

# Nouveaux matériaux pour la vectorisation des médicaments

Ruxandra Gref et Patrick Couvreur

## Résumé

L'introduction des nanotechnologies en pharmacologie (« nanomédicaments ») a révolutionné la formulation pharmaceutique en permettant l'émergence de nouveaux traitements avec une spécificité accrue. Ces nanosystèmes sont maintenant exploités dans des buts thérapeutiques afin de transporter le médicament dans l'organisme, de manière contrôlée du site d'administration au site d'action pharmacologique. Les avantages thérapeutiques apportés par cette approche ont permis la mise sur le marché des premiers nanomédicaments mais ils restent encore peu nombreux car d'importants verrous technologiques demeurent (faible pouvoir de charge des systèmes nanoparticulaires, libération rapide du médicament encapsulé, difficulté d'obtenir des matériaux synthétiques peu toxiques, biodégradables et non immunogènes). Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles idées et de nouveaux concepts susceptibles de permettre l'émergence de technologies de rupture dans le domaine du « drug delivery ». Cela passe aussi par l'introduction de nouveaux matériaux biocompatibles et plus efficaces. Cet article décrit le développement de deux concepts susceptibles de répondre à ce challenge. Le premier, appelé « squalénisation », consiste à coupler au squalène (un lipide naturel et biocompatible) des petites molécules à activité anticancéreuse ou antivirale. Le second est basé sur l'auto-association spontanée de deux polymères neutres permettant l'obtention de nano-objets dont la stabilité résulte de la formation de complexes d'inclusion avec un effet coopératif.

## Mots-clés

**Nanomédecine, nano-assemblages, nanoparticules, squalène, polymères auto-associatifs, activité anticancéreuse, activité antivirale, polycyclodextrines, dextran hydrophobe.**

## Abstract

### New materials for drug delivery and targeting

Although the introduction of nanotechnology in pharmacology ("nanomedicine") has revolutionized the delivery of drugs, allowing the emergence of new treatments with improved specificity, it is certain that currently available nanomedicines have not been able to improve the activity of a large number of drugs used to fight cancer, infections or metabolic disorders. These failures are due to the poor drug loading, the rapid release of the encapsulated drug after administration and the difficulty of designing synthetic materials which combine low toxicity, lack of immunogenicity, biodegradability and do not accumulate in cells or tissues. There is therefore an urgent need for new ideas to revolutionize drug delivery. A key issue is the introduction of better and safer (bio)materials for drug targeting purposes. This article describes the development of two original nanotechnologies. The first is the so called « squalenoylation » concept which is based on the bioconjugation of various anticancer or antiviral compounds to the squalene, a natural and biocompatible lipid. The second is based on two neutral polymers which may completely associate together in water to spontaneously form supramolecular nanoassemblies of spherical shape.

## Keywords

**Nanomedicine, nanoassemblies, nanoparticles, squalene, self-assembled polymers, anticancer activity, antiviral activity, polycyclodextrins, hydrophobic dextran.**

L' introduction des nanotechnologies en pharmacologie (« nanomédicaments ») a révolutionné la formulation pharmaceutique en permettant l'émergence de nouveaux traitements avec une spécificité accrue. Les nanotechnologies peuvent en effet être adaptées aux fonctions souhaitées grâce aux progrès réalisés dans la synthèse des colloïdes et la maîtrise de leurs caractéristiques physico-chimiques. Ces nanosystèmes sont maintenant exploités dans des buts thérapeutiques afin de transporter le médicament dans l'organisme, de manière contrôlée, du site d'administration au site d'action pharmacologique [1]. À ce jour, il n'y a cependant pas de plate-forme universelle pour la vectorisation des

médicaments. Au contraire, d'importants verrous technologiques demeurent, parmi lesquels il convient de citer :

- le faible pouvoir de charge (ou d'encapsulation) des systèmes nanoparticulaires qui ne dépasse généralement pas 5 % (exprimé en % du poids de principe actif par rapport au poids du matériau vecteur) ;
- la libération rapide du médicament encapsulé (« burst release »), résultant de la fraction de médicament simplement adsorbée à la surface du nanovecteur ;
- la difficulté d'obtenir des matériaux synthétiques peu toxiques, biodégradables, n'induisant pas de thésauris-moses<sup>(1)</sup> cellulaire ou tissulaire et non immunogènes<sup>(2)</sup>.

