatrices d'actualité ont été évoquées.

La thérapie par pression négative est, par bien des aspects, un traitement d'appoint qui semble pouvoir offrir des axes de développement intéressants dans le cadre de la recherche sur la guérison tissulaire chez le cheval. Cependant, l'emploi de cette thérapie n'en est encore qu'à ses débuts chez le cheval et il est nécessaire de trouver des systèmes pratiques et fonctionnels pour cette espèce. Nos données suggèrent que dans son design actuel, l'appareil testé par l'étude présentée ici n'est pas adapté pour une utilisation comme pansement de plaie ouverte chez le cheval. Afin de permettre son utilisation future en pratique équine, certaines adaptations doivent être réalisées afin d'améliorer l'étanchéité.

Il est fort à parier que dans la mesure où le modèle équin présente de nombreuses similarités avec certaines pathologies humaines, l'étude conjointe ou non de nouvelles thérapies bénéfiques à ces deux espèces est à prévoir.

Bibliographie

1. USDA. Equine 2015, "Baseline reference of equine health and management in the united states,2015".2016,#718.1216:https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/equine/download/equine15/Eq2015_Rept1.pdf
2. Sole A, Bolwell CF, Dart A, et al. A cross-sectional survey of wounds in horses in Australia. *Aust Eq Vet* 2015;34:68.
3. Theoret CL, Bolwell CF, Riley CB. A cross-sectional survey on wounds in horses in New Zealand. *N Z Vet J* 2016;64:90-94.
4. Hall JE, Guyton AC. Hemostasis and blood coagulation. In: Hall JE, Guyton AC, eds. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*, 12th edSaunders/Elsevier; 2011:451-461.
5. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemostasis* 2011;105:S13-S33.
6. Dovi JV, Szpaderska AM, DiPietro LA. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemostasis* 2004;92:275-280.
7. Dovi JV, He LK, DiPietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukocyte Biol* 2003;73:448-455.
8. Devalaraja RM, Nanney LB, Qian Q, et al. Delayed Wound Healing in CXCR2 Knockout Mice. *J Invest Dermatol* 2000;115:234-244.
9. Delavary BM, van der Veer WM, van Egmond M, et al. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 2011;216:753-762.
10. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med* 2011;13.
11. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. *New Eng J Med* 1999;341:738-746.
12. Martin P, D'Souza D, Martin J, et al. Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol* 2003;13:1122-1128.
13. Ng MFY. The role of mast cells in wound healing. *Int Wound J* 2010;7:55-61.
14. Wulff BC, Wilgus TA. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp Dermatol* 2013;22:507-510.
15. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007;25:9-18.
16. Theoret C. Physiology of Wound Healing. In: Theoret C, Schumacher J, eds. *Equine Wound Management*, 3rd edJohn Wiley & Sons, Inc.; 2017:1-13.
17. DiPietro LA. Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:87-91.
18. Owen KR, Singer ER, Clegg PD, et al. Identification of risk factors for traumatic injury in the general horse population of north-west England, Midlands and north Wales. *Equine Vet J* 2012;44:143-148.
19. Inness CM, Morgan KL. Polo pony injuries: player-owner reported risk, perception, mitigation and risk factors. *Equine Vet J* 2015;47:422-427.
20. Sanchez-Casanova RE, Masri-Daba M, Alonso-Diaz MA, et al. Prevalence of cutaneous pathological conditions and factors associated with the presence of skin wounds in working equids in tropical regions of Veracruz, Mexico. *Trop Anim Health Prod* 2014;46:555-561.
21. Perkins NR, Reid SW, Morris RS. Profiling the New Zealand Thoroughbred racing industry. 2. Conditions interfering with training and racing. *N Z Vet J* 2005;53:69-76.
22. Wilmink JM, Herten Jv, Weeren PRv, et al. Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. *Equine Vet J* 2010;34:270-273.

23. Bertone AL, Sullins KE, Stashak TS, et al. Effect of wound location and the use of topical collagen gel on exuberant granulation tissue formation and wound healing in the horse and pony. *Am J Vet Res* 1985;46:1438-1444.
24. Barber SM. Second intention wound healing in the horse: the effect of bandages and topical corticosteroids. In: 35th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Boston 1989.
25. Fretz PB, Martin GS, Jacobs KA, et al. Treatment of exuberant granulation tissue in the horse: evaluation of four methods. *Vet Surg* 1983;12:137-140.
