

## Dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques

Résultats français

F. Muller au nom de ABA\*

Laboratoire de Biochimie, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne.

[Retour](#)

Le dépistage sérique de la trisomie 21 par les marqueurs sériques maternels est réalisé en France depuis 1997. Il est soumis à une réglementation rigoureuse. Il repose sur le calcul d'un risque individuel de trisomie 21 obtenu en pondérant le risque lié à l'âge maternel par un facteur lié aux valeurs des concentrations de chaque marqueur sérique et/ou à la mesure de la clarté nucale. Deux facteurs interviennent donc, l'âge maternel et les marqueurs sériques.

Nous présentons ici les résultats observés à l'échelon national du dépistage de la trisomie par les marqueurs sériques maternels du 2<sup>e</sup> trimestre, mais aussi les questions pratiques qui se sont posées et les aspects physiopathologiques permettant d'en comprendre les bases fondamentales.

### AGE MATERNEL SEUL : LE PLUS MAUVAIS DES MARQUEURS

En France, le seuil de 38 ans pour décider d'une amniocentèse a été retenu dès 1986. Ce critère a le mérite d'être simple à expliquer aux patientes. Son application génère 0 % d'amniocentèse avant 38 ans et 100 % dès 38 ans. En France, en 2000, 49 538 patientes sont concernées. Si le seuil de 35 ans avait été appliqué comme dans les autres pays, c'est 125 607 amniocentèses pour caryotype foetal qui seraient potentiellement générées pour cette seule indication. Avec une valeur prédictive positive (VPP) à 38 ans de 1/200 et de 1/400 à 35 ans, l'âge maternel seul est le plus mauvais des marqueurs de dépistage de la trisomie 21.

Les marqueurs sériques génèrent un taux d'amniocentèse qui suit la courbe de risque de trisomie 21 en fonction de l'âge maternel, générant de 3 % d'amniocentèse chez les femmes les plus jeunes à 50 % chez les patientes de 40 ans.

Les marqueurs sériques permettent d'éviter les amniocentèses inutiles chez les patientes de 35-37 ans et chez les patientes de 38 ans et plus qui le souhaitent, ils ont supprimé les amniocentèses "de convenance" et permettent le diagnostic de trisomie 21 chez les femmes jeunes.

## POURQUOI LES MARQUEURS EN MoM ?

Les marqueurs sériques AFP, hCG,  $\beta$ -hCG libre et estriol suivent une courbe d'évolution physiologique. Les valeurs normales doivent donc être définies pour chaque semaine d'aménorrhée. Une unité différente est utilisée pour chaque marqueur. Ces données brutes sont, d'une part, difficiles à mémoriser et à interpréter, et, d'autre part, impossibles à comparer entre elles et d'une étude à l'autre.

Les transformer en multiple de la médiane (MoM) consiste à attribuer à chaque marqueur la valeur de 1 unité pour la valeur médiane à chaque âge gestationnel. Lorsque la valeur est inférieure à 0,5 MoM, elle est anormalement basse, lorsqu'elle est supérieure à 2,5 MoM, elle est anormalement élevée.

## LES DIFFERENTS MARQUEURS SERIQUES

Les marqueurs utilisés suivent une distribution log-normale. Cette distribution est bien vérifiée dans la population témoin, mais moins bien dans la population avec trisomie 21, il s'agit en général d'extrapolation.

Parmi les marqueurs utilisés, certains ne sont efficaces qu'au 1er trimestre comme la PAPP-A, d'autres qu'au 2e trimestre, comme AFP et hCG totale, seule la  $\beta$ -hCG libre est efficace aussi bien au 1er trimestre qu'au second. Le calcul de risque repose sur la modélisation des distributions des marqueurs dans la population témoin et dans la population avec trisomie 21, et sur l'utilisation du rapport de vraisemblance (likelihood ratio).