Il est donc nécessaire de proposer de nouvelles idées et de nouveaux concepts susceptibles de permettre l'émergence de technologies de rupture dans le domaine du « drug delivery ». Cela passe aussi par l'introduction de nouveaux (bio)matériaux biocompatibles et plus efficaces, comme le couplage de médicaments au squalène<sup>(3)</sup>, ou encore l'obtention de nanovecteurs par association de polymères hydro-solubles en milieu aqueux (galénique « verte »).

### Le concept de « squalénisation » : couplage au squalène d'analogues nucléosidiques à activité anticancéreuse ou antivirale

Les analogues nucléosidiques ont un potentiel thérapeutique considérable tant dans le domaine du cancer (gemcitabine, Ara-C) que pour le traitement d'infections virales comme l'infection par le VIH (AZT, ddl, ddC, d4T, etc.). Cependant, ces molécules présentent un certain nombre d'inconvénients qui limitent parfois de manière importante leur efficacité thérapeutique. Ainsi, la plupart de ces dérivés sont relativement hydrophiles, ce qui réduit leur pénétration intracellulaire. Dans certains cas, ces analogues nucléosidiques diffusent mal à travers les barrières biologiques (épithéliums et endothéliums), ce qui limite leur biodisponibilité par voie orale (cas de la gemcitabine ou du ddl) et/ou les empêche de traiter efficacement les infections localisées dans des sanctuaires (comme le cerveau en raison d'un passage insuffisant à travers la barrière hémato-encéphalique). D'autre part, pour être actives, ces molécules doivent être phosphorylées par les kinases intracellulaires. Malheureusement, ce processus est souvent incomplet et il favorise l'émergence de résistances. Les dérivés triphosphorylés sont d'autre part trop hydrophiles pour pénétrer à l'intérieur de la cellule. Enfin, certains analogues nucléosidiques ont un temps de demi-vie plasmatique relativement court, en raison d'une métabolisation rapide.

Ces problèmes ont pu être surmontés par le couplage chimique de ces analogues nucléosidiques au squalène, un précurseur naturel de la biosynthèse du cholestérol présent en grande quantité dans le monde végétal et animal [2]. De manière étonnante, ce couplage a permis de conférer aux dérivés correspondants la propriété tout à fait exceptionnelle de former spontanément, en milieu aqueux, des nanoparticules d'une taille comprise entre 100 et 150 nm [2]. Ces nanosystèmes peuvent être administrés par voie intraveineuse ; ils favorisent la pénétration intracellulaire des nucléosides, facilitent leur passage transmembranaire et enfin les protègent de la dégradation/métabolisation. Lorsque les nanoparticules sont nanoprecipitées en milieu aqueux avec du polyéthylène glycol couplé au squalène, leur taille diminue pour atteindre des diamètres inférieurs à 100 nm, généralement compris entre 50 et 80 nm. Dans ce cas, les nano-objets sont « PEGylés », c'est-à-dire stabilisés par une couche de polyéthylène glycol [2].

Dans le but de mieux comprendre le surprenant mécanisme de l'auto-assemblage supramoléculaire de ces médicaments nucléosidiques couplés au squalène, les nanoparticules résultant du couplage du squalène avec la gemcitabine (le 4-(N)-trisnorsqualenoylgemcitabine, SQgem) ont d'abord été observées en cryomicroscopie (cryo-TEM) [3] (figure 1). Ces nanoparticules, qui présentent une taille (en nombre) variant de 27 à 125 nm, se caractérisent par une structure supramoléculaire organisée. Leur noyau est