26. Van Den Boom R, Wilmink JM, O'Kane S, et al. Transforming growth factor-beta levels during second- intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. *Wound Repair Regen* 2002;10:188-194.
27. Wilmink JM, Nederbragt H, Weeren PR, et al. Differences in wound contraction between horses and ponies: the in vitro contraction capacity of fibroblasts. *Equine Vet J* 2010;33:499-505.
28. Wilmink JM, Stolk PWT, Weeren PR, et al. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Vet J* 1999;31:53-60.
29. Wilmink JM, Veenman JN, Boom R, et al. Differences in polymorphonucleocyte function and local inflammatory response between horses and ponies. *Equine Vet J* 2010;35:561-569.
30. Wilmink JM, Weeren PR, Stolk PWT, et al. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* 1999;31:61-67.
31. De martin I, Theoret CL. Spatial and temporal expression of types I and II receptors for transforming growth factor beta in normal equine skin and dermal wounds. *Vet Surg* 2004;33:70-76.
32. Theoret CL, Barber SM, Gordon JR. Temporal localization of immunoreactive transforming growth factor [beta]1 in normal equine skin and in full-thickness dermal wounds. *Vet Surg* 2002;31:274-280.
33. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, et al. Expression of transforming growth factor [beta], [beta], and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg* 2001;30:269-277.
34. Theoret CL, Barber SM, Moyana TN, et al. Preliminary observations on expression of transforming growth factors [beta]1 and [beta]3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet Surg* 2002;31:266-273.
35. Theoret CL, Wilmink JM. Aberrant wound healing in the horse: Naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man. *Wound Repair Regen* 2013;21:365-371.
36. Theoret C, Wilmink JM. Exuberant Granulation Tissue. In: Theoret C, Schumacher J, eds. *Equine Wound Management*, 3rd ed/John Wiley & Sons, Inc.; 2017:369-384.
37. Theoret CL, Olutoye OO, Parnell LKS, et al. Equine exuberant granulation tissue and human keloids: A comparative histopathologic study. *Vet Surg* 2013;31:783-789.
38. Berry Ii DB, Sullins KE. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. *Am J Vet Res* 2003;64:88-92.
39. Celeste CJ, Deschesne K, Riley CB, et al. Skin temperature during cutaneous wound healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder: kinetics and anatomic-site differences. *Vet Surg* 2012;42:147-153.
40. Dart AJ, Perkins NR, Dart CM, et al. Effect of bandaging on second intention healing of wounds of the distal limb in horses. *Aust Vet J* 2009;87:215-218.
41. Ducharme-Desjarlais M, Celeste CJ, Lepault E, et al. Effect of a silicone-containing dressing on exuberant granulation tissue formation and wound repair in horses. *Am J Vet Res* 2005;66:1133-1139.
42. Lepault E, Celeste C, Dore M, et al. Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair and Regeneration* 2005;13:520-529.

43. Miragliotta V, Lefebvre-Lavoie J, Lussier JG, et al. Equine ANXA2 and MMP1 expression analyses in an experimental model of normal and pathological wound repair. *J Dermatol Sci* 2008;51:103-112.
44. Miragliotta V, Pirone A, Donadio E, et al. Osteopontin expression in healing wounds of horses and in human keloids. *Equine Vet J* 2014;48:72-77.
45. Sørensen MA, Petersen LJ, Bundgaard L, et al. Regional disturbances in blood flow and metabolism in equine limb wound healing with formation of exuberant granulation tissue. *Wound Repair Regen* 2014;22:647-653.
46. Howard RD, Stashak TS, Baxter GM. Evaluation of occlusive dressings for management of full-thickness excisional wounds on the distal portion of the limbs of horses. *Am J Vet Res* 1993;54:2150-2154.
47. Chvapil M, Pfister T, Escalada S, et al. Dynamics of the healing of skin wounds in the horse as compared with the rat. *Exp Mol Pathol* 1979;30:349-359.
48. Schwartz AJ, Wilson DA, Keegan KG, et al. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. *Am J Vet Res* 2002;63:1564-1570.
49. Deschene K, Céleste C, Boerboom D, et al. Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1. *J Dermatol Sci* 2012;65:12-18.
50. Lefebvre-Lavoie J, Lussier JG, Theoret CL. Profiling of differentially expressed genes in wound margin biopsies of horses using suppression subtractive hybridization. *Physiol Genomics* 2005;22:157-170.
