

Exopolysaccharides de bactéries lactiques


Marie-Rose Van Calsteren



Agriculture et
Agroalimentaire Canada

Agriculture and
Agri-Food Canada

*Centre de recherche et de développement sur les aliments
Food Research and Development Centre*



Polysaccharides dans l'industrie alimentaire

■ Origine

- plantes (cellulose, pectine, amidon)
- algues (agar-agar, alginate, carraghénine)
- bactéries (alginate, gomme Gellan, gomme xanthane)

■ Utilisation

- émulsifs, agents gélatinisants, stabilisants ou épaississants
 - Loi des aliments et drogues, Additifs alimentaires, Tableau IV



Produits laitiers fermentés

■ La variété est fonction de :

- lait
- ferment bactérien
- additifs
- procédé

■ Demandes du consommateur

- faible en sucre
- faible ou allégé en gras
- texture lisse et crémeuse
- quantité minimale d'additifs alimentaires

■ Types

- yogourt
- fromage
- kéfir

■ Additifs dans le yogourt

- Canada
 - amidon (modifié)
 - pectine
 - alginate
 - gélatine
- Europe
 - stabilisants d'origine végétale ou animale défendus
 - EPS de bactéries lactiques



Diversité des hétéropolysaccharides

■ Structure primaire

- nombre de résidus
- identité des résidus : hexoses, dérivés désoxy, dérivés amino, dérivés uroniques, pentoses, polyols, etc.
- configuration absolue : D ou L
- configuration anomérique : α ou β
- forme cyclique : pyranose ou furanose
- liens glycosidiques
- substituants

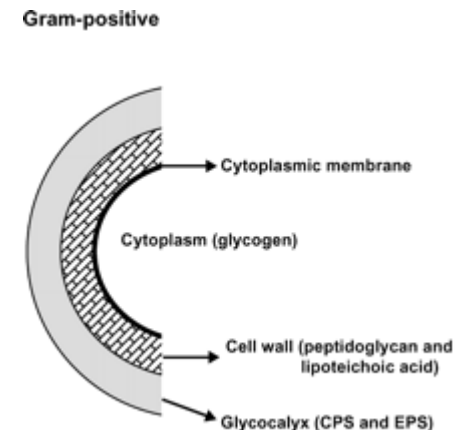
■ Masse moléculaire

■ Conformation

■ Relations structure-propriétés

Biosynthèse des EPS

- Activation des sucres
- Polymérisation de l'unité répétitive
 - glycosyltransférases
 - première
- Translocation
- Polymérisation de l'EPS
- Détermination de la longueur de chaîne





Méthodes de détermination de structure

- Isoler et purifier le polysaccharide
- Déterminer la composition des résidus glycosidiques
- Déterminer la configuration absolue de chaque résidu
- Déterminer les positions des liens glycosidiques
- Déterminer la configuration anomérique de chaque résidu
- Déterminer la forme cyclique de chaque résidu
- Déterminer la séquence
- Déterminer les points d'attachement des substituants
- Déterminer la structure secondaire



Culture bactérienne

■ Optimisation

- source de carbone
- source d'azote
- température
- pH
- oxygène
- agitation

Production et purification

■ Milieu défini

- souche congelée
- préculture
- culture en fermenteur
 - avec contrôle de pH, avec agitation
- chauffage
- centrifugation
 - éliminer cellules
- ultrafiltration
- précipitation
 - éthanol
- centrifugation
 - conserver culot
- dialyse
- précipitation
 - TCA
- centrifugation
 - conserver surnageant
- dialyse
- lyophilisation
- filtration sur gel

■ Lait

- souche congelée
- préculture
- culture en bouteille
 - sans contrôle de pH, sans agitation
- chauffage
- précipitation
 - TCA
- centrifugation
 - conserver surnageant
- précipitation
 - acétone
- centrifugation
 - conserver culot
- extraction
 - phénol/chloroforme/alcool isoamylique
- lavage
 - chloroforme/alcool isoamylique
- précipitation
 - acétone
- centrifugation
 - conserver culot
- dialyse
- lyophilisation
- filtration sur gel



Techniques de caractérisation structurale

- RMN à haute résolution 1D et 2D
 - ^1H , ^{13}C , ^{31}P
- Dérivations chimiques
- Chromatographie
 - TLC, GC, HPLC, GPC
- Spectrométrie de masse
- Analyse élémentaire (C, H, N, S et P)
- Modifications chimiques
- Polarimétrie
- Diffusion de la lumière
- Modélisation moléculaire



