

La peau : support des cosmétiques mais aussi d'évaluation

Philippe Gasser et Dorothée Bouzoud

Résumé Le marché des produits cosmétiques étant un marché très important, l'activité de ces produits doit être évaluée afin de garantir au consommateur un résultat conforme à ce qui est revendiqué par le fabricant. La tolérance des matières premières et des produits finis doit être contrôlée afin d'écartier tout risque d'irritation. Dans ce but, plusieurs modèles cellulaires peuvent être utilisés tels que les cultures cellulaires simples, les différents modèles de peaux reconstituées et le modèle d'explant de peau humaine maintenue en survie. L'observation des réactions est réalisée en microscopie optique ou en illumination en fluorescence après la mise en œuvre de colorations histologiques ou d'immunomarquages spécifiques.

Mots-clés **Cosmétique, peau, histologie, explant, évaluation.**

Abstract **The skin: support for cosmetics and evaluation**
The business of cosmetics and toiletries is thriving. The action of the cosmetic products must be assessed in order to guarantee the consumer an outcome in compliance with what is alleged by the producer. Tolerance for both raw materials and finished goods must be controlled in order to rule out any threat of irritation. Several cellular models can be used for this assessment, such as simple cell culture, reconstructed skin, or human skin explants maintained in survival. The observation of the results can be made either by optical microscopy or fluorescence lighting, after performing histological staining or immunostainings.

Keywords **Cosmetics, skin, histology, explants, assessment.**

La peau, l'organe le plus important du corps humain, est le seul organe en contact direct avec l'environnement extérieur, en constant renouvellement et comportant neuf types cellulaires différents. Elle a un rôle dans la thermorégulation, la protection contre l'environnement bactérien, la protection mécanique et contre les effets néfastes des UV. Mais elle est sensible aux stress environnementaux (soleil, pollution, tabac, alcool...) qui vont accentuer son vieillissement chronologique normal.

Depuis l'Antiquité, l'Homme a entretenu, soigné et peint sa peau avec des mélanges divers, appliqués sans en avoir évalué leur activité ni leur toxicité. C'était le début des cosmétiques. De nos jours, l'évaluation de l'activité et de la tolérance des produits cosmétiques (principes actifs ou produits finis) est menée de manière très scientifique. L'animal n'étant plus ou très peu utilisé, les modèles disponibles pour ces études vont des cultures cellulaires jusqu'au panel de volontaires sains, en passant par les différents modèles de peau reconstituée ou par l'utilisation du modèle d'explant de peau humaine maintenue en survie.

La peau humaine

La peau humaine est à la fois un organe très simple et très complexe. Elle est simple parce que les différents compartiments qui la composent sont facilement identifiables. Elle est complexe parce que les interactions entre ces compartiments et les messages entre ses différents types cellulaires sont très imbriqués les uns avec les autres.

Traitée par des techniques histologiques, c'est-à-dire immergée dans un mélange fixateur adapté, elle sera déshydratée, incluse en paraffine, coupée et colorée à l'aide

de colorations générales ou spécifiques. Des structures non visualisées par ces colorations seront mises en évidence à l'aide d'anti-corps spécifiques. L'observation et la prise de photos seront réalisées en microscopie photonique* ou en illumination en fluorescence. Les différents compartiments qui la composent sont alors clairement identifiables : épiderme, jonction dermo-épidermique (JDE) et derme (figure 1).

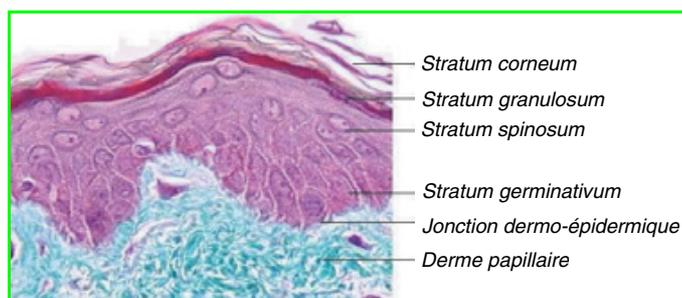


Figure 1 - Structure de la peau.
Photo prise au microscope optique après coloration au trichrome de Masson.