51. Miragliotta V, Raphael K, Ipiña Z, et al. Equine thrombospondin II and secreted protein acidic and cysteine-rich in a model of normal and pathological wound repair. *Physiol Genomics* 2009;38:149-157.
52. Miragliotta V, Ipiña Z, Lefebvre-Lavoie J, et al. Equine CTNNB1 and PECAM1 nucleotide structure and expression analyses in an experimental model of normal and pathological wound repair. *BMC Physiol* 2008;8.
53. Ipiña Z, Lussier JG, Theoret CL. Nucleotide structure and expression of equine pigment epithelium-derived factor during repair of experimentally induced wounds in horses. *Am J Vet Res* 2009;70:112-117.
54. Dubuc V, Lepault E, Theoret CL. Endothelial cell hypertrophy is associated with microvascular occlusion in horse wounds. *Can J Vet Res* 2006;70:206-210.
55. Celeste CJ, Deschene K, Riley CB, et al. Regional differences in wound oxygenation during normal healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder. *Wound Repair Regen* 2010;19:89-97.
56. Chodon T, Sugihara T, Igawa HH, et al. Keloid-derived fibroblasts are refractory to fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor- β 1 can abrogate this Resistance. *Am J Pathol* 2000;157:1661-1669.
57. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor β 1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2230-2239.
58. Juckett G, Hartman-Adams H. Management of keloids and hypertrophic scars. *Am Fam Physician* 2009;80:253-260.
59. McGrath A. Overcoming the challenge of overgranulation. *Wounds UK* 2011;7:42-49.
60. Gauglitz G, Korting H. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med* 2011;17:113-125.
61. Marneros AG, Krieg T. Keloids - clinical diagnosis, pathogenesis, and treatment options. *Keloide - klinische Diagnose, Pathogenese und Behandlungsoptionen. J Dtsch Dermatol Ges* 2004;2:905-913.
62. Hahn JM, Glaser K, McFarland KL, et al. Keloid-derived keratinocytes exhibit an abnormal gene expression profile consistent with a distinct causal role in keloid pathology. *Wound Repair Regen* 2013;21:530-544.

63. Zhang Q, Oh C, Messadi D, et al. Hypoxia-induced HIF-1 α accumulation is augmented in a co-culture of keloid fibroblasts and human mast cells: Involvement of ERK1/2 and PI-3K/Akt. *Exp Cell Res* 2006;312:145-155.
64. Ogawa R, Okai K, Tokumura F, et al. The relationship between skin stretching/contraction and pathologic scarring: The important role of mechanical forces in keloid generation. *Wound Repair Regen* 2012;20:149-157.
65. Tóth F, Schumacher J, Castro F, et al. Full-thickness skin grafting to cover equine wounds caused by laceration or tumor resection. *Vet Surg* 2010;39:708-714.
66. Darby IA, Bisucci T, Pittet B, et al. Skin flap-induced regression of granulation tissue correlates with reduced growth factor and increased metalloproteinase expression. *The J Pathol* 2002;197:117-127.
67. Wilmlink JM, van Weeren PR. Second-intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue. *Vet Clin N Am-Equine* 2005;21:15-32.
68. Theoret C, Lepage O, Dart A, et al. Innovative Adjunctive Approaches to Wound Management. In: Theoret C, Schumacher J, eds. *Equine Wound Management* John Wiley & Sons, Inc.; 2017:508-529.
69. Spaas JH, Broeckx S, Van de Walle GR, et al. The effects of equine peripheral blood stem cells on cutaneous wound healing: a clinical evaluation in four horses. *Clin Exp Dermatol* 2013;38:280-284.
70. Iacono E, Merlo B, Pirrone A, et al. Effects of mesenchymal stem cells isolated from amniotic fluid and platelet-rich plasma gel on severe decubitus ulcers in a septic neonatal foal. *Res Vet Sci* 2012;93:1439-1440.
71. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* 2014;12.
72. Bussche L, Harman RM, Syracuse BA, et al. Microencapsulated equine mesenchymal stromal cells promote cutaneous wound healing in vitro. *Stem Cell Res Ther* 2015;6.
73. Borena BM, Meyer E, Chiers K, et al. Sphere-forming capacity as an enrichment strategy for epithelial-like stem cells from equine skin. *Cell Physiol Biochem* 2014;34:1291-1303.
