

# Biohybrides enzymes/hydroxydes doubles lamellaires

## De la biocatalyse à la biodétection

Franck Charmantray, Claude Forano, Christine Guérard-Hélaine, Laurence Hecquet, Virgil Hélaine, Marielle Lemaire, Christine Mousty et Vanessa Prévot

**Résumé** Un des défis dans les procédés *in vitro* impliquant des enzymes est de préserver leur stabilité tout en assurant leur réutilisation sur plusieurs cycles. Cette problématique a été très peu explorée dans le cas de la carbolygation enzymatique catalysée par les aldolases et transcétolases. Deux équipes de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand ont mis en commun leurs compétences en science des matériaux et en biocatalyse pour développer de nouveaux matériaux biohybrides. Les hydroxydes doubles lamellaires se sont révélés particulièrement adaptés à l'immobilisation de ces enzymes, préservant ainsi leur activité, permettant leur recyclage et offrant de plus un procédé écoresponsable. Ces nouveaux biohybrides ouvrent la voie vers des applications à plus grande échelle en biocatalyse et vers le développement de biocapteurs impliquant la transcétolase pour des applications médicales.

**Mots-clés** Enzymes, hydroxydes doubles lamellaires, biocatalyse, biocapteurs.

**Abstract** Enzyme-layered double hydroxide biohybrids: towards biocatalysis and biodetection

One of the challenges for *in vitro* processes involving enzymes is to ensure both their activities and their reuses over many reaction cycles. This topic has been lightly explored in the case of enzymatic carbonylation catalyzed by aldolases and transketolases. Two teams of Institute of Chemistry of Clermont-Ferrand have accordingly pooled their competences in material chemistry and in biocatalysis for developing new biohybrids. Layered double hydroxides have revealed a high potential for the immobilization of these enzymes maintaining their activity, allowing their reuse and offering an eco-compatible process. These new biohybrids open the way towards large-scale applications in biocatalysis and towards the development of biosensors based on transketolase for medical applications.

**Keywords** Enzymes, layered double hydroxides, biocatalysis, biosensors.

Les enzymes isolées sont des biocatalyseurs permettant de produire sélectivement certains composés organiques par des réactions régio-, chimio-, stéréo- et énantio-sélectives et dans des conditions exceptionnellement douces : pH neutre, température ambiante, milieu aqueux. La formation stéréosélective de la liaison C-C est un enjeu majeur pour la conception de molécules bioactives complexes, trouvant de nombreuses applications dans les domaines de la chimie fine, de la pharmacie et de l'agro-alimentaire.

Pour des applications industrielles en biocatalyse et dans la technologie des biocapteurs, un des défis réside dans l'immobilisation des enzymes par des procédés simples et efficaces, peu coûteux et écoresponsables, permettant leur réutilisation. En effet, un biocatalyseur est rarement insoluble, ce qui rend son recyclage difficile. En outre, il évolue dans des conditions souvent éloignées des conditions physiologiques naturelles, ce qui diminue sa durée de vie et donc son potentiel catalytique. La matrice d'immobilisation doit permettre un taux d'immobilisation élevé, des propriétés de diffusion des substrats et produits favorables, une protection à l'épreuve des agressions chimiques et physiques. Elle peut contribuer à l'amélioration des performances par ses propriétés de biocompatibilité ou son activité chimique favorable à la réaction enzymatique. Une dimension nanométrique et une structure poreuse hiérarchisée favorisant la diffusion et l'accessibilité

au sein du biohybride sont des propriétés indispensables pour atteindre ces objectifs.

L'élaboration d'un matériau biohybride associant un matériau inorganique et une enzyme requiert une approche innovante d'assemblage et de nanostructuration de nano-objets inorganiques et de biomolécules. Parmi les matériaux inorganiques décrits dans la littérature, les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) présentent un intérêt unique de par leur structure bidimensionnelle et leurs caractéristiques physico-chimiques [1-2]. En effet, ces matériaux, encore appelés argiles anioniques, possèdent une grande variabilité chimique, structurale et morphologique, et sont donc des matrices de choix pour la fonctionnalisation par des biomolécules (acides aminés, ADN, ARN, protéines, enzymes...) et la création d'une nouvelle famille de matériaux biohybrides.