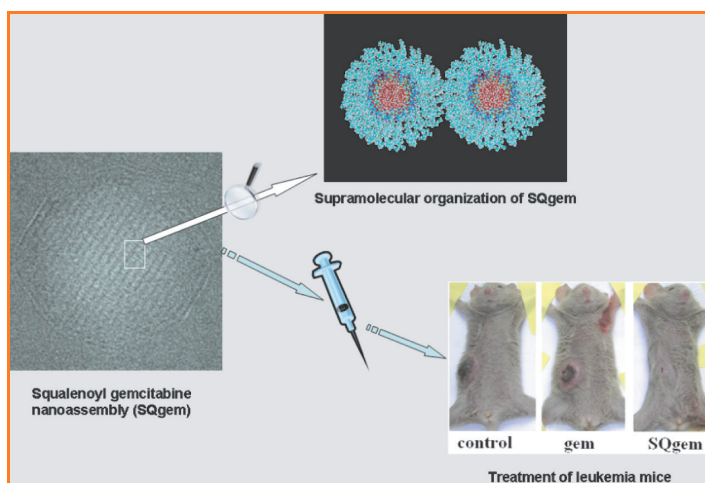


Figure 1 - Illustration du concept de « squalénisation » : cryomicroscopie (cryo-TEM) montrant l'aspect morphologique des nanoparticules de gemcitabine-squalène (SQgem) (gauche), l'organisation supramoléculaire des molécules de SQgem en modélisation moléculaire (droite, haut) et le traitement efficace d'une tumeur expérimentale transplantée par voie sous cutanée (« control » : souris non traitées ; « gem » : souris traitées par la gemcitabine sous forme libre ; « SQgem » : souris traitées par les nanoparticules de gemcitabine-squalène) (d'après [3]).

composé de plans réticulés (ou colonnes) parallèles, chaque particule étant entourée d'une coque externe d'une épaisseur d'environ 3,3 nm. Une étude en diffraction RX a clairement montré que les molécules de SQgem s'auto-associaient pour former des phases hexagonales inverses, représentées par des colonnes à cœur hydrophile, la partie gemcitabine (hydrophile) étant orientée vers le centre de la colonne et la partie squalène (hydrophobe) vers l'extérieur [3]. La distance entre deux colonnes a été évaluée à 87 Å.

Ces structures formées par le squalène sont totalement nouvelles ; elles n'avaient jamais été observées antérieurement et expliquent pourquoi les molécules dérivées de ce lipide possèdent la propriété remarquable et unique de s'auto-assembler sous forme de nanoparticules en milieu aqueux. Une étude structurale similaire a été entreprise avec des nanoparticules formées par l'auto-association de bioconjugués résultant du couplage du ddC avec le squalène [4]. Dans ce cas, des nanoparticules d'une centaine de nanomètres sont à nouveau obtenues, mais les études de diffraction aux rayons X et de microscopie électronique à transmission après cryofracture ont montré la formation de phases cubiques très différentes des phases hexagonales inverses obtenues avec la gemcitabine-squalène, alors que le ddC ne diffère de la gemcitabine que par l'absence des deux atomes de fluor et d'un groupement hydroxyle au niveau du sucre.

Des études complémentaires devraient permettre de comprendre les relations existant entre la structure chimique du bioconjugué et l'organisation supramoléculaire qu'elle confère aux nanoparticules correspondantes. Nous avons montré que le concept de « squalénisation » pouvait s'appliquer à bien d'autres analogues nucléosidiques (cytarabine, AZT, ddl, ribavirine, etc.), ainsi qu'aux nucléosides naturels (thymidine).

### Application du concept de squalénisation à la vectorisation de la gemcitabine

*In vitro*, les nanoparticules de SQgem ont montré un large spectre d'activité anticancéreuse sur le panel des soixante

lignées tumorales humaines du NIH. Pour la plupart d'entre elles, 50 % d'inhibition de croissance sont obtenus à des concentrations nanomolaires [5].