L'épiderme

L'épiderme est un épithélium* stratifié différencié et kératinisé*. Il se compose de couches cellulaires (les kératinocytes) qui prennent naissance au niveau de la couche basale*, le *Stratum germinativum*, puis migrent verticalement en se différenciant sur quatre à cinq assises cellulaires : le *Stratum spinosum*. Au-dessus sont visualisées deux à trois assises de cellules contenant des granules foncés : le *Stratum granulosum*. Au fur et à mesure de leur évolution, leur métabolisme va diminuer, le contenu cellulaire va disparaître, ne conservant que les enveloppes cornées

renfermant un squelette de kératine : ce sont les *cornéocytes* dont l'empilement forme le *Stratum corneum* (figure 1). Dans les espaces intercellulaires, se trouve un ciment composé d'une juxtaposition de couches hydrophiles et hydrophobes. Son rôle est très important dans le maintien de la fonction barrière, le contrôle de la perte en eau et la pénétration de molécules.

Toutes ces cellules possèdent des systèmes de communication et d'adhésion comme les desmosomes* dans le *stratum germinativum* et dans le *stratum spinosum*. Ils deviennent cornéodesmosomes dans le *stratum corneum*. Les cornéocytes des couches supérieures du *stratum corneum* vont, par une protéolyse* contrôlée de la cornéodesmosine, protéine présente dans les cornéodesmosomes, se séparer les uns des autres : c'est la desquamation*.

Dans le *stratum spinosum*, les cellules de Langerhans (cellules dendritiques mobiles) sont impliquées dans le processus de protection immunitaire. Au niveau de la couche basale, les mélanocytes*, autres cellules dendritiques, sont responsables de la pigmentation cutanée.

Glossaire

Les mots suivis d'un astérisque* dans le texte sont définis ci-dessous.

Chitosane : polysaccharide dérivé de la chitine, particulièrement abondant dans les carapaces de crustacés.

Collagène : glycoprotéine fibreuse sécrétée par les tissus conjonctifs et jouant le rôle d'une armature fortifiant la peau, les os, les cheveux etc.

Couche basale : couche germinative de l'épiderme, dans laquelle les kératinocytes se divisent et se développent.

Desmosome : structure de liaison entre kératinocytes, l'un des types de structure assurant la cohésion de l'épiderme.

Desquamation : (du latin *desquamare*, écailler) perte des couches superficielles de la peau sous formes de petites pellicules.

Épithélium : tissu constitué de cellules étroitement juxtaposées, sans interposition de fibre ou de substance fondamentale.

Fibronectine : protéine impliquée dans le processus de cicatrisation, créant des « rails » le long desquels migrent les fibroblastes pour recoloniser la lésion.

Filaggrine : protéine de la base du *stratum corneum* qui, dégradée, libère d'une part des acides aminés constitutif du Facteur naturel d'hydratation (qui assure une bonne hydratation de la peau en fixant l'eau), et d'autre part se lie aux filaments de kératine pour constituer l'enveloppe des cornéocytes.

Glandes sudoripares : glandes responsables de la production de sueur. Les glandes sudoripares eccrines et apocrines se différencient par leur localisation sur le corps humain et par la nature de la sueur qu'elles sécrètent.

Intégrines : protéines transmembranaires.

Kératine : protéine fibreuse et hélicoïdale, c'est le composant principal de la peau, des ongles, poils, cheveux, cornes...

Laminines : composants de la JDE, la laminine-5 est impliquée dans les activités restructurantes.

Lignée blanche : lignée cellulaire rassemblant les globules blancs sanguins. Ils sont retrouvés dans le derme, voire dans l'épiderme, en cas de lésion, d'infection ou de phénomène allergique.