Les HDL présentent une structure de type brucitique  $Mg(OH)_2$  avec substitution d'une partie des cations divalents par des cations trivalents pour donner la formule chimique générale :  $[M^{2+}_{1-a}M^{3+}_a(OH)_2]^{a+} [(A^{n-})_{a/n}, y H_2O]$ , symbolisée par  $M_{1-a}^{2+}M_a^{3+}A$ . La charge positive générée à la surface du feuillet est contrebalancée par la présence d'anions hydratés ( $A^{n-}$ ) dans le domaine interlamellaire. À partir d'une telle structure de base, il est possible de varier la nature des cations divalents et trivalents ainsi que celle des anions interlamellaires, afin d'accéder à une large gamme de composition et de moduler ainsi leurs propriétés physico-chimiques.

En particulier, leurs propriétés d'échange anionique combinées à leur structure bidimensionnelle flexible créent un environnement particulièrement favorable pour le confinement d'enzymes, offrant également un milieu hydraté biocompatible qui préserve la structure quaternaire de l'enzyme, nécessaire à son activité. Une large variété d'enzymes, notamment de la famille des oxydoréductases, a été piégée dans les phases HDL [3-4] et les développements récents dans le contrôle des conditions d'élaboration et de nanostructuration de nanoparticules de HDL renforcent encore ces perspectives de développement.

### Élaboration de biohybrides performants

#### Deux enzymes aux propriétés remarquables : la fructose-6-phosphate aldolase (FSA) et la transcétolase (TK)

La D-fructose-6-phosphate aldolase (FSA, EC 4.1.2.) issue du génome d'*Escherichia coli* et la transcétolase (TK, EC 2.2.1.1) provenant de différents microorganismes sont des enzymes particulièrement intéressantes.

La FSA catalyse la réaction d'aldolisation entre un donneur et un accepteur en formant stéréosélectivement la liaison C-C de l'aldol. Cette enzyme accepte plusieurs donneurs tels que la dihydroxyacétone mais aussi l'hydroxyacétone, l'hydroxybutanone et le glycolaldéhyde (figure 1). Cette propriété, apparemment inexistante chez les autres aldolases, fait de la FSA un outil exceptionnel pour la synthèse organique. Elle est de plus très tolérante vis-à-vis des aldéhydes accepteurs, ce qui permet, en jouant sur le couple donneur/accepteur, d'accéder à toute une nouvelle gamme de molécules à fort potentiel thérapeutique en très peu d'étapes [5-7].

La TK est une transférase à pyrophosphate de thiamine (ThDP) qui catalyse également la formation stéréospécifique d'une liaison C-C. *In vivo*, cette enzyme transfère de façon réversible un groupement « céto » d'un cétose phosphate sur un aldose phosphate. L'intérêt de cette enzyme en biocatalyse repose sur l'utilisation de l'hydroxypyruvate (HPA)

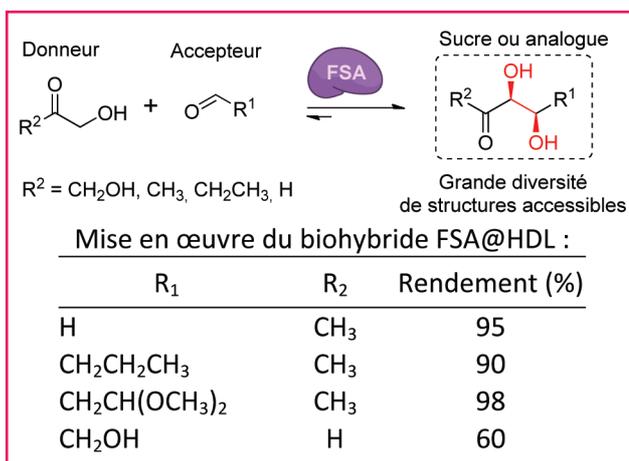


Figure 1 - Réaction catalysée par la FSA libre et FSA@HDL pour des applications biocatalytiques.

comme donneur car la réaction devient irréversible. Cette découverte nous a permis d'exploiter les potentiels synthétiques des TK de levure, de *E. coli*, et plus récemment celle d'un microorganisme thermophile *G. stearothermophilus* [8], jamais décrite jusqu'alors. Le groupement « céto » du HPA est transféré sur une grande variété d'aldéhydes phosphorylés ou non, conduisant à des cétooses et analogues (3S,4R) de façon hautement stéréosélective [9-10] (figure 2).