Détection des carbohydrates

- Dosage général pour les carbohydrates
 - dosage au phénol/acide sulfurique
 - échantillon + phénol 5% + acide sulfurique, absorbance à 490 nm (Dubois et al., 1956)

- Autres
 - détection électrochimique (bonne sensibilité)
 - réfractomètre (sensibilité faible)
 - dérivation : UV ou fluorescence

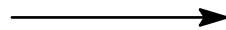
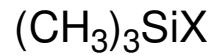
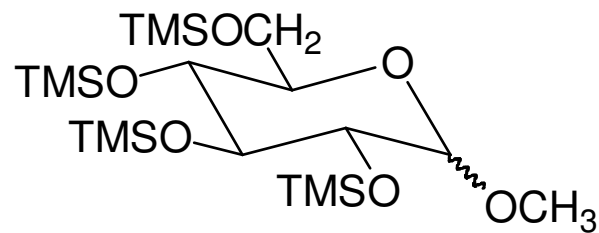
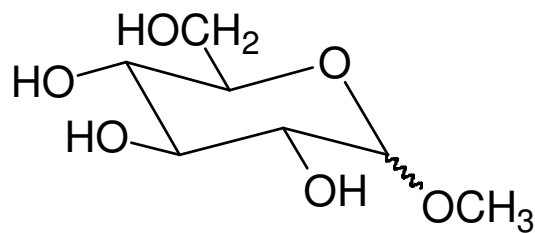


Composition des résidus glycosidiques

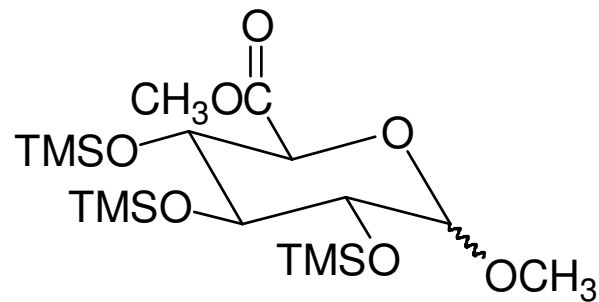
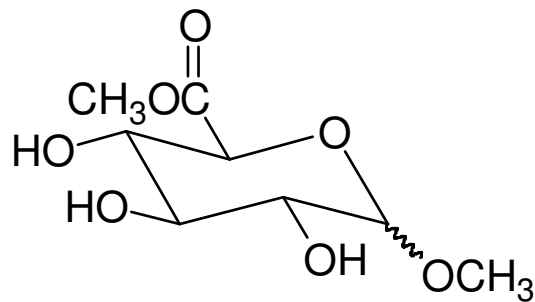
■ Étapes

1. Couper les liens glycosidiques
 - hydrolyse
 - méthanolyse
2. Séparer les monosaccharides
 - échange d'ions (HPAEC)
 - préparation des glycosides de méthyle triméthylsilylés et GC
 - préparation des acétates d'alditols et GC
 - électrophorèse (FACE)

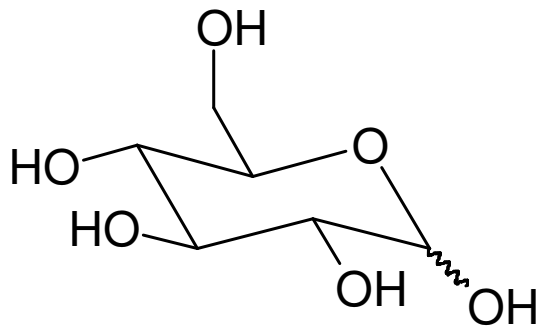
Glycosides de méthyle triméthylsilylés



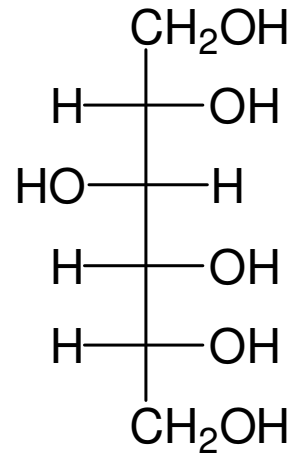
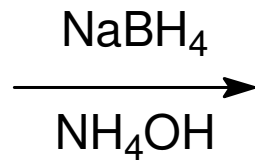
+ formes furanose