Mélanocyte : cellule spécifique de l'épiderme produisant la mélanine, pigment induisant le bronzage.

Microscopie photonique : microscopie optique.

Phénotype : ensemble des caractéristiques biologiques d'une cellule ou d'un tissu.

Phototype : classement de la pigmentation des peaux, de 0 (peau albinos) à V (peau noire).

Plastie : résidu opératoire à l'issue d'une opération de chirurgie plastique.

Protéolyse : dégradation de protéines par des enzymes spécifiques.

Surexpression : augmentation de l'expression.

Entre l'épiderme et le derme, la jonction dermo-épidermique est une importante zone de transition. Elle est composée de plusieurs protéines bien structurées formant un système d'accroche de l'épiderme sur le derme et de filtration de molécules entre ces deux compartiments. Elle comprend des structures uniques, appelées complexes d'ancrage, permettant à l'épiderme de résister de manière efficace aux différentes contraintes mécaniques provenant de l'extérieur.

Le derme

Le derme contient essentiellement la matrice extracellulaire dont les éléments majoritaires sont les collagènes* (tableau 1) et le réseau de fibres élastiques. Cette matrice a un rôle de soutien dans l'intégrité structurale du tissu et des interactions intermoléculaires et cellules/matrice. Elle a un rôle de médiateur dans les grandes fonctions cellulaires comme la migration, la prolifération ou la différenciation cellulaire.

Tableau 1 - Les différents types de collagènes retrouvés dans la peau.

| Collagène | Organisation | Localisation |
|-----------|--------------|-----------------|
| I | Fibrillaire | Derme |
| III | Fibrillaire | Derme |
| IV | Membranaire | Membrane basale |
| V | Fibrillaire | Derme |
| VII | Membranaire | JDE |

Le derme se divise en trois parties : papillaire, réticulaire et l'hypoderme.

Le derme papillaire, situé le long de l'épiderme, montre des faisceaux de collagène fins, bien croisés, présentant souvent une orientation perpendiculaire à l'épiderme et formant un réseau assez dense. Les fibres élastiques sont très fines, ramifiées en candélabre (en forme de chandelier), bien perpendiculaires à l'épiderme : ce sont les fibres oxytalanes, premières fibres altérées dans le vieillissement photo-induit.

Le derme réticulaire sous-jacent est formé de faisceaux de collagène plus épais, bien croisés, avec une orientation parallèle à la surface cutanée. Les fibres élastiques sont plus épaisses, formant un réseau bien structuré. Dans ce derme, les fibroblastes sont responsables, entre autres, de la synthèse des collagènes et des fibres élastiques, mais aussi des enzymes responsables de leur dégradation. Les macrophages, les cellules dendritiques dermiques et les cellules sanguines issues de la lignée blanche* sont bien présents. Les glycosaminoglycannes (GAG), polysaccharides complexes, généralement sulfatés, sont trouvés en abondance à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire. Ces molécules, de par leur capacité à interagir et à moduler l'activité d'un très grand nombre de protéines, sont impliquées dans de multiples processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation et la migration cellulaires, le développement embryonnaire, la régulation de réactions enzymatiques ou les mécanismes de reconnaissance hôte/pathogène. Le derme renferme la moitié de l'acide hyaluronique de l'organisme (figure 2), un GAG non sulfaté et non lié aux protéines ayant un grand rôle dans l'hydratation.

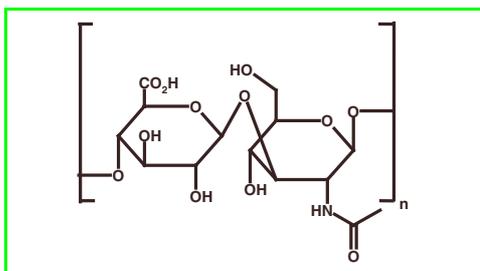


Figure 2 - L'acide hyaluronique.