## RESULTATS

### 1. - Résultats nationaux des marqueurs du 2e trimestre pour le dépistage de la trisomie 21 (Résultats ABA)

En 1997, 372 236 patientes de moins de 38 ans ont bénéficié de ce dépistage, soit un taux de couverture de 54 %. Ce chiffre atteint 553 138 patientes en 2001, soit 76 %. Les résultats globaux sont portés dans le tableau I. Sur les 2 450 658 patientes dépistées entre 1997 et 2001, le taux moyen de dépistage de la trisomie 21 est de 74 % pour 6,5 % d'amniocenteses générées.

De 1997 à 2001, la VPP des marqueurs sériques est passée de 1/71 à 1/106, diminution qui correspond à une diminution de la prévalence de la trisomie 21 liée à la mise en place progressive du dépistage réalisé en amont par la mesure de la clarté nucale. En effet, lorsqu'elle est considérée comme anormale, un caryotype fœtal est réalisé, et les marqueurs sériques du 2e trimestre ne sont bien évidemment pas réalisés chez ces

patientes. Les cas de trisomie 21 sont ainsi exclus du dépistage sérique, ce qui a pour effet de diminuer la VPP.

En moyenne, l'amniocentèse est refusée par 5 % des patientes appartenant au groupe à risque 1/250, et chaque année, une à deux patientes refusent d'interrompre la grossesse lorsqu'une trisomie 21 est diagnostiquée par le caryotype fœtal induit par les marqueurs sériques.

Age < 38 ans	1997	2001
Nombre de patientes	372 236	553 138
% amniocentèses induites	6,08 %	6,35 %
Taux de dépistage de la T21	72 %	74 %
Valeur prédictive positive	1/71	1/106

Tableau I : Dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques maternels chez les patientes de moins de 38 ans.

## 2. - Echographie du 2e trimestre dans les cas de trisomie 21 à marqueurs sériques normaux

Lorsque la patiente n'est pas dans le groupe à risque accru de trisomie 21, une échographie est réalisée à 22 semaines. Le tableau II montre que chaque année, 40 % des cas de trisomie 21 non dépistés par les marqueurs sériques et/ou la mesure de la clarté nucale sont ainsi dépistés. Au total, la combinaison marqueurs sériques du 2e trimestre et échographie de 22 semaines permet de dépister 84 % des cas de trisomie 21.

-	1998	1999	2000
Nombre de patientes	442 036	517 946	541 067
Total Tri 21	482	490	442
T21 dépistées par MSM	343	359	328
T21 non dépistées par MSM	139	131	114
T21 dépistées par écho 22 SA	56 (40 %)	52 (40 %)	44 (39 %)

Tableau II : Dépistage de la trisomie 21 par l'échographie du 2e trimestre chez les patientes avec marqueurs sériques < 1/250. MSM = marqueurs sériques maternels.

## 3. - Cas particulier des patientes de 38 ans et plus

Les marqueurs sériques peuvent constituer une alternative à l'amniocentèse réalisée sur la seule indication d'âge maternel. En 1997, 5 705 patientes ont ainsi réalisé ce dépistage, ce qui représente 20 % des femmes âgées de 38 ans et plus. En 2001, ce chiffre atteint 28 % (13 309 cas). Les résultats globaux 1997-2000 sont portés dans le tableau III. On observe que 7 cas de trisomie 21 n'étaient pas dans le groupe à risque

combinant âge maternel et marqueurs sériques. Dans 3 cas, la patiente a cependant souhaité avoir une amniocentèse, dans 3 autres cas, la mesure de clarté nucale réalisée à 11-13 semaines était supérieure à 3 mm, ce qui a conduit à l'amniocentèse (les marqueurs ayant vraisemblablement été réalisés à titre indicatif le jour de l'amniocentèse), et dans un cas le fœtus présentait des signes majeurs de trisomie 21 à l'échographie de 22 semaines.

-	1997	2001	1997- 2001
Nombre de patientes	5 705	13 309	50 516
% amniocentèses induites	33 %	36 %	35 %
Taux de dépistage de la T21	100 %	(93 %)	98 %

Tableau III : Dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques maternels chez les patientes de 38 ans et plus.