#### Des stratégies d'immobilisation dans les HDL adaptées à ces enzymes

Les procédés de synthèse dits de chimie douce sont particulièrement adaptés à la préparation des matériaux HDL biohybrides car ils sont mis en œuvre dans des milieux aqueux, en présence de réactifs chimiques peu agressifs, et dans des conditions douces de pression et de température. Plusieurs stratégies ont été développées à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand pour confiner les enzymes soit à la surface des feuillettes HDL, soit dans le réseau poreux de nanoplaquettes de HDL interconnectées [3]. Avec des

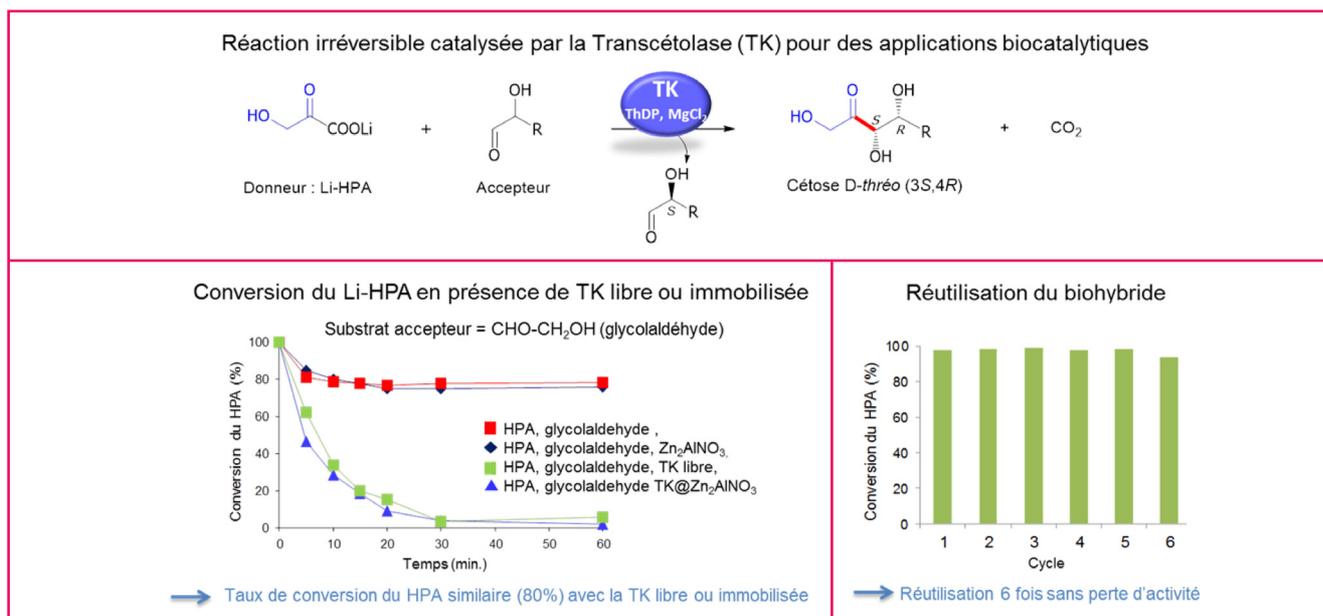


Figure 2 - Réaction catalysée par la TK libre et TK@HDL pour des applications biocatalytiques.

densités de charges négatives et des capacités d'échange anioniques ajustables, une densité élevée de fonctions hydroxylées de surface, les feuillettes de HDL MgAl et ZnAl offrent des capacités d'adsorption d'enzymes uniques, en particulier pour les enzymes comme la FSA et la TK, négativement chargées dans les domaines de pH d'utilisation. La phase HDL MgAl adsorbe plus de 1 mg de TK par mg de solide. Les forces d'interaction HDL/enzymes, électrostatiques et hydrogène, se cumulent pour rendre l'adsorption quasi irréversible. La capacité d'adsorption peut être améliorée par le contrôle de l'état de dispersion colloïdale des plaquettes de HDL et de la porosité du matériau.