Les annexes cutanées comme les poils, les glandes sudoripares* eccrines et apocrines, les nerfs ainsi que le réseau vasculaire sanguin et lymphatique sont bien présents.

Enfin, l'hypoderme, compartiment le plus profond, est essentiellement composé d'adipocytes, cellules réservoir de lipides servant de réserves d'énergie et d'amortisseurs mécaniques.

Les peaux reconstituées

Les modèles de peau reconstituée, qui ont été développés depuis 1979 [1], sont de différents types (voir encadré).

Des peaux reconstituées

Les dermes équivalents

Souvent composés d'une matrice de biopolymère (chitosane*, collagène ramifié), ils sont ensemencés par des fibroblastes qui vont provoquer la rétraction de la structure ou synthétiser leur propre matrice extracellulaire.

Les épidermes reconstruits

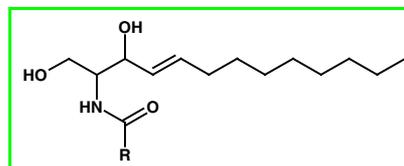
Ce sont les structures les plus utilisées. Il s'agit d'un pool de culture de kératinocytes humains ensemencés sur un support inerte qui vont proliférer dans la phase de culture immergée et se différencier avec la formation d'une couche cornée dans la phase de culture émergée. Ils peuvent être réalisés sur un derme mort désépidermisé ou sur une membrane poreuse. Selon les utilisations, la population cellulaire est complétée avec des mélanocytes ou des cellules de Langerhans.

Les modèles en 3D

Ces modèles comprennent une structure dermique artificielle recouverte d'un épiderme reconstitué. Ils sont généralement composés, pour la partie dermique, d'une éponge de biopolymère, ensemencée de fibroblastes, contenant parfois des cellules vasculaires endothéliales (cellules constitutives des vaisseaux sanguins). Cette structure est recouverte d'un film de collagène IV. La surface est ensemencée de kératinocytes formant un épiderme stratifié et différencié, complétée ou non de mélanocytes ou de cellules de Langerhans.

Mais ces modèles ont leurs limites : les modèles d'épidermes reconstruits ne permettent pas d'observer d'activité dermique. Si les marqueurs de différenciation épidermique sont bien exprimés, leur répartition est modifiée par rapport à ce qui est observé sur la peau humaine normale, comme la filaggrine* qui est visualisée sur tout le *stratum corneum* alors qu'elle n'est positionnée à sa base, dans le cas de la peau humaine normale. Il n'y a pas de desquamation et le *stratum corneum* s'épaissit durant la culture augmentant la résistance des kératinocytes sous-jacents aux *stimuli* environnementaux, ce qui modifie les résultats du test. La présence de certains inhibiteurs de protéase pourrait être la cause de cette absence de desquamation. Le *stratum corneum* contient tous les lipides de la peau humaine normale, mais avec quelques différences : la teneur en acide

gras libres est inférieure à celle d'un épiderme natif. Sur certains modèles, la teneur en céramide polaire 5 et 6 est moindre et le céramide 7 est absent (Figure 3). De plus, l'organisation de ces lipides est modifiée par rapport à celle de la peau humaine normale, ce qui explique les différences de pénétration à travers le *stratum corneum* et la forte augmentation du flux de perte en eau.

Figure 3 - Les céramides, structures lipidiques liées aux cornéocytes et présentes uniquement dans le *stratum corneum*.

La peau ex vivo, un support d'évaluation des cosmétiques

La peau en survie a surtout été développée dans les années 1980 suite à l'interdiction d'utiliser des animaux de laboratoire pour les études d'activité et de tolérance des produits cosmétiques. Les explants sont préparés à partir de déchets opératoires provenant de chirurgie plastique. La peau est nettoyée, le tissu adipeux excisé et les explants découpés avec un bistouri emporte-pièce du diamètre désiré. L'explant de peau humaine maintenue en survie est un modèle très intéressant car il contient toutes les cellules et toutes les structures de la peau humaine saine. Il est parfaitement adapté aux études de screening d'actifs aussi bien qu'à la mise en évidence de l'activité d'une formulation cosmétique. Le produit à tester peut être appliqué en topique ou dissout dans le milieu de survie, voire les deux à la fois. Il peut recevoir des applications répétitives avec une survie longue, ou être soumis à un stress (irradiation UV) aigu ou chronique.

