

IV. Principes de thérapie cellulaire pour la reconstruction papillaire

1- Définition et objectifs

Dans le cadre des *biothérapies*, la **thérapie cellulaire** vise à réparer des cellules ou un organisme par l'apport de cellules modifiées ou au statut particulier : les cellules souches, dont on espère qu'elles pourraient soigner des maladies telles que les maladies d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le diabète, les leucémies...ou faciliter les greffes ou restauration d'organes. Il faut pour cela stimuler les fonctions de codage de la cellule, les orienter vers le but recherché, afin que les cellules ou organes produits soient tolérées dans l'organisme receveur (qui peut aussi être donneur, on parle alors d'auto-greffe).

Contrairement aux méthodes pharmacologiques basées sur l'emploi de molécules chimiques, la **thérapie cellulaire** est fondée sur l'utilisation de cellules vivantes. Cette technique consiste à prélever des cellules soit chez le patient à traiter, soit chez un donneur, à les purifier et éventuellement, à les modifier et les multiplier. Ces cellules sont alors réimplantées chez le malade pour remplacer des cellules déficientes ou disparues.

Cette procédure est de plus en plus utilisée et testée en médecine et chirurgie traditionnelles et récemment des rapports de cas parodontaux ont été documentés (Mc Guire et Scheyer en 2007).

2- Protocole et résultats en chirurgie plastique

Une étude réalisée par William K. Boss et al en 2000 nous permet de comprendre le champ d'application de cette technique.

2.1 Présentation

La culture de fibroblastes autogènes (Isolagen®, Paramus®...) est une thérapie cellulaire primordiale pour la correction des rides et des cicatrices.

Le traitement du derme par des fibroblastes autogènes peut réparer un déficit suite à un vieillissement ou un traumatisme.

L'utilisation de cette technique par un système injectable, réparant ou atténuant les défauts de la peau ou bien les cicatrices, a trouvé un écho favorable chez les chirurgiens plasticiens, ainsi qu'en médecine cosmétique et reconstructrice.

La réparation a été de longue durée et n'a pas montré de signe de dissipation de la correction après 4 ans et demi (Boss, 1998).

Isolagen® a été la première tentative de thérapie cellulaire dans le domaine de la chirurgie plastique et dermatologique. Les effets bénéfiques potentiels sur la peau ont été étudiés depuis 1995.

Un diagnostic précis de la cause du défaut doit être fait car il existe différentes modalités de traitement. Par exemple en présence de la pauvre qualité de l'épiderme le traitement se fera à base d'acide ascorbique ou par micro-abrasion du derme ; en revanche en présence de cicatrice le traitement se fera à base d'Isolagen®.

Les fibroblastes autogènes ont le potentiel pour produire du collagène spécialement quand ils existent en grande quantité dans le derme.

Les résultats histologiques des différents auteurs ont montré une augmentation significative de l'épaisseur du derme 3 ans après le traitement.

Le travail de Kuo a montré que la production de collagène continue après une thérapie au laser (Kuo, 1998).

Le travail de Goldgerg (1999) a aussi montré que la production de collagène peut être stimulée par l'utilisation de laser à 1064 nm.

D'autres études ont aussi montré une réduction des rides et une production de collagène après une production de laser à base de CO2 (David et coll., 1989 et Rosenberg et coll., 1999).

Des études sur les acides glycoliques ont montré que les fibroblastes peuvent être stimulés pour produire plus de collagène dans un environnement *in vitro* et *in vivo*.

2.2 Méthodologie

2.2.1 *Aspects techniques*

La procédure débute par une biopsie rétro-auriculaire de 3 mm. Puis le prélèvement est placé dans un tube d'azote liquide à basse température facilitant le transport au laboratoire et assurant la vitalité des cellules prélevées pour être mises en culture.

6 semaines après la biopsie un flacon contenant 1,2 ml de solution d'Isolagen® est réexpédié au médecin traitant.

L'injection thérapeutique doit être faite dans les 24 heures pour obtenir 95% de viabilité de la culture des fibroblastes. 48 heures après elle diminue à 85% puis au bout de 72 heures elle est de 65%.

Isolagen® est infiltré jusqu'à la jonction dermale sous-cutanée ainsi que dans tous les niveaux des cicatrices.

Les résultats d'études multicentres outre-atlantique montrent une nette amélioration des défauts initiaux avec un taux de satisfaction des patients de 90% en moyenne (Boss, 2000).