Acétates d'alditols

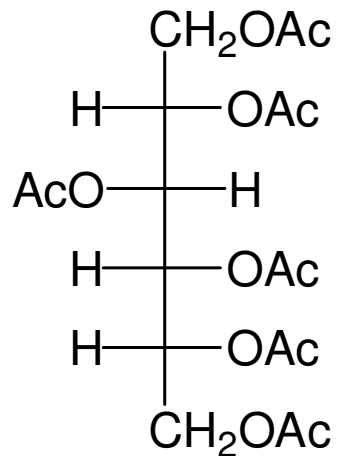
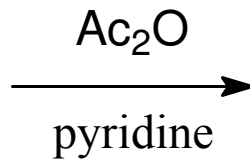


glucose
monosaccharide hydrolysé



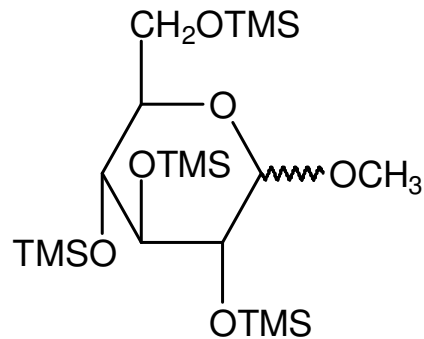
glucitol
monosaccharide réduit

borate éliminé avec
méthanol/acide acétique

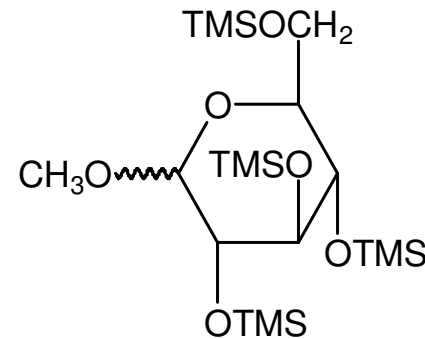


acétate d'alditol volatil