La survie de ce modèle est bonne avec un milieu de survie bien adapté comme le BEM (BIO-EC Explant Medium) développé par le Laboratoire BIO-EC. Des études ont montré un bon maintien de la morphologie générale et une bonne réponse cellulaire lors de survies pouvant aller jusqu'à 20 jours. Mais 10 à 12 jours de survie sont largement suffisants pour pouvoir évaluer l'activité d'une matière première ou d'une formulation cosmétique. Dans les études, chaque condition est testée en triplicate. L'intégrité de la structure du *stratum corneum* est conservée. Les kératinocytes conservent leur capacité de division et de différenciation. Les cellules de Langerhans gardent leur mobilité et leur réactivité. Les mélanocytes répondent bien à une stimulation UV tout en restant en position basale. La stimulation des composants de la jonction dermo-épidermique est très nettement visualisée par des immunomarquages spécifiques, de même que les activités restructurantes sur le derme.

Trois types d'évaluation ont été choisis pour montrer les possibilités de ce modèle :

- **La tolérance cutanée**

Les matières premières ou les produits finis à tester afin d'évaluer leur tolérance cutanée sont appliqués pendant 24 h sur les explants. Après traitement en histologie et coloration des coupes, il sera observé la structure des différents compartiments cutanés (figure 4). Les altérations observées permettront de définir un indice de tolérance du produit testé.

• L'activité anti-âge

Afin de bien évaluer l'activité anti-âge d'un actif ou d'une formulation cosmétique, l'étude sera réalisée sur une plastie* d'un donneur âgé de plus de 50 ans. La survie sera menée sur une période de 10 à 12 jours et le produit à tester sera appliqué par voie topique à des doses variant de 1 à 4 mg par explant d'un diamètre d'environ 10 mm. Les applications sont répétées tous les jours ou tous les 2 jours. Plusieurs arrêts sont réalisables permettant d'observer une cinétique d'activité. À chaque arrêt, plusieurs types de fixation sont effectués afin de pouvoir mettre en œuvre les différentes colorations et immunomarquages demandés. La morphologie générale sera le premier paramètre étudié. Il sera recherché les réactions de stimulation épidermiques par l'observation de la morphologie des kératinocytes et par la mesure de l'épaisseur de l'épiderme. La stimulation dermique sera évaluée, dans le derme papillaire, par l'observation de la densité du réseau de collagène ainsi que par la morphologie de la population cellulaire. Des immunomarquages spécifiques seront réalisés pour montrer les modifications observées au niveau de la multiplication cellulaire, des marqueurs de la différenciation terminale, des kératinocytes de la couche basale, de certains composants de la jonction dermo-épidermique (JDE) comme la laminine-5* ou du collagène IV (collagène d'accroche de l'épiderme sur le derme). Dans le derme papillaire, la coloration au bleu alcian/PAS (periodic acid Schiff) (figure 5) permettra de montrer la surexpression* des GAG neutres le long de la JDE (important réservoir de facteurs de croissance). Les GAG neutres, sans groupements acides, sont essentiellement de l'héparane sulfate, de la chondroïtine sulfate, du syndecane. Les GAG acides dans le derme papillaire et dans les espaces interkératinocytaires dans les couches basales épidermiques (essentiellement de l'acide hyaluronique) sont très impliqués dans le processus d'hydratation.

La surexpression d'un ou de plusieurs de ces paramètres sera un indice positif montrant que le produit appliqué montre une activité restructurante sur l'épiderme et/ou le derme.