Le piégeage des enzymes par coprécipitation directe des phases HDL en présence de TK ou de FSA conduit également à des taux d'immobilisation élevés [11-13]. Les biomolécules jouent un rôle chimique et structurant fondamental dans le mécanisme de formation du biohybride. La signature structurale du matériau montre un désordre d'empilement des feuillettes élevé, généré par l'effet directeur de la surface des enzymes sur la croissance des nanoplaquettes. Le réseau tridimensionnel de plaquettes interconnectées s'organise à la surface des biomolécules sous la forme d'un gel favorable à la diffusion des substrats et des produits de la réaction enzymatique (figure 3). La flexibilité du procédé de synthèse a permis d'immobiliser la TK soit sous forme d'extrait brut (TK<sub>SC</sub>) [12], soit sous forme purifiée (TK<sub>EC</sub>) [13]. Les contraintes de stabilité acido-basique des enzymes peuvent être surmontées par le choix approprié de la nature des HDL M<sup>II</sup>M<sup>III</sup> et des conditions de coprécipitation (6 < pH < 11). L'homogénéité granulométrique des suspensions colloïdales TK<sub>EC</sub>@Mg<sub>2</sub>AlNO<sub>3</sub> permet de plus de réaliser des films minces à la surface d'électrodes pour le développement de biocapteurs [13-14]. Les matériaux biohybrides préparés dans ces conditions douces, qui peuvent être stockés sous forme de poudre lyophilisée à 4 °C, maintiennent près de 100 % de l'activité catalytique par rapport aux enzymes libres.

## Intérêt des biohybrides enzymes@HDL en biocatalyse pour la synthèse de polyols chiraux

Le matériau biohybride FSA@Mg<sub>2</sub>AlNO<sub>3</sub> a été utilisé avec différents aldéhydes afin de tester sa polyvalence biocatalytique (figure 1). Les analogues de sucres ont tous été préparés

avec de très bons rendements en utilisant le même matériau. De plus, du fait de l'inertie totale du matériau, aucune dégradation ou réaction parasite n'a été décelée, permettant ainsi la mise en place d'un protocole de purification extrêmement simplifié puisqu'une centrifugation suivie d'une évaporation du surnageant a permis d'isoler les produits à l'état pur. Pour tester la validité de notre approche, nous avons également changé la structure du donneur en utilisant le glycol aldéhyde. Avec ce substrat particulier, la réaction est aussi possible et permet d'obtenir les adduits dans les mêmes conditions que précédemment. Des tests de recyclabilité vis-à-vis d'une réaction modèle ont révélé que l'on pouvait utiliser ce matériau biohybride FSA@Mg<sub>2</sub>AlNO<sub>3</sub> au moins quatre fois sans perte notable de l'activité. Sur le plan de la réactivité, le matériau FSA@Mg<sub>2</sub>AlNO<sub>3</sub> apparaît donc comme un biocatalyseur aussi efficace que la FSA libre, avec l'avantage indéniable de répondre au cahier des charges précité. Cette immobilisation réussie d'une aldolase, conservant 100 % d'activité enzymatique, renforce encore son intérêt pour des applications à plus grande échelle en synthèse organique [11].