Stéréochimie des résidus glycosidiques

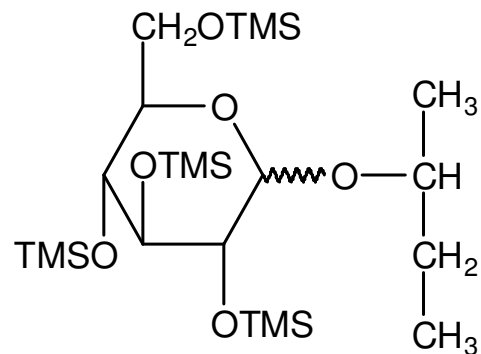


D-glucoside de méthyle

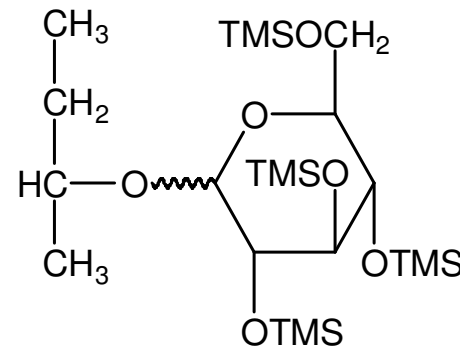


L-glucoside de méthyle

Énantiomères : propriétés physiques identiques, inséparables



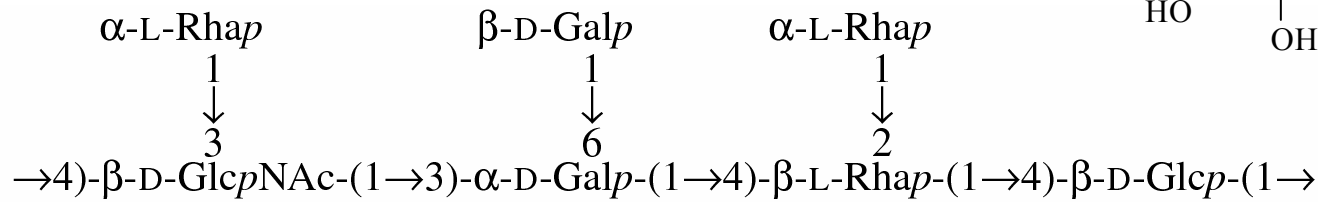
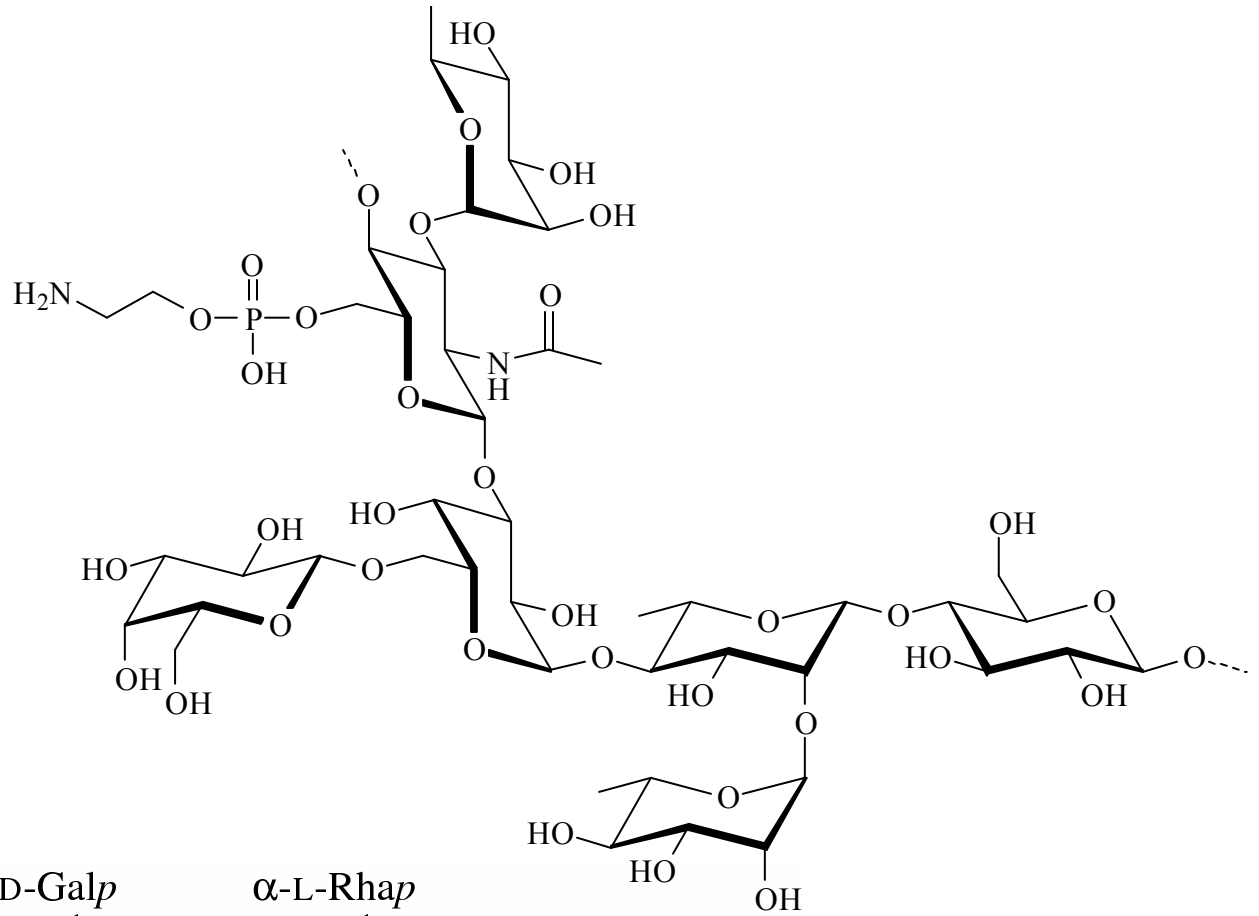
D-glucoside de (-)-2-butyle