2.2.2 Les résultats cliniques

D'après tous les auteurs c'est cette technique qui permet la meilleure amélioration des défauts.

Il fournit une opportunité pour « repeupler » le derme en fibroblastes et permet de créer un meilleur lit pour l'utilisation de laser.

Isolagen® ne permet pas de modifier le mince épithélium qui se cicatrise par seconde intention.

Isolagen® peut être très efficace quand il est utilisé seul et peut fournir des corrections à long terme.

La thérapie au laser permettrait une diminution de la profondeur des rides.

Les auteurs, cependant, ont trouvé qu'une thérapie superficielle au laser précédée par une injection d'Isolagen® a améliorée la diminution de profondeur des défauts de 2 ou 3 grades (Boss, 2000)

2.2.3 Conclusion et interprétations

Sur les 4800 injections pratiquées aux ETATS-UNIS seulement 11 patients ont développés des phénomènes d'inflammations et douleur pendant 10 jours suivants le traitement.

Aucune réaction allergique n'a été noté ni aucune aggravation du défaut.

Les pertes de papilles dentaires s'apparentent beaucoup à ce type de défaut dans la mesure où le fibroblaste est un constituant cellulaire essentiel du parodonte.

Mc Guire et Scheyer (2007) ont publié une étude dans laquelle des injections de fibroblastes autogènes chez 21 patients au niveau d'espaces inter-proximaux ouverts ont été effectués. Le but était de régénérer les papilles inter-proximales affaissées ou absentes.

Cette méthode novatrice serait une avancée importante en parodontologie devant les obstacles rencontrés par les différentes techniques non chirurgicale et chirurgicale.

3- Champ d'application en parodontologie

3.1 Présentation de l'étude

En 2007, Mc Guire et Scheyer ont réalisé une étude sur 21 sujets présentant une récession de la papille inter-dentaire

Les patients qui avaient reçu une couronne ou un pontique au niveau des espaces inter-proximaux concernés ont été exclus de l'étude, ainsi que tous ceux ayant des rainures profondes, atteintes des furcations, une mobilité dentaire > 1 (sur une échelle de 1 à 4), des contacts ouverts, un sondage de la profondeur des poches supérieures à 3mm.

Pour chaque patient, deux récessions primaires inter-proximales ont été identifiées et randomisées. 1 défaut a reçu une transplantation de cellule, et l'autre a reçu un placebo.

Les 2 espaces inter-proximaux devaient être égaux en taille et en morphologie en respectant la profondeur et la largeur.

Si plusieurs sites présentaient des défauts c'est celui qui était le plus similaire au côté opposé qui a été choisi.

Si tous les défauts sont similaires il a été choisi celui qui représentait le plus l'image en miroir des lésions par rapport au défaut primaire.

Chaque patient pouvait avoir plus de 7 défauts de récessions inter-proximales.

Tous les patients retenus devaient être non fumeurs, et avec un âge compris entre 18 et 70 ans. Un bon contrôle du niveau de plaque était nécessaire (< 20 % selon l'index de O'Leary) (O'Leary, 1972).

Dans cette étude ont été retenus 3 hommes (15%) et 17 femmes (85%) compris entre 35 et 68 ans.

Le choix de ces patients a été validé d'après le cahier des charges, et leur consentement a été obtenu.

A noter que sur les 20 patients, 17 étaient de race blanche, 2 étaient de race afro américaine et 1 était de race asiatique.

3.2 Evaluation clinique

Avant tout traitement les sites ont été examinés, les défauts ont été mesurés et des photos ont été prises.

Des radiographies ont été prises au début et 4 mois après la fin du traitement (à t = 0 et t= 4 mois).

Le principal paramètre d'efficacité était le taux de variation de la hauteur papillaire des zones de traitement primaire du départ jusqu'à la visite à 4 mois. Cela a été évalué par l'examineur

en utilisant une sonde parodontale en mesurant la distance de la pointe de la papille interproximale jusqu'à la base de la zone de contact pour chaque lésion séparément.

Le second paramètre d'analyse incluait la variation des paramètres suivants (entre le début et la visite à 4 mois) :

- Distance de la pointe de la papille à la crête alvéolaire
- Distance de la base de la zone de contact à la crête alvéolaire
- Profondeur des poches
- Largeur inter-proximal de la papille
- Indice de plaque
- Taux d'inflammation
- Texture et couleur du tissu
- Perception des changements observés par le patient et le clinicien selon la classification de Nordland (1998)

Il est nécessaire d'inclure aussi l'analyse des éléments indésirables afin d'assurer une totale sécurité aux patients.