#### 4. - Cas des grossesses gémellaires

Les marqueurs sériques maternels reflètent une moyenne de la contribution de chacun des deux fœtus et ont donc une valeur potentiellement moins bonne que la mesure de clarté nucale qui reflète le risque de chaque fœtus.

Nous avons réalisé une étude [1] qui porte sur 3 043 grossesses gémellaires dont 11 cas avec trisomie 21 fœtale (15 fœtus atteints). Le taux de patientes dans le groupe à risque est de 7,7 %, valeur statistiquement non différente des 6,7 % observés dans la population témoin. Le taux de détection de la trisomie 21 est de 54,5 % (6 des 11 cas), valeur inférieure aux 73 % observés dans la population des grossesses monofoetales. La chorionicité influe sur la distribution des marqueurs sériques et donc sur le taux d'amniocentèses générées et le taux de dépistage de la trisomie 21. Bien que l'impact sur les résultats globaux soit modeste, il est préférable d'en tenir compte, en particulier lorsque le risque calculé est proche de 1/250.

#### 5. - Cas particuliers des patientes au-delà de 18 SA

La réglementation du dépistage précise qu'il doit être réalisé dans la fenêtre d'âge gestationnel 14 à 17 sa. Lorsque la patiente est vue tardivement, les marqueurs sériques ont-ils encore un intérêt ? Nous avons réalisé une étude portant sur 4 072 témoins prélevés dans la période 18 à 35 sa, et sur 118 cas de trisomie 21 [2]. Nous avons ainsi pu définir les valeurs normales des marqueurs dans cette période et appliquer le calcul de risque de trisomie 21. En utilisant le seuil classique de 1/250, le taux de détection de la trisomie 21 est de 73 % pour un taux d'amniocentèses générées de 7,5 %, valeurs non significativement différentes des valeurs observées dans la population témoin des 50 600 patientes prélevées à 14-17 sa. Ce dépistage peut s'appliquer aux patientes vues tardivement ou lorsqu'un signe échographique mineur est observé à 22-24 semaines.

## 6. - Contrôle de qualité de ce dépistage

Le contrôle de qualité est réalisé à la fois sur la partie analytique des tests, mais aussi sur la partie "calcul de risque" et sur les résultats globaux. Ces contrôles sont pour une part obligatoires, mais aussi organisés de façon volontaire par les professionnels, à l'échelon national et à l'échelon international. Un contrôle mensuel des médianes des marqueurs, du taux d'amniocentèses induites et des issues de grossesses est réalisé au niveau de chaque laboratoire, au niveau des clubs utilisateurs de chaque technique et à l'échelon national par l'équipe Bernard Dingeon et Christophe Doche du Centre Hospitalier de Chambéry [3].

## 7. - Perte fœtale liée à l'amniocentèse

Nous avons vu que les marqueurs sériques conduisent à réaliser 6,5 % d'amniocentèse chez les patientes âgées de moins de 38 ans. Nous savons tous que l'amniocentèse présente un risque de mort fœtale, mais nous avons voulu nous assurer que le risque observé dans ces indications de marqueurs sériques n'était pas différent du risque observé chez les patientes de 38 ans et plus. Il va de soi qu'aucune étude randomisée du type de celle réalisée par Tabor en 1986 [4] n'était envisageable. Nous avons entrepris une étude basée sur la comparaison de deux populations ayant eu les marqueurs sériques, population avec risque  $> 1/250$  (47 004 patientes) et population avec risque  $< 1/250$  (3 472 patientes) [5]. Nous avons comparé à la fois la mort fœtale survenue avant 24 semaines et la grande prématurité (24-28 SA) dans les deux groupes. La différence, attribuable au geste, est de 0,6 % pour la mort fœtale et de 0,26 % pour la grande prématurité. Au total, l'effet délétère lié à l'amniocentèse réalisée dans la population avec marqueurs sériques ayant conduit à un risque accru de trisomie 21 (risque qui combine à la fois l'âge maternel, l'hCG élevée et l'AFP basse) est de 0,8 %, valeur similaire au 1 % observé chez les patientes de 35 ans et plus.