Le biohybride TK<sub>SC</sub>@Zn<sub>2</sub>AlNO<sub>3</sub> quant à lui a été utilisé dans une réaction modèle en présence de HPA comme donneur et de glycolaldéhyde comme accepteur. Les taux de conversion du HPA sont similaires à ceux obtenus avec l'enzyme libre [12]. De plus, les contrôles montrent la parfaite inertie du matériau Zn<sub>2</sub>AlNO<sub>3</sub> et l'absence de réactions parasites avec les substrats de la réaction. La caractérisation du produit formé, le L-érythrose, montre que l'immobilisation de la TK<sub>SC</sub> ne modifie pas la stéréospécificité de la réaction. Le résultat majeur pour des applications biocatalytiques concerne la réutilisation du biohybride TK<sub>SC</sub>@Zn<sub>2</sub>AlNO<sub>3</sub> qui peut se faire six fois sans aucune perte d'activité (figure 2). Par comparaison avec les autres supports de nature organique étudiés, les HDL conduisent à un meilleur taux d'immobilisation des TK sans perte d'activité aussi bien lors de l'immobilisation que durant leur utilisation, ce qui ouvre la voie vers de nouvelles applications en biocatalyse et aussi dans le domaine des biocapteurs.

## Vers des applications en biodétection

Au-delà de ces applications en biocatalyse, la TK est présente dans tous les organismes supérieurs où elle participe à la voie des pentoses phosphates<sup>(1)</sup>, qui génère des intermédiaires clés dans le métabolisme cellulaire tels que le ribose-5-phosphate pour la synthèse des acides nucléiques.

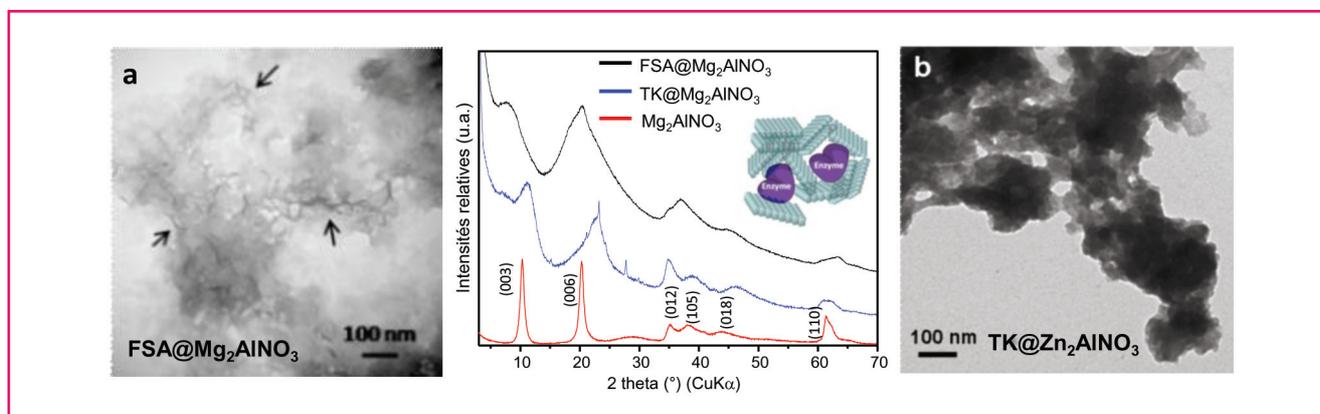


Figure 3 - Empreintes structurales (DRX, au centre) et images de microscopie électronique à transmission des biohybrides FSA@HDL (a) et TK@HDL (b).