74. Broeckx SY, Maes S, Martinello T, et al. Equine epidermis: a source of epithelial-like stem/progenitor cells with in vitro and in vivo regenerative capacities. *Stem Cells Dev* 2014;23:1134-1148.
75. Broeckx SY, Borena BM, Van Hecke L, et al. Comparison of autologous versus allogeneic epithelial-like stem cell treatment in an in vivo equine skin wound model. *Cytotherapy* 2015;17:1434-1446.
76. Desmarais JA, Demers SP, Suzuki J, et al. Trophoblast stem cell marker gene expression in inner cell mass-derived cells from parthenogenetic equine embryos. *Reproduction* 2011;141:321-332.
77. Guest DJ, Smith MRW, Allen WR. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J* 2010;42:636-642.
78. Nagy K, Sung H-K, Zhang P, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. *Stem Cell Rev Rep* 2011;7:693-702.
79. Aguiar C, Therrien J, Lemire P, et al. Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. *Equine Vet J* 2015;48:338-345.
80. Aguiar C, Theoret C, Smith O, et al. Immune potential of allogeneic equine induced pluripotent stem cells. *Equine Vet J* 2015;47:708-714.
81. Gomez JH, Schumacher J, Lauten SD, et al. Effects of 3 biologic dressings on healing of cutaneous wounds on the limbs of horses. *Can J Vet Res* 2004;68:49-55.
82. Textor JA, Murphy KC, Leach JK, et al. Ultrastructure and growth factor content of equine platelet-rich fibrin gels. *Am J Vet Res* 2014;75:392-401.

83. Sharma R, Barakzai SZ, Taylor SE, et al. Epidermal-like architecture obtained from equine keratinocytes in three-dimensional cultures. *J Tissue Eng Regen M* 2013;10:627-636.
84. Cerrato S, Ramió-Lluch L, Brazís P, et al. Development and characterization of an equine skin-equivalent model. *Vet Dermatol* 2014;25:475-e477.
85. Argenta LC, Morykwas MJ. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment. *Ann Plast Surg* 1997;38:563-577.
86. Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, et al. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment. *Ann Plast Surg* 1997;38:553-562.
87. Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, et al. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Ann Plast Surg* 1997;38:553-562.
88. Morykwas MJ, Faler BJ, Pearce DJ, et al. Effects of varying levels of subatmospheric pressure on the rate of granulation tissue formation in experimental wounds in swine. *Ann Plast Surg* 2001;47:547-551.
89. Apelqvist J, Willy C, Fagerdahl AM, et al. Negative Pressure Wound Therapy - overview, challenges and perspectives. *J Wound Care* 2017;26:S1-S154.
90. Kanakaris NK, Thanasis C, Keramaris N, et al. The efficacy of negative pressure wound therapy in the management of lower extremity trauma: Review of clinical evidence. *Injury* 2007;38:S9-S18.
91. Moisidis E, Heath T, Boorer C, et al. A prospective, blinded, randomized, controlled clinical trial of topical negative pressure use in skin grafting. *Plast Reconstr Surg* 2004;114:917-922.
92. Schlatterer D, Hirshorn K. Negative Pressure Wound Therapy with reticulated open cell foam-adjunctive treatment in the management of traumatic wounds of the leg: a review of the literature. *J Orthop Trauma* 2008;22:S152-S160.
93. Glass GE, Nanchahal J. The methodology of negative pressure wound therapy: separating fact from fiction. *J Plast Reconstr Aes* 2012;65:989-1001.
94. Lalezari S, Lee CJ, Borovikova AA, et al. Deconstructing negative pressure wound therapy. *Int Wound J* 2017;14:649-657.
95. Borgquist O, Ingemansson R, Malmsjö M. The influence of low and high pressure levels during Negative-Pressure Wound Therapy on wound contraction and fluid evacuation. *Plast Reconstr Surg* 2011;127:551-559.
96. Demaria M, Stanley BJ, Hauptman JG, et al. Effects of Negative Pressure Wound Therapy on Healing of Open Wounds in Dogs. *Vet Surg* 2011;40:658-669.
97. Greene AK, Puder M, Roy R, et al. Microdeformational Wound Therapy. *Ann Plast Surg* 2006;56:418-422.
98. Hunter JE, Teot L, Horch R, et al. Evidence-based medicine: vacuum-assisted closure in wound care management. *Int Wound J* 2007;4:256-269.