Sur le plan biopharmaceutique, il a été montré *in vitro* que, contrairement à la gemcitabine, les nanoparticules de gemcitabine-squalène (SQgem) n'étaient pas désaminées par les désaminases plasmatiques en difluoro-uracile inactif, mais qu'au contraire, elles restaient stables en milieu plasmatique. Au niveau intracellulaire, la gemcitabine est libérée suite à l'activation de la prodrogue par les cathepsines<sup>(4)</sup> B et D, hyperexprimées dans les cellules cancéreuses. *In vivo*, après administration intraveineuse, les nanoparticules de SQgem induisent des concentrations plasmatiques très supérieures à celles de la gemcitabine (AUCgem/AUCSQgem = 0,12, AUC : aire sous la courbe) et l'apparition du métabolite inactif (difluorouracile) est très ralentie [6].

Des études *in vivo* ont été menées sur deux modèles de leucémies murines expérimentales (leucémies L1210 et P388) greffées par voie intraveineuse [7-8] et induisant l'apparition rapide de métastases. À dose équivalente, le taux de survie moyen est significativement allongé dans le groupe de souris traitées par les nanoparticules de SQgem (injection par voie intraveineuse) comparativement au groupe traité par la gemcitabine seule. Dans les deux modèles, des survivants à long terme sont seulement obtenus lorsque les animaux sont traités par les nanoparticules de SQgem, les groupes de souris traitées par la gemcitabine en solution n'enregistrant aucun survivant à long terme. D'autre part, l'examen de l'évolution du poids des animaux a montré que seuls les groupes d'animaux traités par les nanoparticules de SQgem ne subissaient pas de perte de poids due à l'apparition précoce des métastases ; les animaux traités par la gemcitabine libre enregistraient une perte de poids plus tardive que les animaux non traités. Comparativement au traitement par la gemcitabine libre, l'apoptose cellulaire est très fortement augmentée lorsque les souris sont traitées par les nanoparticules de SQgem, la majorité des cellules étant bloquées en phase S<sup>(5)</sup> [7].

Des études réalisées sur les leucémies murines L1210 et P388 greffées par voie sous-cutanée avaient pour objectif de mesurer l'activité anticancéreuse des nanoparticules de SQgem sur des tumeurs solides, pour lesquelles l'endothélium vasculaire doit être franchi. À dose équivalente, ces nanoparticules se sont à nouveau révélées beaucoup plus actives que la gemcitabine sur ces modèles de tumeurs greffées par voie sous-cutanée, les traitements étant effectués par voie intraveineuse [3, 5]. Ces résultats sont importants car ils suggèrent que les nanoparticules de SQgem sont également beaucoup plus efficaces que la gemcitabine sur des tumeurs solides (inhibition accrue de la croissance tumorale avec le traitement SQgem, *figure 1*).

Par ailleurs, des essais toxicologiques (analyses biochimiques et hématologiques) ont permis de déterminer la dose maximale tolérée (MTD) après administration intraveineuse de SQgem ou de gemcitabine. Les traitements par les nanoparticules de SQgem ou par la gemcitabine libre ont ensuite été effectués à la MTD et par voie intraveineuse chez la souris leucémique. Les résultats obtenus sont spectaculaires : 75 % des animaux traités par les nanoparticules de gemSQ sont guéris (75 % LTS, LTS : « long term survivals »), alors qu'aucun animal traité par la gemcitabine sous forme libre ne survit (0 % LTS) [9].

### Application du concept de squalénisation aux analogues nucléosidiques à activité antivirale

Le concept de squalénisation a été appliqué à d'autres analogues nucléosidiques à activité antivirale, comme le ddC et le ddl [2, 5]. Les deux dérivés squalénés se sont avérés deux à trois fois plus actifs que les molécules mères correspondantes en ce qui concerne leur capacité à inhiber la multiplication virale (ED 50 % : concentration d'antiviral qui inhibe 50 % de la multiplication virale) sur un modèle de lymphocytes infectés issus de trois donneurs. Dans cet essai, la 5'-trisonorsqualenoyl thymidine a été utilisée comme témoin négatif. En effet, bien que, comme expliqué précédemment, ce nucléoside naturel forme aussi des nanoparticules de 130 nm en milieu aqueux, il n'a aucune activité antivirale. De manière intéressante, lorsque le dérivé squaléné du ddC est mélangé avec du squalène PEGylé, les nanoparticules composites qui en résultent ont une activité anti-HIV encore plus importante.