L-glucoside de (-)-2-butyle

Diastéréoisomères : propriétés physiques différentes, séparables

Lactobacillus helveticus





Composition

■ Analyse élémentaire

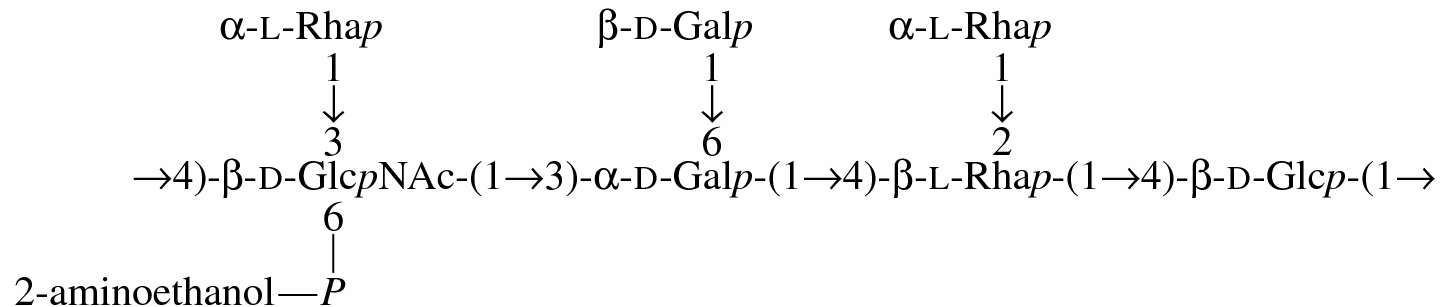
□ présence de

- N : sucres aminés
- S : sulfates
- P : phosphates

Les polysaccharides sont très hygroscopiques :
prévoir $n \text{ H}_2\text{O}$ dans la formule brute

■ RMN du ^{31}P

Composition en sucres



Première étape : dépolymérisation

hydrolyse : TFA

D-Gal : 2
 D-Glc : 1
 D-GlcN : 1
 L-Rha : 3

méthanolyse : HCl/MeOH

D-Gal-*O*-Me : 2
 D-Glc-*O*-Me : 1
 D-GlcNAc-*O*-Me : 1
 L-Rha-*O*-Me : 3



TLC

hydrolyse : HCl 2 N, 100°C (pression atmosphérique), 2 h

D-Gal
D-Glc
D-GlcN
L-Rha

support : plaque 20 × 20 cm gel de silice 60 F₂₅₄ de Merck
solvant : chloroforme/acide acétique/eau 44:47:3
migration : 3 passages

avantage : rapide

désavantages : non quantitatif, faible résolution

Glycosides de méthyle peracétylés

D-Gal-*O*-Me : 2
D-Glc-*O*-Me : 1
D-GlcNAc-*O*-Me : 1
L-Rha-*O*-Me : 3

acétylation : Ac₂O/pyridine

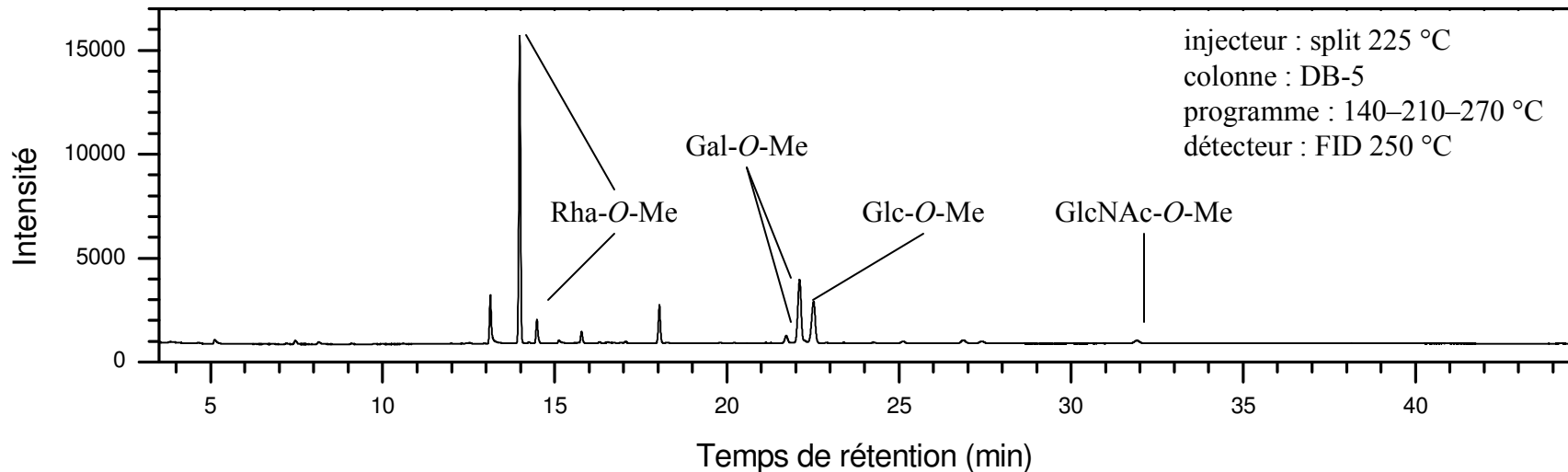
2,3,4,6+2,3,5,6-tétra-*O*-Ac-D-Gal-*O*-Me : 2
2,3,4,6+2,3,5,6-tétra-*O*-Ac-D-Glc-*O*-Me : 1
3,4,6+3,5,6-tri-*O*-Ac-D-GlcNAc-*O*-Me : 1
2,3,4+2,3,5-tri-*O*-Ac-L-Rha-*O*-Me : 3