3.3 Synthèse

L'étude a été conduite par 2 opérateurs (1 en aveugle et 1 non).

En outre il y avait un examinateur indépendant (en aveugle).

L'opérateur (non aveugle) a administré tous les traitements test/placebo, sachant que toutes les mesures et évaluations ont été réalisées par l'opérateur en aveugle et l'examineur.

La reproductibilité des mesures a été validée par calibration et la méthodologie randomisée.

Les données ont été collectées sur toutes les lésions traitées.

L'indice de plaque d'O'Leary a été utilisé pour évaluer l'ensemble de la cavité buccale.

Les mesures comprenaient :

-La distance de la pointe de la papille jusqu'à la base de la zone de contact (au millimètre près avec une sonde parodontale, par un pied à coulisse digital sur un modèle, et une analyse de photographies du site (mesure no1)).

-La distance depuis la base de la zone de contact jusqu'à la crête alvéolaire (au millimètre près également sous anesthésie locale en sondant au niveau de l'os avec une sonde UNC 15-mm (mesure no2)).

-La distance de la pointe de la papille jusqu'à la crête alvéolaire a été calculé par soustraction entre (mesure no1) et (mesure no2).

-La largeur inter-proximale a été mesurée avec la même sonde (depuis la hauteur mésiale à la hauteur distal du contour du tissu inter-proximal).

-L'examineur, utilisant une sonde parodontale UNC 15, a relevé la mesure en six points de la profondeur autour de chaque dent concerné par l'étude. Le saignement au sondage a également été relevé, ainsi que le taux d'inflammation.

-L'examineur a évalué la texture du tissu en le comparant aux sites de contrôles

-Une évaluation, à l'aide d'une échelle analogique (VAS), a été enfin effectuée pour chaque site par l'examineur et par le patient (mesures allant de 0 à 100 ; 100 représentant la valeur n'indiquant aucun défaut).

-L'examineur a également évalué la perception de changement de lui-même et du patient selon la classification de Nordland (1998).

-La distance de la crête alvéolaire à la base de contact a été enregistrée 5 à 7 jours avant le premier traitement et réenregistré à 4 mois.

3.4 Procédure clinique pour la reconstruction papillaire

3.4.1 *Technique de transplantation cellulaire*

Après une anesthésie locale, le tissu kératinisé de la tubérosité maxillaire a été prélevé. Le tissu est ensuite placé dans un flacon stérile, et un pansement de cyano-acrylique a été appliqué sur le site de la biopsie.

Au laboratoire, les fibroblastes de l'échantillon vont être extraits et *multipliés* en utilisant des techniques-standard de culture de tissu.

3.4.2 *Agent expérimental*

Il s'agit de cellules autogènes en suspension générées par la mise en culture et la multiplication de fibroblastes gingivaux obtenus à partir d'une biopsie effectuée au niveau de la cavité orale.

La plupart des cellules ont été transplantées dans les 12 heures suivant leur réception.

Pour chaque site traité, 2 flacons ont été produits au laboratoire :

- 1 flacon contenant les cellules en suspension
- 1 flacon contenant un milieu de culture cellulaire.

Les 2 flacons ont été libellés test ou placebo, le nom du patient, l'identification de la lésion pour laquelle le flacon a été destiné en fonction de l'affectation de traitement randomisé, ainsi qu'un code barre d'identification.

Le jour du traitement, 15 minutes avant les injections, l'opérateur non aveugle a effectué la préparation des solutions de chaque patient, afin de les séparer et de pouvoir les identifier facilement au cours de l'étude.

3.4.3 Le placebo

Le placebo utilisé dans cette étude était le milieu de culture cellulaire.

3.4.4 La procédure primaire papillaire

Entre cinq et sept jours avant la première injection, une procédure a été effectuée au niveau de la papille afin d'induire une réponse inflammatoire transitoire et permettre l'injection d'un plus grand volume de cellules.

Après une anesthésie locale, chaque site (test et contrôle) a subi cette procédure, appelée : « procédure primaire papillaire » (PPP).

Une incision minimale à la base de la papille sur la face vestibulaire est réalisée pour créer un petit espace.

Il est recommandé aux patients également de ne pas brosser les sites de l'étude jusqu'après la première injection.