99. Malmsjö M, Ingemansson R, Martin R, et al. Negative-pressure wound therapy using gauze or open-cell polyurethane foam: Similar early effects on pressure transduction and tissue contraction in an experimental porcine wound model. *Wound Repair Regen* 2009;17:200-205.
100. Stechmiller JK, Kilpadi DV, Childress B, et al. Effect of Vacuum-Assisted Closure Therapy on the expression of cytokines and proteases in wound fluid of adults with pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2006;14:371-373.
101. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* 1996;4:321-325.
102. Daigle P, Despatis M-A, Grenier G. How mechanical deformations contribute to the effectiveness of negative-pressure wound therapy. *Wound Repair Regen* 2013;21:498-502.
103. Kamolz LP, Andel H, Haslik W, et al. Use of subatmospheric pressure therapy to prevent burn wound progression in human: first experiences. *Burns* 2004;30:253-258.
104. Morykwas MJ, Simpson J, Punger K, et al. Vacuum-assisted closure: state of basic research and physiologic foundation. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:121S-126S.

105. Orgill DP, Bayer LR. Negative pressure wound therapy: past, present and future. *Int Wound J* 2013;10:15-19.
106. Erba P, Ogawa R, Ackermann M, et al. Angiogenesis in wounds treated by microdeformational wound therapy. *Ann Surg* 2011;253:402-409.
107. Pietramaggiore G, Liu P, Scherer SS, et al. Tensile forces stimulate vascular remodeling and epidermal cell proliferation in living skin. *Ann Surg* 2007;246:896-902.
108. Saxena V, Hwang CW, Huang S, et al. Vacuum-assisted closure: microdeformations of wounds and cell proliferation. *Plast Reconstr Surg* 2004;114:1086-1096; discussion 1097-1088.
109. Jacobs S, Simhae DA, Marsano A, et al. Efficacy and mechanisms of vacuum-assisted closure (VAC) therapy in promoting wound healing: a rodent model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009;62:1331-1338.
110. Nishimura K, Blume P, Ohgi S, et al. Effect of different frequencies of tensile strain on human dermal fibroblast proliferation and survival. *Wound Repair Regen* 2007;15:646-656.
111. Chen SZ, Li J, Li XY, et al. Effects of vacuum-assisted closure on wound microcirculation: an experimental study. *Asian J Surg* 2005;28:211-217.
112. Wackenfors A, Sjogren J, Gustafsson R, et al. Effects of vacuum-assisted closure therapy on inguinal wound edge microvascular blood flow. *Wound Repair Regen* 2004;12:600-606.
113. Sano H, Ichioka S. Involvement of nitric oxide in the wound bed microcirculatory change during negative pressure wound therapy. *Int Wound J* 2015;12:397-401.
114. Scherer SS, Pietramaggiore G, Mathews JC, et al. The mechanism of action of the vacuum-assisted closure device. *Plast Reconstr Surg* 2008;122:786-797.
115. Borgquist O, Gustafsson L, Ingemansson R, et al. Micro- and macromechanical effects on the wound bed of Negative Pressure Wound Therapy using gauze and foam. *Ann Plast Surg* 2010;64:789-793.
116. Borgquist O, Ingemansson R, Malmsjö M. The effect of intermittent and variable negative pressure wound therapy on wound edge microvascular blood flow. *Ostomy Wound Manag* 2010;56:60-67.
117. Borgquist O, Ingemansson R, Malmsjö M. Wound edge microvascular blood flow during Negative-Pressure Wound Therapy: examining the effects of pressures from -10 to -175 mmHg. *Plast Reconstr Surg* 2010;125:502-509.
118. Malmsjö M, Gustafsson L, Lindstedt S, et al. The effects of variable, intermittent, and continuous negative pressure wound therapy, using foam or gauze, on wound contraction, granulation tissue formation, and ingrowth into the wound filler. *Eplasty* 2012;12:e5.
119. Glass GE, Murphy GF, Esmaeili A, et al. Systematic review of molecular mechanism of action of negative-pressure wound therapy. *Br J Surg* 2014;101:1627-1636.
120. Chester DL, Waters R. Adverse alteration of wound flora with topical negative-pressure therapy: a case report. *Brit J Plast Surg* 2002;55:510-511.
121. Weed T, Ratliff C, Drake DB. Quantifying bacterial bioburden during Negative Pressure Wound Therapy. *Ann Plast Surg* 2004;52:276-279.