## 8. - Dépistage d'autres anomalies chez les patientes à risque $> 1/250$

Les études portant sur les patientes présentant un risque accru de trisomie 21 (risque  $> 1/250$ ) ont permis de mettre en évidence un intérêt pour le dépistage d'anomalies autres que la trisomie 21.

Une étude concernant 19 laboratoires du groupe ABA et portant sur 470 267 patientes a permis de dépister 562 anomalies du caryotype parmi les 33 335 patientes à risque  $> 1/250$ . En dehors de 415 trisomies 21, 42 trisomies portant sur un autre chromosome (1, 11, 13, 16, 18, 20) et 3 triploïdies ont été décelées. Par ailleurs, 63 anomalies des gonosomes (dont 26 syndromes de Turner) ont été observées. Ces chiffres sont similaires à ceux observés chez les patientes de 38 ans et plus. Les marqueurs sériques anormaux ne sont pas plus fréquemment observés dans les anomalies des gonosomes.

Par ailleurs, une seule étude [6] a concerné le suivi des enfants de patientes à risques  $1/250$ , à caryotype normal (868 grossesses). Witters observe que 45 (5,2 %) enfants

présentent soit des malformations organiques (28 cas), soit une maladie syndromique (Fryns, Pierre-Robin, Wiedmann-Beckwith, etc.) non décelée en prénatal.

Un taux d'hCG <sup>3</sup> 2,5 MoM est prédictif de pré-éclampsie. Cependant, avec une sensibilité de 10 % et une spécificité de 32 %, ce dépistage est trop médiocre pour conduire à une application pratique [7, 8].

#### 9. - Valeurs atypiques des marqueurs sériques et spina bifida

Les biologistes ont choisi d'appliquer un seuil <sup>3</sup> 2,5 MoM au-delà duquel l'AFP sérique maternelle est un marqueur de défaut de fermeture du tube neural (DFTN). Entre 1998 et 2000, pour 1 501 049 patientes ayant eu le dosage d'AFP sérique, 6 329 (0,42 %) avaient une AFP <sup>3</sup> 2,5 MoM. Parmi ces cas, 241 DFTN ont été mis en évidence. L'excellente VPP de ce marqueur (1/26) en fait un bon élément d'orientation pour une échographie morphologique spécialisée.

#### 10. - Valeurs atypiques des marqueurs sériques et trisomie 18

Les marqueurs sériques maternels présentent un profil particulier dans la trisomie 18. Une étude ABA [9] permet de proposer un protocole pour le dépistage de cette anomalie. Chez les 1 à 2 % de patientes avec AFP et/ou hCG < 0,5 MoM, un dosage de PAPP-A est réalisé sur le même tube. Une PAPP-A < 0,5 MoM permet de dépister 82 % des trisomies 18 en induisant 0,1 % d'amniocentèses.

#### 11. - Les problèmes liés aux marqueurs sériques

Actuellement, les dépistages séquentiels de la trisomie 21 se succèdent (nuque à 11-13 sa ; marqueurs sériques à 14-17 sa et échographie morphologique de 22 sa) et les taux d'amniocentèses induites par chaque dépistage (5 %) s'additionnent, pouvant ainsi conduire à 15 % d'amniocentèses, ce qui est excessif. Pour pallier cette dérive, la solution est de combiner les différents risques afin d'établir un risque individuel global : risque lié à l'âge maternel + risque lié à la mesure de clarté nucale + risque lié aux marqueurs sériques (du 2e, voire du 1er trimestre) = risque combiné.

Un autre inconvénient des marqueurs sériques tels qu'ils sont appliqués actuellement au cours du 2e trimestre est leur caractère relativement tardif (14e semaine d'aménorrhée au plus tôt). Un dépistage plus précoce est souhaité.