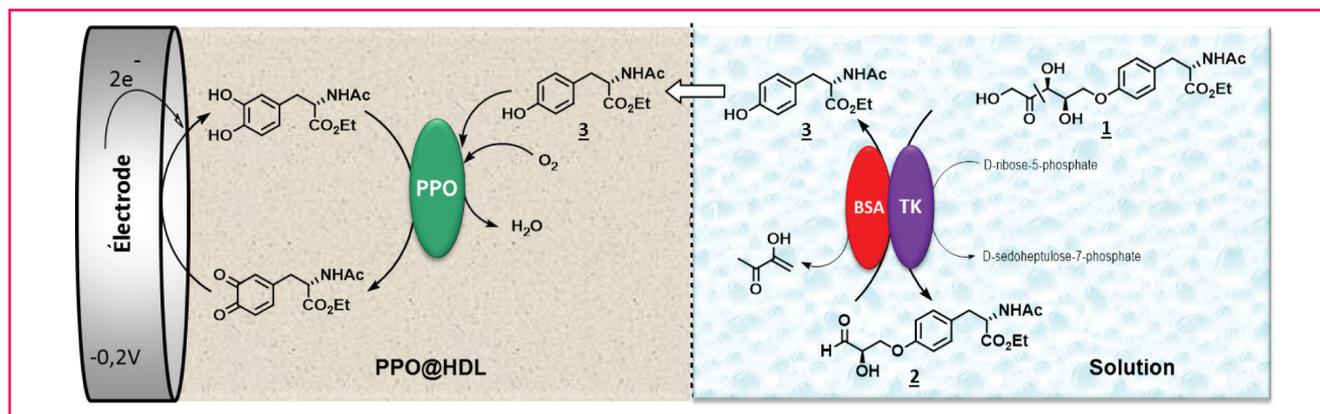


Figure 4 - Détermination de l'activité de la TK avec un biocapteur PPO@HDL.

Une modification de l'activité de la TK peut donc engendrer des maladies sévères chez l'Homme, comme certains cancers ([15] et réf. citées dans [14]), diabète [16] et maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer [17]. Des travaux récents ont montré que la TK est une cible thérapeutique dans certains cancers, avec la perspective de nouvelles approches thérapeutiques, notamment par la conception d'inhibiteurs du cofacteur, le ThDP [14].

Nous nous sommes alors intéressés au développement de tests rapides, sensibles et peu coûteux pour la détermination de l'activité de la TK. Un test électrochimique original associant la TK<sub>sc</sub> à l'albumine de sérum bovin (BSA) a été mis au point [18] comme alternative à un test fluorescent également développé au laboratoire [19]. La TK ne générant pas de molécules électro-actives, l'originalité de ce test réside dans une cascade de trois réactions catalysées par la TK, la BSA et une oxydoréductase, la polyphénol oxydase (PPO) [18]. La TK catalyse la rupture de la liaison C2-C3 du substrat **1**, puis l'aldéhyde formé **2** subit une β-élimination catalysée par la BSA. Ainsi, la L-tyrosine protégée **3** devient un substrat de la PPO immobilisée dans une matrice hôte constituée de HDL déposée à la surface de l'électrode. Comme illustré dans la *figure 4*, la cascade de réactions enzymatiques conduit à la génération d'un courant électrique mesuré à l'électrode, ce courant étant proportionnel à la concentration en TK. Nous développons actuellement un nouveau biocapteur impliquant la co-immobilisation d'un biohybride TK<sub>ec</sub>@HDL avec la galactose oxydase pour permettre le criblage d'inhibiteurs de cette enzyme [14].

Ces projets collaboratifs bénéficient de soutiens financiers de l'ANR, du CNRS et de la région Auvergne<sup>(2)</sup>, et les auteurs remercient tous les doctorants et post-doctorants qui ont participé à ces travaux.

## Notes et références

- (1) La voie des pentoses phosphates, ou voie de Warburg-Dickens-Horecker, est l'une des quatre principales voies métaboliques du métabolisme énergétique. La phase non oxydative de la voie des pentoses phosphates catalysée par deux enzymes, la transaldolase et la transcétolase, permet notamment la synthèse du D-ribose-5-phosphate indispensable à la synthèse des acides nucléiques, ARN et ADN.
- (2) DeoTK, ANR programme blanc franco-allemand 2009-2013, ANR-09-BLAN-0424-CSD3 ; Nanocausys, ANR programme CD2I, 2011-2015, ANR-12-CDII-0010-03 ; Transbioscreen, ANR programme blanc JC SV5, 2014-2017, ANR-13-JSV5-0002-01 ; bourse BDI CNRS-Région Auvergne (2010-2013) ; projets CPER Région Auvergne, Symbio 2009, Bio3 2012.
- [1] Forano C., Costantino U., Prevot V., Taviot-Gueho C., Chap. 14.1: Layered double hydroxides (LDH), in *Handbook of Clay Science*, 2<sup>nd</sup> Ed.,

*Developments in Clay Science* 5A, F. Bergaya, G. Lagaly (eds), Elsevier, 2013, p. 745-782.