122. Anesäter E, Roupé M, Robertsson P, et al. The influence on wound contraction and fluid evacuation of a rigid disc inserted to protect exposed organs during negative pressure wound therapy. *Int Wound J* 2011;8:393-399.
123. Braakenburg A, Obdeijn MC, Feitz R, et al. The clinical efficacy and cost effectiveness of the Vacuum-Assisted Closure Technique in the management of acute and chronic wounds: a randomized controlled trial. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:390-397.
124. Khashram M, Huggan P, Ikram R, et al. Effect of TNP on the microbiology of venous leg ulcers: a pilot study. *J Wound Care* 2009;18:164-167.
125. Mouës CM, van den Bemd GJCM, Heule F, et al. Comparing conventional gauze therapy to vacuum-assisted closure wound therapy: A prospective randomised trial. *J Plast Reconstr Aes* 2007;60:672-681.

126. Li T, Wang G, Yin P, et al. Effect of negative pressure on growth, secretion and biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Anton van Leeuw* 2015;108:907-917.
127. Glass GE, Murphy GRF, Nanchahal J. Does negative-pressure wound therapy influence subjacent bacterial growth? A systematic review. *J Plast Reconstr Aes* 2017;70:1028-1037.
128. Birke-Sorensen H, Malmsjo M, Rome P, et al. Evidence-based recommendations for negative pressure wound therapy: Treatment variables (pressure levels, wound filler and contact layer) – Steps towards an international consensus. *J Plast Reconstr Aes* 2011;64:S1-S16.
129. Gupta S, Gabriel A, Lantis J, et al. Clinical recommendations and practical guide for negative pressure wound therapy with instillation. *Int Wound J* 2015;13:159-174.
130. Wolvos T. The evolution of negative pressure wound therapy: negative pressure wound therapy with instillation. *J Wound Care* 2015;24:15-20.
131. Guille AE, Tseng LW, Orsher RJ. Use of vacuum-assisted closure for management of a large skin wound in a cat. *J Am Vet Med A* 2007;230:1669-1673.
132. Nolff MC, Meyer-Lindenberg A. Necrotising fasciitis in a domestic shorthair cat - negative pressure wound therapy assisted debridement and reconstruction. *J Small Anim Pract* 2014;56:281-284.
133. Owen L, Hotston-Moore A, Holt P. Vacuum-assisted wound closure following urine-induced skin and thigh muscle necrosis in a cat. *Vet Comp Orthop Traum* 2009.
134. Mullally C, Carey K, Seshadri R. Case Report: Use of a nanocrystalline silver dressing and vacuum-assisted closure in a severely burned dog. *J Vet Emerg Crit Car* 2010;20:456-463.
135. Nolff MC, Layer A, Meyer-Lindenberg A. Negative pressure wound therapy with instillation for body wall reconstruction using an artificial mesh in a Dachshund. *Aust Vet J* 2015;93:367-372.
136. Adkesson MJ, Travis EK, Weber MA, et al. Vacuum-assisted closure for treatment of a deep shell abscess and osteomyelitis in a tortoise. *J Am Vet Med A* 2007;231:1249-1254.
137. Harrison TM, Stanley BJ, Sikarskie JG, et al. Surgical amputation of a digit and Vacuum-Assisted-Closure (V.A.C.) management in a case of osteomyelitis and wound care in an eastern black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). *J Zoo Wildlife Med* 2011;42:317-321.
138. Lafortune M, Fleming GJ, Wheeler JL, et al. Wound management in a juvenile tiger (*Panthera tigris*) with Vacuum-Assisted Closure (V.A.C. therapy). *J Zoo Wildlife Med* 2007;38:341-344.
139. Nolff MC, Meyer-Lindenberg A. Negative pressure wound therapy augmented full-thickness free skin grafting in the cat: outcome in 10 grafts transferred to six cats. *J Feline Med Surg* 2015;17:1041-1048.
140. Ben-Amotz RON, Lanz OI, Miller JM, et al. The use of Vacuum-Assisted Closure Therapy for the treatment of distal extremity wounds in 15 dogs. *Vet Surg* 2007;36:684-690.
141. Nolff MC, Fehr M, Bolling A, et al. Negative pressure wound therapy, silver coated foam dressing and conventional bandages in open wound treatment in dogs. *Vet Comp Orthop Traum* 2014;28:30-38.