GC (EI-MS, CI-MS)

GC

Glycosides de méthyle peracétylés

2,3,4,6+2,3,5,6-tétra-*O*-Ac-D-Gal-*O*-Me : 2
2,3,4,6+2,3,5,6-tétra-*O*-Ac-D-Glc-*O*-Me : 1
3,4,6+3,5,6-tri-*O*-Ac-D-GlcNAc-*O*-Me : 1
2,3,4+2,3,5-tri-*O*-Ac-L-Rha-*O*-Me : 3



avantages : méthode douce, bonne sensibilité, bonne résolution

désavantage : nombreux pics

Acétates d'alditols

D-Gal : 2
D-Glc : 1
D-GlcNAc : 1
L-Rha : 3

réduction : $\text{NaBH}_4/\text{NH}_4\text{OH}$

D-Gal-ol : 2
D-Glc-ol : 1
D-GlcNAc-ol : 1
L-Rha-ol : 3

acétylation : Ac_2O /pyridine

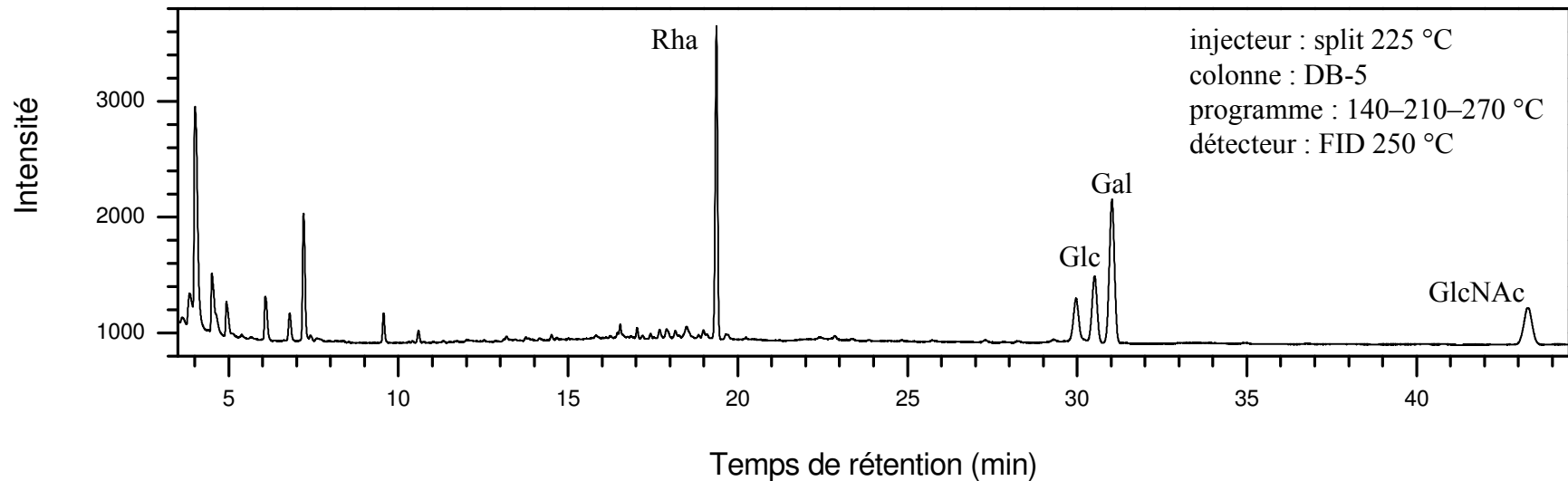
1,2,3,4,5,6-hexa-*O*-Ac-D-Gal-ol : 2
1,2,3,4,5,6-hexa-*O*-Ac-D-Glc-ol : 1
1,3,4,5,6-penta-*O*-Ac-D-GlcNAc-ol : 1
1,2,3,4,5-penta-*O*-Ac-L-Rha-ol : 3

GC (EI-MS, CI-MS)