#### 12. - Un dépistage plus précoce : les marqueurs sériques du 1er trimestre

Des études préliminaires sur le dépistage de la trisomie 21 au 1er trimestre de la grossesse [10-12] ont montré que les marqueurs utilisables à cette période de la gestation sont la PAPP-A et la fraction libre de la  $\beta$ -hCG. Des problèmes liés à la fabrication d'anticorps spécifiques pour le dosage de la PAPP-A n'ont été résolus qu'en 1998. Ces 2 marqueurs sont efficaces à 9-10 sa pour la PAPP-A et à partir de la 11e

semaine pour la  $\beta$ -hCG libre. Le meilleur compromis semble un dosage à 11-12 SA associé à la mesure de clarté nucale. Deux études sont en cours en France, une étude prospective non interventionnelle (9 centres), réalisée entre 11 et 13 sa, intégrant la combinaison PAPP-A +  $\beta$ -hCG + mesure de clarté nucale. Elle démontre l'efficacité et la faisabilité de ce calcul de risque combiné. Une étude prospective interventionnelle est actuellement en cours dans le département des Yvelines. Elle précise en temps réel les problèmes observés et les solutions pour y remédier avant que ce dépistage ne soit étendu à toute la France.

### 13. - Dépistage au 1er trimestre : quelques bémols

Le contrôle de qualité est organisé pour les marqueurs sériques maternels du 1er et du 2e trimestre (B. Digeon, Chambéry).

Y a-t-il un contrôle de qualité opérationnel pour la mesure de clarté nucale ? Les biologistes sont prêts à effectuer la combinaison "marqueurs + mesure de nuque" mais les logiciels de calcul n'ont pas encore été enregistrés et donc contrôlés par l'AFSSAPS.

Est-il prudent de remplacer une méthode qui a fait ses preuves (2e trimestre) par une autre en évaluation (aucune grande série n'est publiée à ce jour) ? Les marqueurs du 1er trimestre ne comprennent plus l'AFP, il n'y a plus de dépistage de DFTN dans cette nouvelle stratégie de dépistage, et nous en avons vu le bénéfice réel.

Un dépistage précoce doit être lié à la réalisation précoce du caryotype fœtal des patientes à risque. Toutes les équipes d'obstétrique sont-elles à même de réaliser un prélèvement de villosités choriales avec la même sécurité que l'amniocentèse ? Les laboratoires de cytogénétique émettent des réserves en raison des difficultés liées au caryotype sur ce prélèvement.

### 14. - Aspects physiopathologiques des marqueurs sériques maternels

Nous avons voulu vérifier que l'origine parentale du chromosome 21 surnuméraire n'influe pas sur l'efficacité du dépistage. Dans une étude portant sur 102 cas de trisomies dépistées par les marqueurs sériques [13], nous avons confirmé que l'origine du chromosome 21 surnuméraire était maternelle dans 89 % des cas. La médiane d'hCG est identique à celle observée en cas d'origine paternelle.

Y a-t-il deux populations de trisomie 21, l'une avec hCG élevée, l'autre avec hCG basse ? Une étude ABA portant sur 1 187 cas de trisomie 21 montre que la répartition des valeurs d'hCG est parfaitement gaussienne et continue, sans double population.

Pourquoi l'hCG est-elle augmentée ? En collaboration avec l'équipe Inserm U427 (D. Evain-Brion) [14, 15], nous avons étudié trois hypothèses :

- une origine extraplacentaire d'hCG supplémentaire,
- une modulation de l'expression des 4 gènes non codants pour l'hCG,

- une modulation de l'expression des 3 gènes codants pour l'hCG.

La réponse est "non" pour ces 3 hypothèses. Nous avons également démontré qu'il n'y a pas d'augmentation des ARNm pour la synthèse d'hCG, le mécanisme n'est donc pas une augmentation de la synthèse. Une nouvelle hypothèse est à l'étude : y a-t-il une diminution du catabolisme de l'hCG ?