### Nanovecteurs par association de polymères hydrosolubles

La plupart des systèmes nanoparticulaires nécessitent, lors de leur fabrication, l'emploi de solvants organiques et d'agents tensioactifs difficiles à éliminer et potentiellement toxiques. Ces problèmes ont été surmontés grâce à la mise au point d'un procédé original conduisant à la formation spontanée de nanoparticules dans des conditions douces (galénique « verte »), en milieu aqueux, sans apport d'énergie et en l'absence de tout solvant organique [9-10]. Ce procédé consiste simplement à mélanger deux solutions aqueuses de polymères associatifs : un polysaccharide greffé avec des chaînons alkyles nommé DM, et un polymère de cyclodextrine (CD) nommé pCD. Dès la mise en contact de ces deux polymères dans l'eau, les chaînons alkyles forment spontanément des complexes d'inclusion avec certaines cyclodextrines, tout en laissant un grand nombre de cavités libres pour l'inclusion de molécules d'intérêt dans les domaines médical ou cosmétique (*figure 2*).

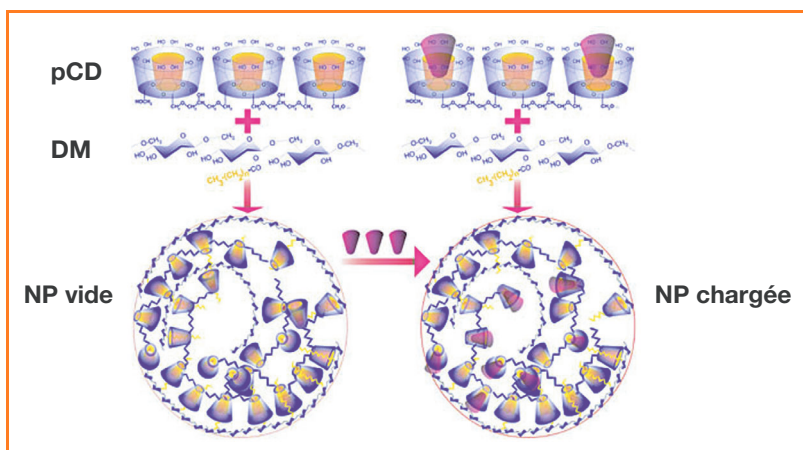


Figure 2 - Représentation schématique des nanoparticules NP obtenues par mélange de deux polymères associatifs, pCD et DM.

Les éléments hydrophobes (chaînons alkyles du DM, cavités des CD) sont représentés en jaune et les éléments hydrophiles (squelette du dextrane et partie extérieure des CD) en bleu. Les molécules actives hydrophobes (cyan) peuvent être encapsulées soit en formant des complexes d'inclusion avec les pCD avant mélange avec DM, soit en chargeant les particules préformées.

Ainsi, des filtres solaires comme la benzophénone et des principes actifs anticancéreux comme le tamoxifène ont pu être associés avec succès à ces nanoparticules, avec des rendements supérieurs à 60 % [11-12].

Un ensemble d'études physico-chimiques a permis d'appréhender le mécanisme de formation et la structure fine des nanoparticules chargées ou non en molécules hydrophobes. Par exemple, la spectroscopie RMN a permis de mettre en évidence que la quasi-totalité des chaînons alkyles, minoritaires, interagissaient avec les CD, majoritaires [9]. La spontanéité de cette interaction a été confirmée par modélisation moléculaire et par étude de la tension interfaciale de solutions de polymère [9]. Ainsi, les deux polymères pCD et DM s'associent selon un mécanisme de type « fermeture-éclair ». Par un effet de proximité, la formation des premiers complexes d'inclusion CD-chaînon alkyle favorise la formation des complexes suivants.