3.4.5 Méthode d'injection

Avant les injections, une évaluation est réalisée, des photos sont prises par l'opérateur en aveugle ou l'examineur.

Toutes les mesures de sondage osseux sont réalisées par l'opérateur qui travaille en aveugle.

Après anesthésie locale, les injections de cellules concentrées en suspension (contenant 20×10^6 cellules/ml) ou le placebo ont été effectuées par l'opérateur non aveugle selon le déroulement suivant :

- ➔ Le premier traitement est administré 5 à 7 jours après la procédure primaire papillaire.
- ➔ Le second traitement est administré 7 à 14 jours après le premier ;
- ➔ Le troisième traitement a été administré 7 à 14 jours après le second

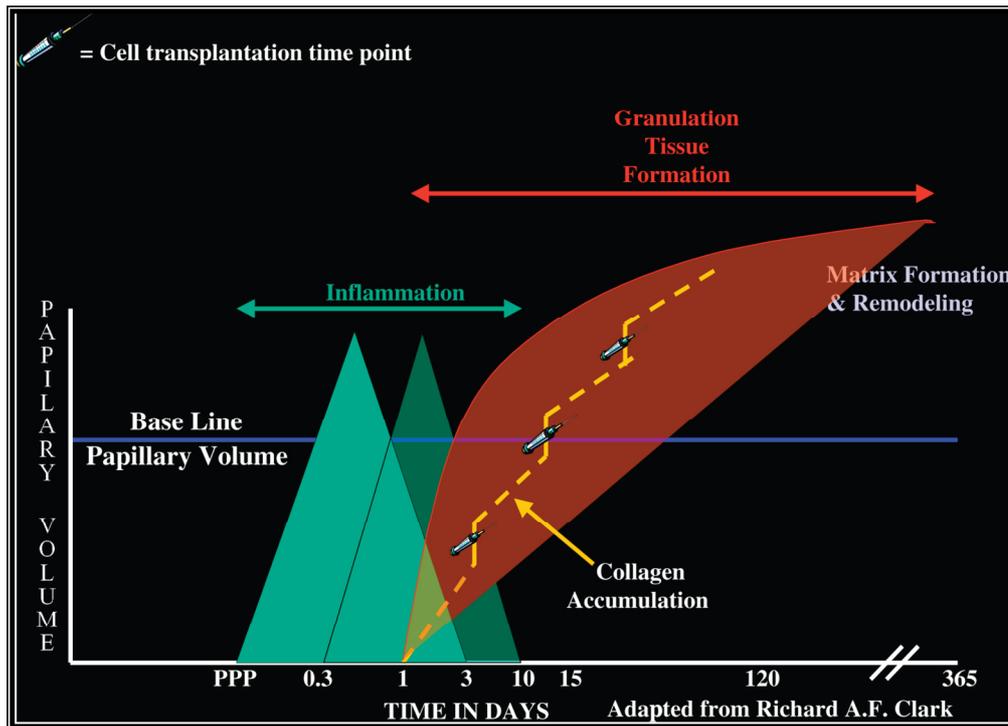


Figure 61 : Les trois phases montrant l'extension du tissu de granulation en fonction de l'accumulation de collagène, en fonction du temps (D'après Mc Guire et Scheyer, 2007)

Chaque patient a reçu les 3 injections d'une concentration de cellules identiques.

La dose recommandée était de 1 ml au total et répartie sur tous les sites. Le traitement contenant le placebo s'est fait dans un volume identique.

La technique d'injection utilisée était la suivante :

- Le premier traitement est administré au niveau de la face vestibulaire de la papille coronairement à la crête alvéolaire.
- La deuxième injection a pénétré dans la même région sur la face linguale.
- Puis, une troisième injection a été réalisée ;

Il était impératif, lors de cette étape d'injection, d'éviter de produire une ischémie de la papille, ce qui entraînerait une nécrose des tissus.

En moyenne, 0,3 à 0,4 ml de solution pour les sites-test ou de contrôle a été déposé dans la papille à chacune des trois séances de traitement.

Les contrôles ont été effectués lors de visites à 2, 3 et 4 mois après la première série d'injections. Des radiographies ont été prises pour chaque site d'étude depuis le départ jusqu'au quatrième mois.