- [2] Costantino U., Leroux F., Nocchetti M., Mousty C., Chap. 6: LDH in physical, chemical, biochemical, and life sciences, in *Handbook of Clay Science*, 2<sup>nd</sup> Ed., *Developments in Clay Science* 5B, F. Bergaya, G. Lagaly (eds), Elsevier, 2013, p. 765-791.
- [3] Prevot V., Mousty C., Forano C., State of the art in biomolecule and layered double hydroxide assemblies, in *Advances in Chemistry Research*, vol. 17, Nova Science Publishers, 2013, p. 35-84.
- [4] Mousty C., Prevot V., Hybrid and biohybrid layered double hydroxides for electrochemical analysis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, 405, p. 3513.
- [5] Guérard-Hélaine C., Debacker M., Clapés P., Szekrenyi A., Hélaine V., Lemaire M., Efficient biocatalytic processes for highly valuable terminally phosphorylated C5 to C9 D-ketoses, *Green Chem.*, 2014, 16, p. 1109.
- [6] Sánchez-Moreno I., Hélaine V., Poupard N., Charmantray F., Légeret B., Hecquet L., Garcia-Junceda E., Wohlgemuth R., Guérard-Hélaine C., Lemaire M., One-pot cascade reactions using fructose-6-phosphate aldolase: efficient synthesis of D-arabinose 5-phosphate, D-fructose 6-phosphate and analogues, *Adv. Synth. Catal.*, 2012, 354, p. 1725.
- [7] Garrabou X., Castillo J.A., Guérard-Hélaine C., Parella T., Joglar J., Lemaire M., Clapés P., Asymmetric self- and cross-aldol reactions of glycolaldehyde catalyzed by D-fructose-6-phosphate aldolase, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, p. 5521.
- [8] Abdoul-Zabar J., Sorel I., Hélaine V., Charmantray F., Devamani T., Yi D., de Berardinis V., Louis D., Marlière P., Fessner W.-D., Hecquet L., Thermostable transketolase from *Geobacillus stearothermophilus*: characterization and catalytic properties, *Adv. Synth. Catal.*, 2013, 355, p. 116.
- [9] Charmantray F., Hélaine V., Légeret B., Hecquet L., Preparative scale enzymatic synthesis of D-sedoheptulose-7-phosphate from β-hydroxypropionate and D-ribose-5-phosphate, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, 57, p. 6.
- [10] Simon G., Eljezi T., Legeret B., Charmantray F., Castillo J., Guérard-Hélaine C., Lemaire M., Bouzon-Bloch M., Marlière P., Hélaine V., Hecquet L., Synthesis of specially designed probes to broaden transketolase scope, *ChemCatChem*, 2013, 5, p. 784.
- [11] Guérard-Hélaine C., Légeret B., Fernandes C., Prevot V., Forano C., Lemaire M., Efficient immobilization of fructose-6-phosphate aldolase in layered double hydroxide: improved stereoselective synthesis of sugar analogues, *New J. Chem.*, 2011, 35, p. 776.
- [12] Benaiss K., Hélaine V., Prevot V., Forano C., Hecquet L., Efficient immobilization of yeast transketolase on layered double hydroxides and application for ketose, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, 353, p. 1497.
- [13] Touisni N., Charmantray F., Hélaine V., Forano C., Hecquet L., Mousty C., Optimized immobilization of transketolase from *E. coli* in MgAl-layered double hydroxides, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 2013, 112, p. 452.
- [14] Touisni N., Charmantray F., Hélaine V., Hecquet L., Mousty C., An efficient amperometric transketolase assay: towards inhibitor screening, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 62, p. 90.
- [15] Bentz S. et al., Hypoxia induces the expression of transketolase-like 1 in human colorectal cancer, *Digestion*, 2013, 88, p. 182.
- [16] Thornalley P.J., Jahan I., Ng R., Suppression of the accumulation of triosephosphates and increased formation of methylglyoxal in human red blood cells during hyperglycaemia by thiamine in vitro, *J. Biochem.*, 2001, 129, p. 543.
- [17] Zhao J., Zhong C.-J., A review on research progress of transketolase, *Neurosci. Bull.*, 2009, 25, p. 94.
- [18] Sanchez-Paniagua Lopez M., Charmantray F., Hélaine V., Hecquet L., Mousty C., Electrochemical detection of transketolase activity using a tyrosinase biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 26, p. 139.
- [19] Charmantray F., Legeret B., Hélaine V., Hecquet L., Fluorogenic substrates for the screening assay of transketolase through beta-elimination of umbelliferone: development, scope and limitations, *J. Biotechnol.*, 2010, 145, p. 359.