La microcalorimétrie isotherme à titration (ITC) a permis de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction entre les chaînons alkyles et les CD dans le pCD et d'accéder aux constantes d'association [13]. Les valeurs particulièrement élevées de ces constantes d'association ( $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) ont été également attribuées à l'existence d'effets coopératifs dus aux multiples inclusions (environ vingt chaînons alkyles sur le DM et plus de mille CD dans pCD). L'ensemble de ces caractérisations physico-chimiques a permis d'expliquer la remarquable stabilité de ces nanoparticules, dont la cohésion est uniquement basée sur la formation de complexes d'inclusion.

Une autre application de ces nanoparticules concerne l'encapsulation d'agents de contraste pour l'imagerie médicale [14]. Des complexes de gadolinium (agent de contraste positif permettant l'obtention d'images brillantes correspondant aux anomalies) modifiés avec l'adamantane ont été incorporés dans les nanoparticules par formation de complexes d'inclusion adamantane-CD. Des relaxivités, parmi les plus importantes dans la littérature, ont été obtenues et sont dues à la forte teneur en eau dans les nanoparticules (~ 70 % poids).

## Conclusion

Ces travaux illustrent l'importance de la chimie dans la conception de nouveaux (bio)matériaux pour l'administration, le transport et la vectorisation des médicaments. La mise au point de nanomédicaments nécessite en effet d'avoir recours à des matériaux biocompatibles et non toxiques dont la mise en œuvre pour la préparation de nanovecteurs doit faire appel à des méthodologies de préparation n'utilisant pas d'excipients toxiques (agents tensioactifs, solvants toxiques difficiles à éliminer...). La « squalénisation » ainsi que l'utilisation de polymères associatifs constituent deux exemples d'approches novatrices dans le domaine de la nanogalénique « verte ».

## Notes et références

- (1) *Thésaurismose* : affection due à l'accumulation dans les cellules de quantités anormalement élevées de substances normales ou pathologiques.
- (2) *Immunogène* : qui peut provoquer une réaction immunitaire.
- (3) *Squalène* : lipide naturellement produit par les plantes, les poissons et les mammifères, y compris l'homme, précurseur essentiel de la biosynthèse du cholestérol notamment.
- (4) Les *cathepsines* sont des protéases qui tiennent une place importante dans la dégradation des protéines par le lysosome. Elles forment une famille d'au moins onze membres, appelées cathepsine A, B, C, D, F, H, J, K, L, L2, S et Z.