3.4.6 Maintenance

Cinq à sept jours avant le début de l'étude, une élimination de la plaque a été effectuée sur tous les sites. Tous les sujets ont été invités à adopter de bonnes habitudes d'hygiène bucco-dentaire dans tous les sites non concernés par l'étude.

En outre, tous les sujets ont reçu l'instruction d'éviter de mâcher directement sur le test et le site de contrôle et d'éviter tout traumatisme pendant le même laps de temps.

Durant cet intervalle, les sujets avaient pour consigne de rincer deux fois par jour après les repas avec de la chlorhexidine à 0,12%. Après la première injection, les sujets ont pu reprendre un brossage doux et effectuer un nettoyage des espaces inter-dentaires avec du fil dentaire et de cesser les rinçages à la chlorhexidine.

Enfin, tous les sujets ont reçu un traitement prophylactique au deuxième mois.

3.4.7 La taille de l'échantillon

20 sujets ont été traités dans cette étude. Chaque sujet était son propre contrôle en recevant le traitement test et le traitement placebo. La taille de l'échantillon, dont l'objectif est de déterminer la sécurité et l'efficacité du traitement, n'était pas en mesure d'être estimée, avant de débiter l'étude, à l'aide de préévaluations statistiques à cause d'absence d'antériorité de cette procédure.

3.4.8 Analyse des images

L'analyse des images se composait de plusieurs étapes: l'identification d'image, le redimensionnement, l'étalonnage et la mesure.

Pendant le processus d'identification de l'image, tous les sites ont été identifiés et étiquetés. L'analyse a été effectuée par un observateur indépendant. Après un examen attentif des images, des erreurs potentielles dans la mesure des données, comme les différences de rotation dans la représentation du site, ont été reconnus et minimisés par les examinateurs en faisant correspondre les tailles des dents d'un même site en tout point du temps.

3.4.9 Mesures des photos

Après un examen visuel, une image a été reprise avec une vue complète du site. Deux points clairement visibles sur les bords incisifs des dents concernées ont été choisis. Une zone d'intérêt a été identifiée sur l'image avec sa partie inférieure alignée sur les deux points et sa partie supérieure correspondait à la base du point de contact entre les dents. Puis on mesure la distance entre le point le plus coronaire de la papille et le côté le plus apical de cette zone.

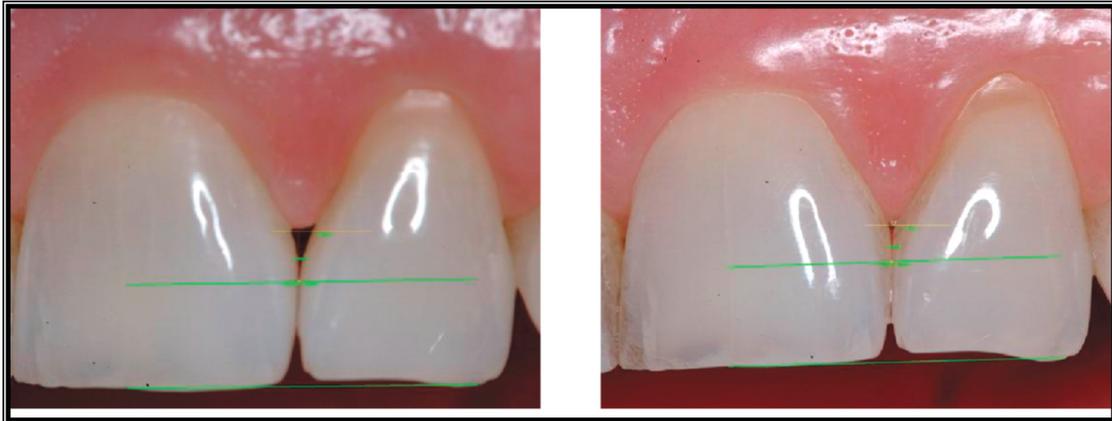


Figure 62 : Photographie normalisée montrant l'aire d'intérêt délimité par des lignes horizontales (à t 0 et 4 mois)
(D'après Mc Guire et Scheyer, 2007)

Ensuite ce même rectangle est placé sur une autre image du même site mais à des temps différents de l'étude. Ainsi on peut suivre l'évolution point par point. Un observateur indépendant analyserait les images obtenues

Dans la deuxième photo à droite (Figure 62) on observe une formation positive de tissu papillaire entre les deux dents (visite faite à 4 mois).