## CONCLUSION

En France, le dépistage de la trisomie 21 au 2<sup>e</sup> trimestre par les marqueurs sériques maternels est bien organisé et contrôlé. La connaissance des résultats à l'échelon national permet de construire l'avenir et de prévoir des évolutions comme le dépistage au 1<sup>er</sup> trimestre et le calcul de risque combiné avec la mesure de clarté nucale. Ces évolutions permettront d'améliorer la sensibilité, la spécificité et la précocité du dépistage pour le bénéfice des patientes.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Muller F., Dreux S., Dupoizat H., Uzan S., Dubin M.F., Oury J.F., Dineon B., Dommergues M. Second-trimester Down syndrome maternal serum screening in twin pregnancies (in press).
2. Muller F., Dreux S., Oury J.F., Luton D., Uzan S., Uzan M., Levardon M., Dommergues M. Down syndrome maternal serum markers screening after 18 weeks' gestation. *Prenatal Diagnosis*, 2002 ; 22 : 1 001-1 004.
3. Dineon B., Bartoli M., Doche L., Doche C. Marqueurs biochimiques d'anomalies fœtales et contrôle de qualité : organisation en France. *Ligand Assay*, 2000 ; 5 : 31-37.
4. Tabor A., Philip J., Madsen M. et al. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4 606 low-risk women. *Lancet*, 1986 : 1 287-1 293.
5. Muller F., Thibaud D., Poloce F., Gelineau M.C., Bernard M., Brochet C., Millet C., Real J.Y., Dommergues M. Risk of amniocentesis in women screened positive for Down syndrome with second-trimester maternal serum markers. *Prenatal Diagnosis*, 2002 ; 22 : 1 036-1 039.
6. Witters I., Legius E., Devriendt K., Moerman P., Van Schoubroeck D., Van Assche A., Fryns J.P. Pregnancy outcome and long term prognosis in 868 children born after second trimester amniocentesis for maternal serum positive triple test screening and normal prenatal karyotype. *J. Med. Genet.*, 2001; 38 : 336-338.

7. Muller F., Savey L., Le Fiblec B., Bussieres L., Ndayizamba G., Colau J.C., Giraudet P. Maternal serum human chorionic gonadotropin level at fifteen weeks is a predictor for preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1996 ; 175 : 37-40.
8. Merviel P., Muller F., Guibourdenche J., Berkane N., Gaudet R., Breart G., Uzan S. Correlation between serum assays of hCG and hPL and pre-eclampsia or intrauterine growth retardation among nulliparas younger than 38 years. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2001 ; 95 : 59-67.
9. Muller F., Sault C., Lemay C., Roussel-Mizon N., Forestier F., Frenco J.L. Second-trimester two-step trisomy 18 screening using maternal serum markers. *Prenatal Diagnosis*, 2002 ; 22 : 605-608.
10. Wald N.J., Cuckle H., Densem J., Nanchahal K., Royston P., Chard T., Haddow J., Khigh G., Palomaki G., Canick J. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *Br. Med. J.*, 1988 ; 297 : 883-7.
11. Muller F., Cuckle H., Teisner B., Grudzinskas J.G. Serum PAPP-A levels are depressed in women with fetal Down syndrome in early pregnancy. *Prenat. Diagn.*, 1993 ; 13 : 633-6.
12. Cuckle H.S., Van Lith J.M.M. Appropriate biochemical parameters in first-trimester screening for Down syndrome. *Prenat. Diagn.*, 1999 ; 19 : 505-512.
13. Muller F., Rebiffe M., Taillandier A., Oury J.F., Mornet E. Parental origin of the extrachromosome in prenatally fetal trisomy 21. *Human Genet.*, 2000 ; 106 : 340-344.
14. Frenco J.L., Vidaud M., Guibourdenche J., Luton D., Muller F., Bellet D., Giovagranti Y., Tarrade A., Porquet D., Blot P., Evain-Brion D. Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000 ; 85 : 3 700-3 707.
15. Frenco J.L., Therond P., Bird T., Massin N., Muller F., Guibourdenche J., Luton D., Vidaud M., Anderson W.B., Evain-Brion D. Overexpression of Copper Zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology*, 2001 ; 142 : 3 638-3 648.