La restructuration dermique sera évaluée par immunomarquage des collagènes I ou III. L'activité anti-âge sera validée sur ce modèle par la présence d'une nette augmentation de l'épaisseur épidermique ainsi que par la surexpression d'un ou plusieurs des composants de la JDE et du derme papillaire.

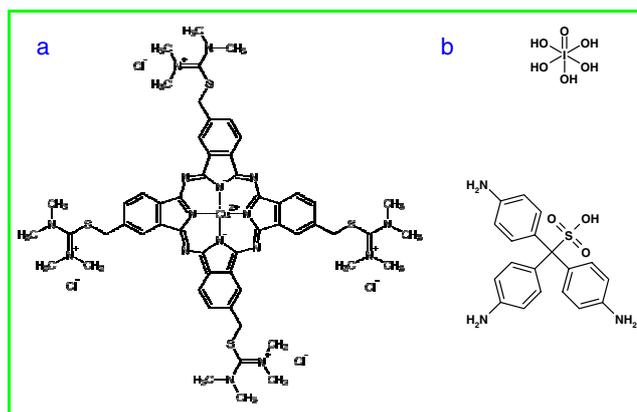


Figure 5 - (a) Le bleu alcian ; (b) Le PAS (Periodic Acid Schiff) : acide périodique et réactif de Schiff.

Sur un modèle d'épiderme reconstitué, seuls les paramètres épidermiques peuvent être évalués.

• L'activité cicatrisante

L'activité cicatrisante sera évaluée après une forte brûlure en UVB en utilisant un système permettant d'irradier uniquement le centre de l'explant en conservant une zone non irradiée en bordure de l'explant. La survie sera menée sur 10 à 12 jours. Il sera étudié l'apparition des réactions de cicatrisation précoces et tardives en début et en fin de survie. Les paramètres observés seront la morphologie générale de l'épiderme, la réparation des altérations provoquées sur la JDE, ainsi que celles dans le derme papillaire. La forte irradiation reçue par les kératinocytes va provoquer la mort cellulaire d'un grand nombre d'entre eux avec de fortes altérations sur la JDE comme sur l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ (structure d'accroche des kératinocytes basaux sur la membrane basale) et sur la laminine-5. Elle va aussi entraîner de fortes altérations des structures vasculaires. Sur l'épiderme, les observations seront centrées sur la limite entre la zone irradiée et la zone non irradiée. Les néo-kératinocytes vont apparaître sur les bords de la lésion et se glissant le long de la JDE sous la zone de kératinocytes mortifiés, former un bourgeon de croissance kératinocytaire plus ou moins long et plus ou moins stratifié. Ces néo-kératinocytes seront aussi