3.4.10 Analyses statistiques

Des tests statistiques classiques ont été utilisées pour mesurer toutes les données (statistiques descriptives, test de Wilcoxon, test de McNemar, analyse de mesures répétées, affichages graphiques...).

Les hypothèses de normalité et d'homogénéité de variance ont été testées avec le test de Shapiro-Wilks. Tous les tests ont été déclarés statistiquement significatifs à $p \leq 0,05$.

3.5 Les résultats cliniques

L'analyse primaire consistait à évaluer les modifications (entre le début de l'étude et 4 mois plus tard) de la distance entre la pointe de la papille et la base de la zone de contact à l'aide d'une sonde parodontale. Les résultats de cette analyse n'ont pas réussi à démontrer un effet thérapeutique.

La variation en pourcentage, de la distance entre la pointe de la papille à la base de la zone de contact depuis le début de l'étude a aussi été examinée en utilisant des mesures de photos numériques. Les analyses à 3 mois et 4 mois ne montrent aucun signe d'efficacité. Cependant, au deuxième mois, les zones testées ont montré une augmentation statistiquement significative ($p = 0,0730$), suggérant que l'essai a été supérieur au placebo.

Une analyse de mesures répétées a été effectuée avec une sonde parodontale sur la distance entre la pointe de la papille et la base de l'aire de contact.

L'analyse a été effectuée grâce à un logiciel (PROC), qui est assez puissant pour détecter des différences statistiques (Figure 63).

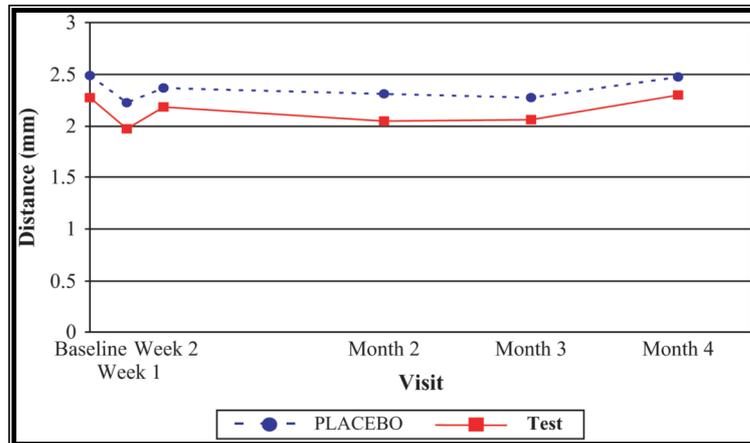


Figure 63 : Graphique indiquant l'écart entre le sommet de la papille et la base de l'aire de contact (à t 0 et 4 mois), pour les deux échantillons. (D'après Mc Guire et Scheyer, 2007)

On remarque que dans temps, il y a eu des modifications dans les distances entre la pointe de la papille et la base de la zone de contact, et la comparaison des sensibilités est significativement différente entre le test et le placebo ($p < 0,0001$).

Une seconde analyse a été effectuée sur la variation en pourcentage de la distance de la pointe de la papille à la base de la zone de contact. (Figure 64).

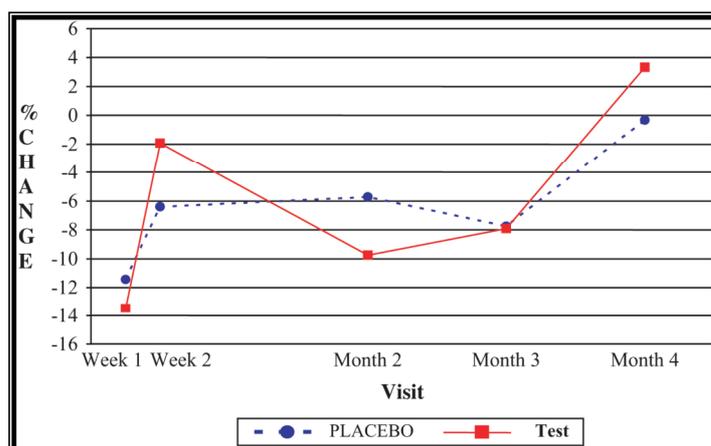


Figure 64 : Graphique indiquant la différence de changement en pourcentage de la distance entre le sommet de la papille et la base de contact pour les deux échantillons. (D'après Mc Guire et Scheyer, 2007).

La comparaison des sensibilités est, également, significativement différente entre le test et le placebo ($p = 0,0275$).