142. Pitt KA, Stanley BJ. Negative Pressure Wound Therapy: experience in 45 dogs. *Vet Surg* 2014;43:380-387.
143. Stanley BJ, Pitt KA, Weder CD, et al. Effects of Negative Pressure Wound Therapy on healing of free full-thickness skin grafts in dogs. *Vet Surg* 2013;42:511-522.
144. Gemeinhardt KD, Molnar JA. Vacuum-assisted closure for management of a traumatic neck wound in a horse. *Equine Vet Educ* 2010;17:27-33.
145. Van Hecke LL, Haspelslagh M, Hermans K, et al. Comparison of antibacterial effects among three foams used with negative pressure wound therapy in an ex vivo equine perfused wound model. *Am J Vet Res* 2016;77:1325-1331.
146. Hudson DA, Adams KG, Van Huyssteen A, et al. Simplified negative pressure wound therapy: clinical evaluation of an ultraportable, no-canister system. *Int Wound J* 2013;12:195-201.

147. Malmisjo M, Huddleston E, Martin R. Biological effects of a disposable, canisterless negative pressure wound therapy system. *Eplasty* 2014;14:e15.
148. Fraccalvieri M, Sarno A, Gasperini S, et al. Can single use Negative Pressure Wound Therapy be an alternative method to manage keloid scarring? A preliminary report of a clinical and ultrasound/colour-power-doppler study. *Int Wound J* 2012;10:340-344.
149. NAHMS. (November 2006) Part I: baseline reference of equine health and management. In: 2005.
150. Theoret CL, Bolwell CF, Riley CB. A cross-sectional survey on wounds in horses in New Zealand. *New Zealand veterinary journal* 2015:1-16.
151. Theoret CL. Physiology of wound healing. In: Theoret CL, Schumacher J, eds. *Equine Wound Management*, 3rd edWiley-Blackwell; 2017:1-13.
152. Wilmink JM, van Weeren PR, Stolk PW, et al. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine veterinary journal* 1999;31:61-67.
153. Theoret CL, Wilmink JM. Aberrant wound healing in the horse: naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2013;21:365-371.
154. Kanakaris NK, Thanasis C, Keramaris N, et al. The efficacy of negative pressure wound therapy in the management of lower extremity trauma: review of clinical evidence. *Injury* 2007;38 Suppl 5:S9-18.
155. Schlatterer D, Hirshorn K. Negative pressure wound therapy with reticulated open cell foam-adjunctive treatment in the management of traumatic wounds of the leg: a review of the literature. *Journal of orthopaedic trauma* 2008;22:S152-160.
156. Moisidis E, Heath T, Boorer C, et al. A prospective, blinded, randomized, controlled clinical trial of topical negative pressure use in skin grafting. *Plastic and reconstructive surgery* 2004;114:917-922.
157. Nolff MC, Fehr M, Reese S, et al. Retrospective comparison of negative-pressure wound therapy and silver-coated foam dressings in open-wound treatment in cats. *J Feline Med Surg* 2016.
158. Nolff MC, Meyer-Lindenberg A. Negative pressure wound therapy augmented full-thickness free skin grafting in the cat: outcome in 10 grafts transferred to six cats. *J Feline Med Surg* 2015;17:1041-1048.
159. Demaria M, Stanley BJ, Hauptman JG, et al. Effects of negative pressure wound therapy on healing of open wounds in dogs. *Veterinary surgery : VS* 2011;40:658-669.
160. Miller AJ, Cashmore RG, Marchevsky AM, et al. Negative pressure wound therapy using a portable single-use device for free skin grafts on the distal extremity in seven dogs. *Aust Vet J* 2016;94:309-316.
161. Nolff MC, Fehr M, Bolling A, et al. Negative pressure wound therapy, silver coated foam dressing and conventional bandages in open wound treatment in dogs. A retrospective comparison of 50 paired cases. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : VCOT* 2015;28:30-38.
162. Pitt KA, Stanley BJ. Negative pressure wound therapy: experience in 45 dogs. *Veterinary surgery : VS* 2014;43:380-387.
163. Stanley BJ, Pitt KA, Weder CD, et al. Effects of negative pressure wound therapy on healing of free full-thickness skin grafts in dogs. *Veterinary surgery : VS* 2013;42:511-522.
164. Ben-Amotz R, Lanz OI, Miller JM, et al. The use of vacuum-assisted closure therapy for the treatment of distal extremity wounds in 15 dogs. *Veterinary surgery : VS* 2007;36:684-690.