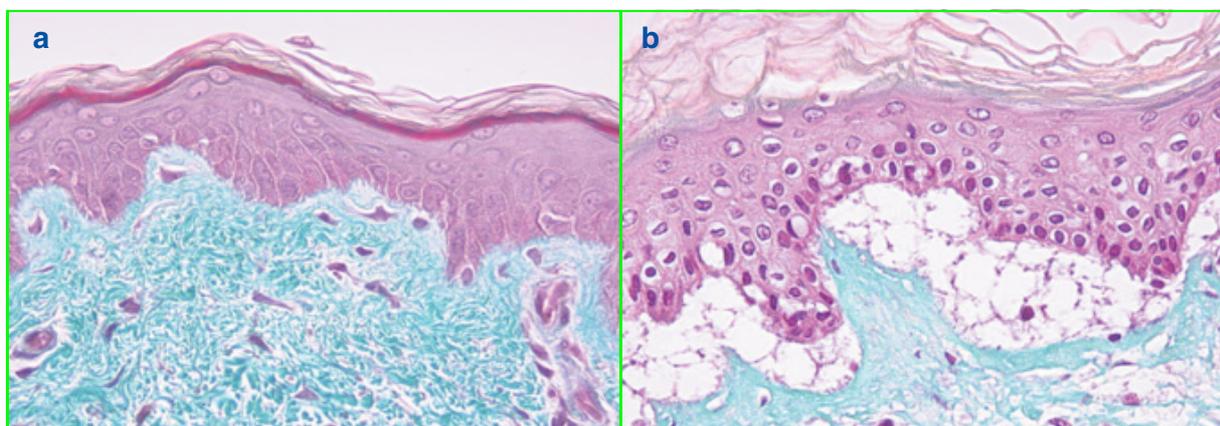


Figure 4 - (a) La structure épidermique est normale. Les noyaux des kératinocytes sont clairs, signe d'une bonne viabilité. L'épiderme est bien collé au derme. Les différentes cellules dermiques ont une bonne morphologie avec un noyau clair ; (b) Après 24 h avec un produit à tester, les noyaux des kératinocytes sont condensés et très foncés, signe d'une mauvaise viabilité. L'épiderme est nettement décollé du derme. Les cellules dans le derme ont un noyau condensé et foncé. Le produit qui a été appliqué sur cet explant présente de très nets aspects d'intolérance et ne peut pas être accepté.

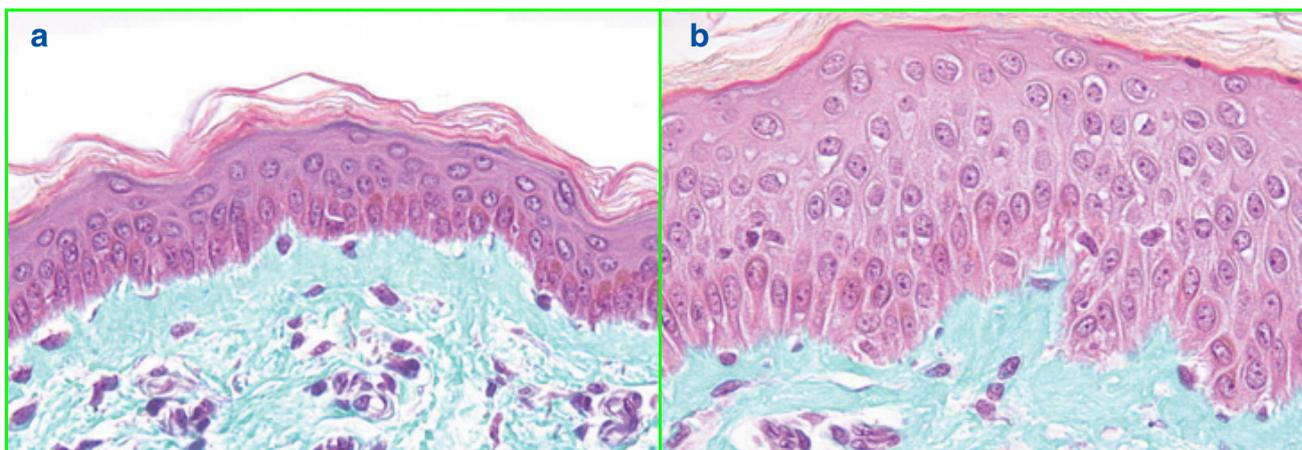


Figure 6 - (a) Au début de l'étude, la structure épidermique est mince et montre 4 à 5 assises cellulaires ; (b) Après 6 jours d'application d'actif, la structure épidermique est épaisse et montre jusqu'à 7 à 8 assises cellulaires. Le produit appliqué montre une nette activité restructurante épidermique, correspondant à un aspect de peau plus jeune.

recherchés sur la lésion. Ils proviennent alors de kératinocytes ayant subsisté après l'irradiation ou ayant migré à partir des annexes cutanées. Les réactions de cicatrisation précoces seront recherchées après immunomarquage de la fibronectine* dans le derme papillaire. En effet, dans la cicatrisation *in vivo*, la fibronectine va servir de guide pour la migration des fibroblastes qui vont restructurer le derme altéré. Sur ce modèle, la fibronectine surexprimée sera visualisée après 2 à 3 jours de survie sous la zone irradiée. Elle aura fortement diminué après 6 à 7 jours de survie. C'est un marqueur précoce de l'activité cicatrisante. À la fin de la survie, des immunomarquages spécifiques permettront d'évaluer l'activité du produit testé sur l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, la laminine-5 et sur la restructuration de la vascularisation dermique. L'activité cicatrisante sera validée sur ce modèle par la présence d'un bourgeon de néo-kératinocytes bien développé, par une nette surexpression de la fibronectine et par une nette restructuration des composants de la JDE.