- (5) Le cycle cellulaire des cellules des eucaryotes supérieurs comprend quatre phases. La *phase S* est celle de la réplication de l'ADN (S pour synthèse).
- (1) Brigger I., Dubernet C., Couvreur P., Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2002**, *54*, p. 631.
- (2) Couvreur P., Stella B., Harivardhan Reddy L., Hillaireau H., Dubernet C., Desmaële D., Lepêtre-Mouelhi S., Rocco F., Dereuddre-Bosquet N., Clayette P., Rosilio V., Marsaud V., Renoir M., Cattel L., Squalenoyl nanomedicines as potential therapeutics, *Nano Letters*, **2006**, *6*, p. 2544.
- (3) Couvreur P., Reddy L.H., Mangenot S., Poupaert J.H., Desmaële D., Lepêtre-Mouelhi S., Pili B., Bourgaux C., Amenitsch H., Ollivon M., Discovery of new hexagonal supramolecular nanostructures formed by squalenoylation of an anticancer nucleoside analogue, *Small*, **2008**, *4*, p. 247.
- (4) Bekkara-Aounallah F., Gref R., Othman M., Reddy L.H., Pili B., Allain V., Bourgaux C., Hillaireau H., Lepêtre-Mouelhi S., Desmaële D., Nicolas J., Chafi N., Couvreur P., Novel PEGylated nanoassemblies made of self-assembled squalenoyl nucleoside analogues, *Adv. Funct. Materials*, **2008**, *18*, p. 3715.
- (5) Reddy L.H., Renoir J.-M., Marsaud V., Lepêtre-Mouelhi S., Desmaële D., Couvreur P., Anticancer efficacy of squalenoyl gemcitabine nanomedicine on 60 human tumor cell panel and on experimental tumor, *Molecular Pharmaceutics*, **2009**, *6*, p. 1526.
- (6) Reddy L.H., Khoury H., Paci A., Deroussent A., Ferreira H., Dubernet C., Declèves X., Besnard M., Chacun H., Lepêtre-Mouelhi S., Desmaële D., Rousseau B., Laugier C., Cintrat J.C., Vassal G., Couvreur P., Squalenoylation favorably modifies the *in vivo* pharmacokinetics and biodistribution of gemcitabine in mice, *Drug Metab. and Disposit.*, **2008**, *36*, p. 1570.
- (7) Reddy L.H., Dubernet C., Mouelhi S.L., Marque P.E., Desmaële D., Couvreur P., A new nanomedicine of gemcitabine displays enhanced anticancer activity in sensitive and resistant leukemia types, *J. Control Release*, **2007**, *124*, p. 20.
- (8) Reddy L.H., Marque P.E., Dubernet C., Lepêtre-Mouelhi S., Desmaële D., Couvreur P., Preclinical toxicology (sub-acute and acute) and efficacy of a new squalenoyl gemcitabine anticancer nanomedicine, *J. Pharm. Exper. Therapeut.*, **2008**, *325*, p. 484.
- (9) Gref R., Amiel C., Molinard K., Daoud-Mahammed S., Sébille B., Beloeil J.-C., Ringard C., Rosilio V., Poupaert J., Couvreur P., New self-assembled nanogels based on host-guest interactions: characterization and drug loading, *J. Contr. Release*, **2006**, *111*(3), p. 316.
- (10) Daoud-Mahammed S., Couvreur P., Gref R., Novel self-assembling nanogels: stability and lyophilisation studies, *Int. J. of Pharmaceutics*, **2007**, *332*(1-2), p. 185.
- (11) Daoud-Mahammed S., Couvreur P., Bouchemal K., Chéron M., Lebas G., Amiel C., Gref R., Cyclodextrin and polysaccharide-based nanogels: entrapment of two hydrophobic molecules, benzophenone and tamoxifen, *Biomacromolecules*, **2009**, *10*(3), p. 547.
- (12) Daoud-Mahammed S., Ringard-Lefebvre C., Rosilio V., Gillet B., Couvreur P., Amiel C., Gref R., Spontaneous association of hydrophobized dextran and poly- $\beta$ -cyclodextrin into nanoassemblies: formation and interaction with a hydrophobic drug, *J. of Colloid and Interface Science*, **2007**, *307*(1), p. 83.
- (13) Othman M., Bouchemal K., Couvreur P., Gref R., Microcalorimetric investigation on the formation of supramolecular nanoassemblies of associative polymers loaded with gadolinium chelate derivatives, *Int. J. Pharm.*, **2009**, *379*, p. 218.
- (14) Battistini E., Gianolio E., Gref R., Couvreur P., Fuzerova S., Othman M., Aime S., Badet B., Durand P., High-relaxivity MRI-contrast agent based on supramolecular assembly between a gadolinium chelate, a modified dextran and poly- $\beta$ -cyclodextrin, *Chemistry - A European Journal*, **2008**, *14*(15), p. 4551.



R. Gref

**Ruxandra Gref** est directeur de recherche au CNRS et **Patrick Couvreur** (auteur correspondant) est professeur et membre de l'Institut Universitaire de France, Université Paris-Sud 11\*.



P. Couvreur

\* UMR CNRS 8612, Université Paris-Sud 11, 5 rue Jean-Baptiste Clément, F-92296 Châtenay-Malabry Cedex.  
Courriels : patrick.couvreur@u-psud.fr ; ruxandra.gref@u-psud.fr