165. Gemeinhardt KD, Molnar JA. Vacuum-assisted closure for management of traumatic neck wound in a horse. *Equine Vet Educ* 2005;17:27-33.

166. Hudson DA, Adams KG, Van Huyssteen A, et al. Simplified negative pressure wound therapy: clinical evaluation of an ultraportable, no-canister system. *Int Wound J* 2015;12:195-201.
167. Celeste CJ, Deschesne K, Riley CB, et al. Skin temperature during cutaneous wound healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder: kinetics and anatomic-site differences. *Veterinary surgery : VS* 2013;42:147-153.
168. Deschene K, Celeste C, Boerboom D, et al. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in keratinocytes during the repair of skin wounds in horses. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2011;19:250-259.
169. Miragliotta V, Pirone A, Donadio E, et al. Osteopontin expression in healing wounds of horses and in human keloids. *Equine veterinary journal* 2016;48:72-77.
170. Birke-Sorensen H, Malmjsjo M, Rome P, et al. Evidence-based recommendations for negative pressure wound therapy: treatment variables (pressure levels, wound filler and contact layer)--steps towards an international consensus. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 2011;64 Suppl:S1-16.
171. Freeman K, Woods E, Welsby S, et al. Biofilm evidence and the microbial diversity of horse wounds. *Can J Microbiol* 2009;55:197-202.
172. Westgate SJ, Percival SL, Knottenbelt DC, et al. Microbiology of equine wounds and evidence of bacterial biofilms. *Veterinary microbiology* 2011;150:152-159.
173. Bergstrom K, Bengtsson B, Nyman A, et al. Longitudinal study of horses for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following wound infections. *Veterinary microbiology* 2013;163:388-391.
174. Borgquist O, Gustafsson L, Ingemansson R, et al. Micro- and macromechanical effects on the wound bed of negative pressure wound therapy using gauze and foam. *Ann Plast Surg* 2010;64:789-793.
175. Malmjsjo M, Ingemansson R, Martin R, et al. Negative-pressure wound therapy using gauze or open-cell polyurethane foam: similar early effects on pressure transduction and tissue contraction in an experimental porcine wound model. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2009;17:200-205.
176. Li T, Wang G, Yin P, et al. Effect of negative pressure on growth, secretion and biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015;108:907-917.
177. Fujiwara T, Nishimoto S, Ishise H, et al. Influence of continuous or intermittent negative pressure on bacterial proliferation potency in vitro. *J Plast Surg Hand Surg* 2013;47:180-184.
178. Weed T, Ratliff C, Drake DB. Quantifying bacterial bioburden during negative pressure wound therapy: does the wound VAC enhance bacterial clearance? *Ann Plast Surg* 2004;52:276-279; discussion 279-280.
179. Assadian O, Assadian A, Stadler M, et al. Bacterial growth kinetic without the influence of the immune system using vacuum-assisted closure dressing with and without negative pressure in an in vitro wound model. *Int Wound J* 2010;7:283-289.
180. Moues CM, Vos MC, van den Bemd GJ, et al. Bacterial load in relation to vacuum-assisted closure wound therapy: a prospective randomized trial. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2004;12:11-17.
181. Wakuri H, Mutoh K, Ichikawa H, et al. Microscopic anatomy of the equine skin with special reference to the dermis. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1995;72:177-183.
182. Talukdar AH, Calhoun ML, Stinson AW. Microscopic anatomy of the skin of the horse. *American journal of veterinary research* 1972;33:2365-2390.
183. Knottenbelt DC. *Pascoe's principles & practice of equine dermatology*, 2nd edElsevier/Saunders; 2009.

184. McDonald RE, Fleming RI, Beeley JG, et al. Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva. *PloS one* 2009;4:e5726.
185. Lindholm JS, McCormick JM, Colton SW, et al. Variation of skin surface lipid composition among mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 1981;69:75-78.
186. Downing DT, Colton SW. Skin surface lipids of the horse. *Lipids* 1980;15:323-327.
187. Ahearn C. Intermittent NPWT and lower negative pressures--exploring the disparity between science and current practice: a review. *Ostomy Wound Manag* 2009;55:22-28.
188. Borgquist O, Ingemansson R, Malmsjo M. Individualizing the use of negative pressure wound therapy for optimal wound healing: a focused review of the literature. *Ostomy Wound Manag* 2011;57:44-54.