Sur un modèle d'épiderme reconstitué, seuls les paramètres épidermiques peuvent être évalués.

• D'autres activités

Ce modèle est aussi bien adapté à l'étude de l'hydratation du *stratum corneum* après altération mécanique ou chimique de celui-ci, de l'activité lipolytique sur adipocytes, de la pigmentation/dépigmentation, de la protection cellulaire solaire, de la réponse au stress oxydatif, du vieillissement dermique ou de l'immunoprotection. Des études très spécifiques sont possibles comme la stimulation des cheveux sur explants de cheveux microdisséqués ou l'inhibition de la croissance des poils sur explants issus d'une plastrie poilue.

Les modèles de peau reconstituée commercialisés sont d'un coût relativement élevé par rapport au matériel histologique fourni. La peau humaine utilisée est un déchet opératoire. L'oreille de cochon est peu utilisée et pose des problèmes quant à la revendication (cosmétique et animal).

Conclusion

Le modèle de la peau en survie est le meilleur pour étudier l'activité et la tolérance des produits cosmétiques. Il est très

intéressant parce qu'il contient toutes les cellules de la peau normale. Il n'y a pas de cellules cultivées et rajoutées qui ont plus ou moins changé de phénotype*. L'utilisation de peau humaine en survie permet de choisir l'âge et le phototype* du sujet sur lequel on veut réaliser l'étude. L'absence de circulation sanguine et lymphatique potentialise l'effet des actifs permettant de mettre en évidence en 10 jours des activités obtenues en quelques semaines dans les études *in vivo*. La taille des explants (environ 10 mm) procure un matériel histologique conséquent permettant de mettre en œuvre plusieurs modes de fixation et d'observation. Les résultats obtenus sont bien reproductibles. Les activités sont observées dans tous les compartiments cutanés aussi bien en microscopie photonique qu'en microscopie électronique.

L'avenir de ce modèle est prometteur. Il peut être soumis à d'autres types de stress comparables à ceux que l'organisme humain reçoit régulièrement. L'évaluation d'actifs de plus en plus performants sera possible grâce à des techniques histologiques de plus en plus fines.

Référence et sources

- [1] Prunieras M., Regnier M., Schlotterer M., New procedure for culturing human epidermal cells on allogenic or xenogenic skin: preparation of recombined grafts, *Ann Chir Plast.*, **1979**, 24(4), p. 357.
- Caroline Clusel et Daniel Herbage, Institut de biologie et chimie des protéines, UMR 5086 CNRS et UCB Lyon 1.
 - R. Vives, Interactions protéines/glycosaminoglycannes. Des outils pour déchiffrer le code, 6^e Colloque francophone thématique de biologie cutanée humaine, Lyon **2006**.
 - G. Kaya, Hyaluronate, rétinolides et vieillissement cutané, 6^e Colloque francophone thématique de biologie cutanée humaine, Lyon **2006**.
 - M.J. Staquet, Intégrines et ligands de la jonction dermo-épidermique, Cours de biologie de la peau, Lyon **1991**.



P. Gasser

Philippe Gasser est Directeur technique et **Dorothee Bouzoud** est responsable qualité au Laboratoire BIO-EC*.



D. Bouzoud

* Laboratoire BIO-EC, 1 chemin de Saulxier 91165 Longjumeau.
Courriels : p.gasser@bio-ec.fr
d.bouzoud@bio-ec.fr