F. Charmantray



C. Guérard-Hélaine



V. Hélaine



L. Hecquet



M. Lemaire



C. Forano



C. Mousty



V. Prévot

**Franck Charmantray** est chargé de recherche CNRS, **Christine Guérard-Hélaine** et **Virgil Hélaine**, maîtres de conférences, **Laurence Hecquet** (*auteur correspondant*) et **Marielle Lemaire** professeurs, Équipe « Synthèse et étude de systèmes à intérêt biologique » (SEESIB), Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF)\*.

**Claude Forano** est professeur, **Christine Mousty** (*auteur correspondant*), directrice de recherche CNRS, et **Vanessa Prévot**, chargée de recherche CNRS, Équipe « Matériaux inorganiques » (MI), ICCF\*.

\* Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, ICCF UMR CNRS 6296, Université Blaise Pascal, F-63177 Aubière Cedex.  
Courriels : Laurence.Hecquet@univ-bpclermont.fr ; Christine.Mousty@univ-bpclermont.fr



## UNIVERSITE PARIS-SUD FACULTE DE PHARMACIE INSTITUT GALIEN PARIS-SUD – UMR CNRS 8612

5, rue Jean-Baptiste Clément  
92296 CHATENAY-MALABRY cedex - FRANCE

L'Institut Galien Paris-Sud - UMR CNRS 8612, fondée en 1986, joue un rôle central dans le domaine des nano et micro-technologies appliquées au médicament et au diagnostic. Dirigée par le professeur Elias FATTAL, elle est aujourd'hui structurée autour de 7 équipes : trois équipes de Physico-chimistes dirigées respectivement par Véronique ROSILIO, Florence AGNELY et Sylviane LESIEUR, trois équipes de Galénistes dirigées respectivement par Patrick COUVREUR, Elias FATTAL et Gilles PONCHEL et une équipe d'analyses spécialisée dans les nanotechnologies dans les sciences séparatives dirigée par Myriam TAVERNA. Fort de sa multidisciplinarité, l'Institut Galien Paris-Sud dispose d'atouts considérables pour aborder les différentes thématiques de recherche autour des nano ou micromédicaments. Elle est constituée de chercheurs et d'enseignants chercheurs provenant de différentes disciplines (chimie, physico-chimie, galénique, analytique et biologie), ce qui lui permet d'envisager non seulement la formulation mais la caractérisation physico-chimique et biologique des médicaments nano et microparticulaires. L'Institut Galien Paris-Sud est riche de plusieurs plates-formes qui sont pilotées par des ingénieurs/assistants ingénieurs (analyse chromatographique, culture cellulaire, manipulation de radio éléments, atelier d'instrumentation, informatique). Installée à l'UFR de Pharmacie de l'Université Paris-Sud, à Châtenay-Malabry, elle attire un grand nombre de doctorants et post doctorants dont une forte proportion provient de différents pays et continents.

**Mr Elias FATTAL : Directeur UMR CNRS 8612**

**Tél. : 01 46 83 55 82 • Fax : 01 46 83 59 46**

**E-mail : [elias.fattal@u-psud.fr](mailto:elias.fattal@u-psud.fr) • <http://www.umn-cnrs8612.u-psud.fr/>**