Dans le temps, il y avait une certaine différence dans la variation en pourcentage de la distance entre l'extrémité de la papille à la base de la zone de contact, mais aucun effet du traitement n'a été détecté.

Les critères d'évaluation n'ont pas pu apporter la preuve d'un effet du traitement, que cela soit pour : 1) la distance entre la pointe de la papille et la base de la zone de contact, 2) la distance de la pointe de la papille ou la base de la zone de contact et la crête alvéolaire, 3) la largeur des espaces inter-proximaux, 4) la profondeur au sondage, 5) les évaluations de la couleur et la texture et 6) le niveau d'inflammation (test de McNemar).

L'évaluation selon une graduation comprise entre 0 et 100 (où 100 indique aucun défaut), consiste à une évaluation de l'examineur en aveugle au départ et à chaque visite en fonction de l'aspect des tissus proximaux. Le pourcentage de changement depuis le départ a été calculé pour chaque zone de traitement à chaque visite (tableau 1) :

	Visit	Treatment	N	Mean \pm SD (%)	Median	Signed-Rank Test P value
Percentage change in investigator VAS score	Month 2	Test	20	25.3 \pm 82.4	12.9	0.2774
		Placebo	20	1.7 \pm 50.1	-11.7	0.9563
Diff. in % change in investigator VAS score		Test	20	23.6 \pm 74.5	13.8	0.0192*
		Placebo				
Percentage change in investigator VAS score	Month 3	Test	20	17.1 \pm 85.1	9.2	0.8124
		Placebo	20	-13.3 \pm 34.9	-19.6	0.1140
Diff. in % change in investigator VAS score		Test	20	30.4 \pm 82.5	8.6	0.0153*
		Placebo				
Percentage change in investigator VAS score	Month 4	Test	20	21.0 \pm 78.5	7.5	0.3884
		Placebo	20	-9.3 \pm 41.0	-16.3	0.1054
Diff. in % change in investigator VAS score		Test	20	30.2 \pm 79.3	19.1	0.0064*
		Placebo				

Figure 65 : Tableau de valeur montrant le pourcentage de changement depuis l'origine du traitement (D'après Mc Guire et Scheyer, 2007) Echelle d'évaluation de l'examineur.

A la première lecture des résultats, il convient de noter que les scores ont de hautes variations

Une amélioration dans les zones testées au deuxième mois est observée et statistiquement significative ($p = 0,0192$).

Toutes les mesures après traitement, des zones testées ont montré une amélioration, tandis que les domaines traités par le placebo ont montré une aggravation. La différence entre les traitements était statistiquement significative et différentes de zéro aux mois 3 et 4 d'analyse ($p = 0,0153$ et $p = 0,0064$, respectivement), indiquant que la thérapie d'essai a été supérieure au placebo (Figure 66).

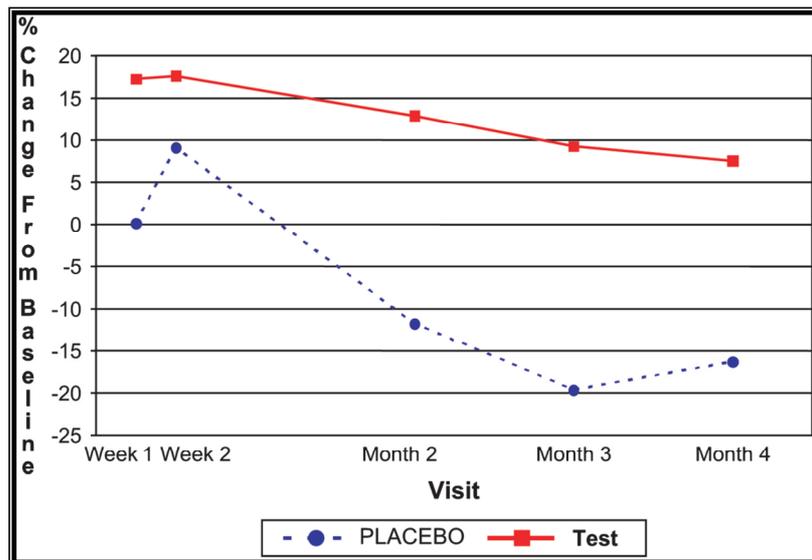


Figure 66:
Graphique montrant le pourcentage de changement basé sur les résultats fournis au tableau 1.
(D'après Mc Guire et Scheyer, 2007)

Dans un deuxième temps, une échelle analogique pour chaque sujet a été réalisée de manière identique à celle de l'examineur.