GC

Acétates d'alditols

1,2,3,4,5,6-hexa-*O*-Ac-D-Gal-ol : 2
1,2,3,4,5,6-hexa-*O*-Ac-D-Glc-ol : 1
1,3,4,5,6-penta-*O*-Ac-D-GlcNAc-ol : 1
1,2,3,4,5-penta-*O*-Ac-L-Rha-ol : 3



avantages : peu de pics, bonne sensibilité, très bonne résolution
désavantage : laborieux

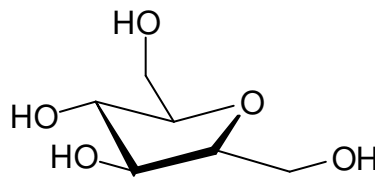
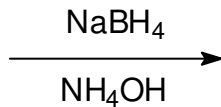
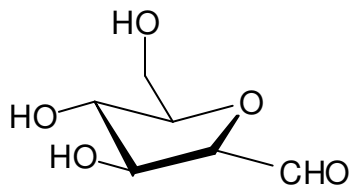
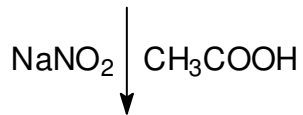
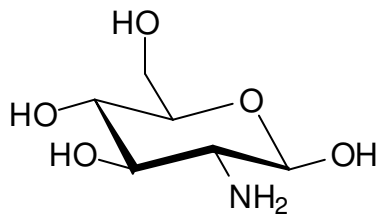
Acétates d'alditols désaminés

D-Gal : 2
D-Glc : 1
D-GlcN : 1
L-Rha : 3

désamination : $\text{NaNO}_2/\text{CH}_3\text{COOH}$

D-Gal : 2
D-Glc : 1
2,5-An-D-Man : 1
L-Rha : 3

réduction : $\text{NaBH}_4/\text{NH}_4\text{OH}$



D-Gal-ol : 2
D-Glc-ol : 1
2,5-An-D-Man-ol : 1
L-Rha-ol : 3

acétylation : $\text{Ac}_2\text{O}/\text{pyridine}$

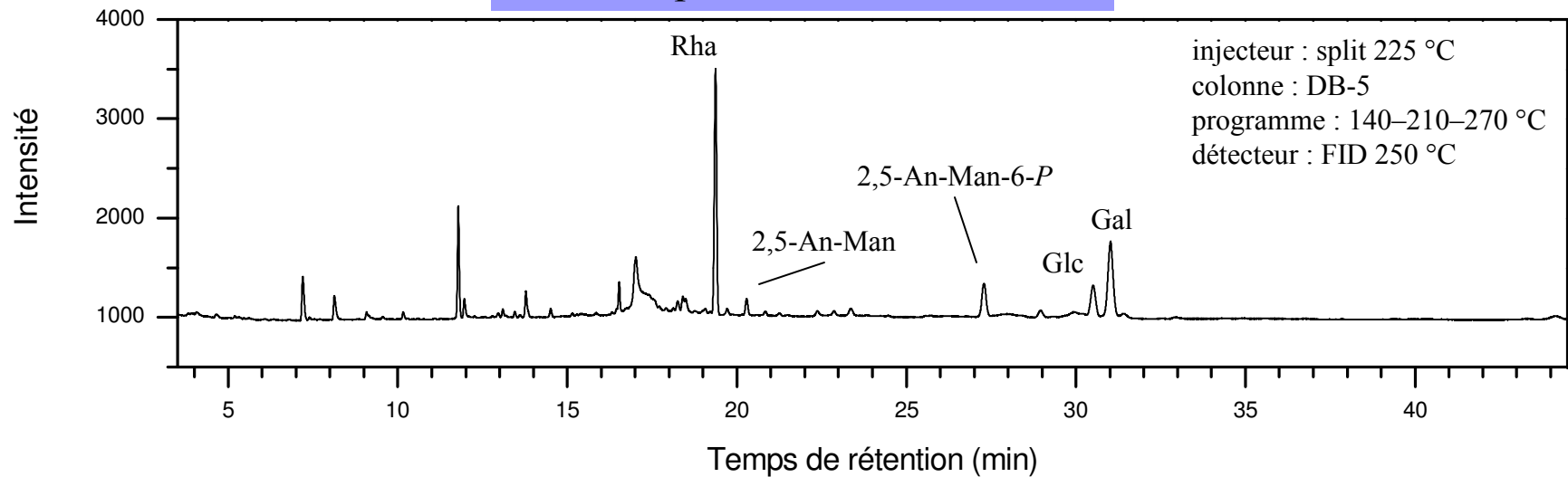
1,2,3,4,5,6-hexa-D-Gal-ol : 2
1,2,3,4,5,6-hexa-D-Glc-ol : 1
1,3,4,6-tetra-2,5-An-D-Man-ol : 1
1,2,3,4,5-penta-L-Rha-ol : 3