\* Association des Biologistes Agréés pour le dépistage sérique maternel de la trisomie 21

Albi (C. Gassier, M.B. Bleuven) ; Amiens (C. Lemay, N. Roussel-Mizon) ; Amiens (J.M. Boudrel, J.F. Prevost) ; Angers (H. Puissant, A. Larget-Pied) ; Arras (A. Gruson, M. Baillet) ; Aubergenville (M.F. Pétavy, M. Minz) ; Avignon (V. Gras, T. Roudon) ; Béziers (J.Y. Réal, P. Dumas) ; Bordeaux (J. Souby, G. Perraza) ; Bordeaux (A. Ruffié, M. Ruffié) ; Brest (M.P. Moineau, J.F. Morin) ; Caen (M. Herrou) ; Calais (P.

Andlauer, E. Gaeremynck) ; Chalon-sur-Saône (B. Duchene) ; Chambéry (B. Dingeon, C. Doche) ; Clermont-Ferrand (P. Chatron, P. Lochu) ; Dax (I. Peraud, H. Chahine) ; Dijon (J. Desgres, M.F. Frigère) ; Dreux (J.C. Cartron) ; Epinal (G. Lefaure, J.P. Gonand) ; Grenoble (J.C. Reversez, A.S. Gauchez) ; La Rochelle (Lallaoui V. Bellec) ; Le Havre (E. Berreville) Le Havre (D. Thibaud) ; Le Mans (P. Sigogneau, F. Duprey) ; Lille (J.M. Perini, G. Renom) ; Lille (G. Couplet, F. Dancoine, A. Mainardi-Leduc) ; Lille (P. Jaumain, P. Duchateau) ; Limoges (Chianea, Vandroux) ; Longjumeau (F. Gras) ; Lons-le-Saulnier (B. Veyrat, A. Piedimonte) ; Lorient (F. Cornu) ; Lyon Croix-Rousse (C. Boisson) ; Lyon Hôtel-Dieu (F. Poloce, M.C. Gelineau) ; Lyon Mérieux (C. Sault, A. Galland) ; Marseille (C. Giorgetti, D. Caparros) ; Marseille (F. Roux) ; Marseille (M.P. Brechard, P. Yerokine) ; Metz (M.E. Larcher, M. Wasel) ; Mulhouse (O. Michotey) ; Nancy (C. Baillet) ; Nantes (S. Mirallié) ; Nantes (A. Baret) ; Nice (P. Soubiran) ; Nîmes (M. Cabrol) ; Orléans (B. Luthier) ; Paris A. Paré (F. Muller, S. Dreux) ; Paris Pitié (M. Bernard, C. Brochet) ; Paris R. Debré (J. Guibourdenche) ; Paris Antoine Béclère (C. Benatar) ; Paris Hôpital Américain (T. Connois), Paris Argenteuil (D. Khalfon) ; Paris Cerba (I. Lacroix) ; Paris Cochin (Y. Fulla) ; Paris d'Eylau (A. Lemeur) ; Paris IPP (F. Forestier) ; Paris LCL (M. Roger) ; Paris Poissy (L. Malagrida) ; Poitiers (C. Millet) ; Reims (E. Nowak) ; Saint-Etienne (H. Dupoizat, P. Guiardiola) ; Saint-Etienne (N. Rabi, A. Chamson) ; Strasbourg (G. Coumaros) ; Toulouse (A. Blanchet, F. Fortenfant) ; Toulouse (E. Carles) ; Tours (D. Dudragne, B. Cara) ; Vitry-le-François (K. Tang) ; Guadeloupe (Y. Espiand-Girard) ; Martinique (Sainte-Rose) ; Martinique (Ghisalberti) ; La Réunion (Caillens).