La variation en pourcentage par rapport à l'évaluation de départ a été calculée pour chaque zone de traitement et à chaque visite (tableau 2)

Table 2.**Subject VAS Evaluation of Primary Treatment Areas: Percentage Change From Baseline and Difference in Percentage Change**

	Visit	Treatment	N	Mean (%) ± SD	Median	Signed-Rank Test P value
Percentage change in subject VAS score	Month 2	Test	20	22.8 ± 84.3	6.1	0.4980
		Placebo	20	5.6 ± 81.8	-15.9	0.8195
Diff. in % change in subject VAS score		Test	20	17.1 ± 106.7	16.0	0.3321
		Placebo				
Percentage change in subject VAS score	Month 3	Test	20	30.4 ± 88.6	7.3	0.2753
		Placebo	20	3.4 ± 78.1	-17.2	0.7086
Diff. in % change in subject VAS score		Test	20	27.0 ± 104.5	20.8	0.0583*
		Placebo				
Percentage change in subject VAS score	Month 4	Test	20	39.7 ± 89.8	16.2	0.1231
		Placebo	20	-0.7 ± 70.6	-33.6	0.7012
Diff. in % change in subject VAS score		Test	20	40.4 ± 87.8	29.7	0.0153†
		Placebo				

Figure 67 : Tableau de valeur de l'échelle analogique du sujet (D'après Mc Guire et Scheyer, 2007) Echelle d'évaluation du sujet

Une amélioration dans les zones testées au troisième mois est observée et statistiquement significative ($p = 0,0583$).

3.6 Informations pour la pratique clinique

Sur la base de principes de sécurité, la thérapie cellulaire a été jugée sûre pour le traitement de l'insuffisance papillaire. Les traitements ont été relativement indolores et aucun événement indésirable n'a été rapporté.

Seuls deux patients ont eu recours à une médication anti-douleur au cours de l'étude.

Il n'y a pas de changements importants dans l'inflammation, la texture et la couleur des tissus ou la profondeur au sondage. Ceci reflète que la thérapie a été bien tolérée et n'a donné aucun effet indésirable.

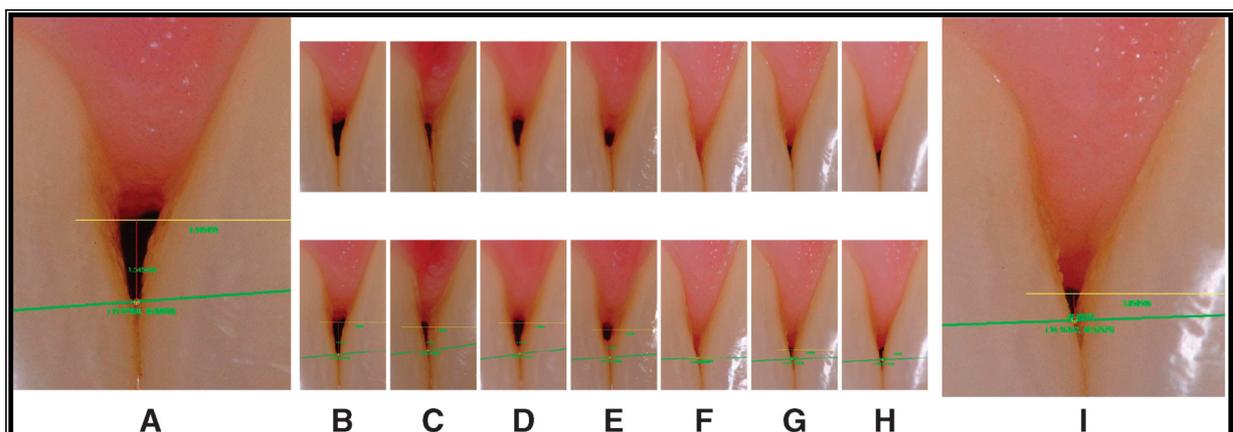


Figure 68 : Analyse digitale des images montrant les résultats des papilles traitées en fonction du temps (D'après Mc Guire et Sheyer, 2007)

A et B: Etat initial

C: 1^{ère} injection

D: 2^{ème} injection

E: 3^{ème} injection

F: Visite à 2 mois

G: Visite à 3 mois

H: Visite à 4 mois

I: Etat final