GC (EI-MS, CI-MS)

GC

Acétates d'alditols désaminés

1,2,3,4,5,6-hexa-D-Gal-ol : 2
1,2,3,4,5,6-hexa-D-Glc-ol : 1
1,3,4,6-tetra-2,5-An-D-Man-ol : 1
1,2,3,4,5-penta-L-Rha-ol : 3



Configuration absolue

D-Gal : 2
D-Glc : 1
D-GlcNAc : 1
L-Rha : 3

polarimétrie

avantage : simple

désavantage : peu sensible

dérivé chiral : (+) ou (-)-2-octanolyse

D-Gal-*O*-2-oct : 2
D-Glc-*O*-2-oct : 1
D-GlcNAc-*O*-2-oct : 1
L-Rha-*O*-2-oct : 3

acétylation : Ac₂O/pyridine

2,3,4,6+2,3,5,6-tétra-*O*-Ac-D-Gal-*O*-2-oct : 2
2,3,4,6+2,3,5,6-tétra-*O*-Ac-D-Glc-*O*-2-oct : 1
3,4,6+3,5,6-tetra-*O*-Ac-D-GlcNAc-*O*-2-oct : 1
2,3,4+2,3,5-tri-*O*-Ac-L-Rha-*O*-2-oct : 3

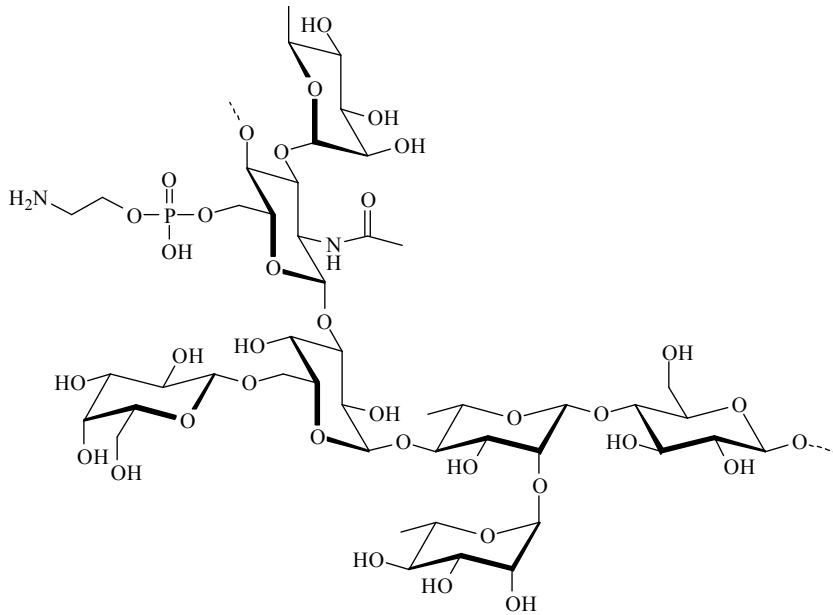
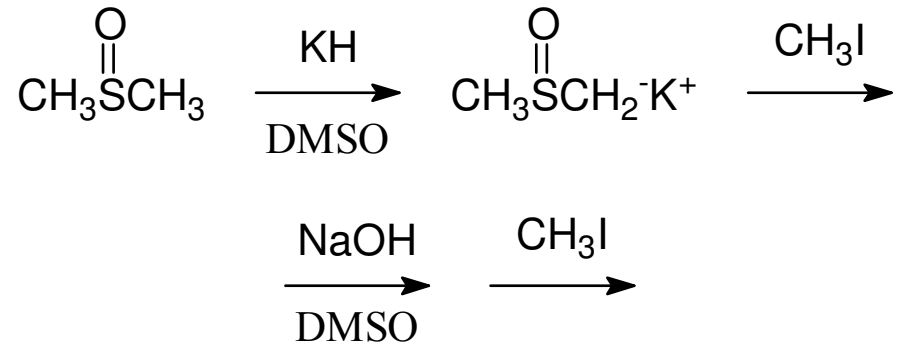
GC (EI-MS, CI-MS)

avantage : bonne sensibilité

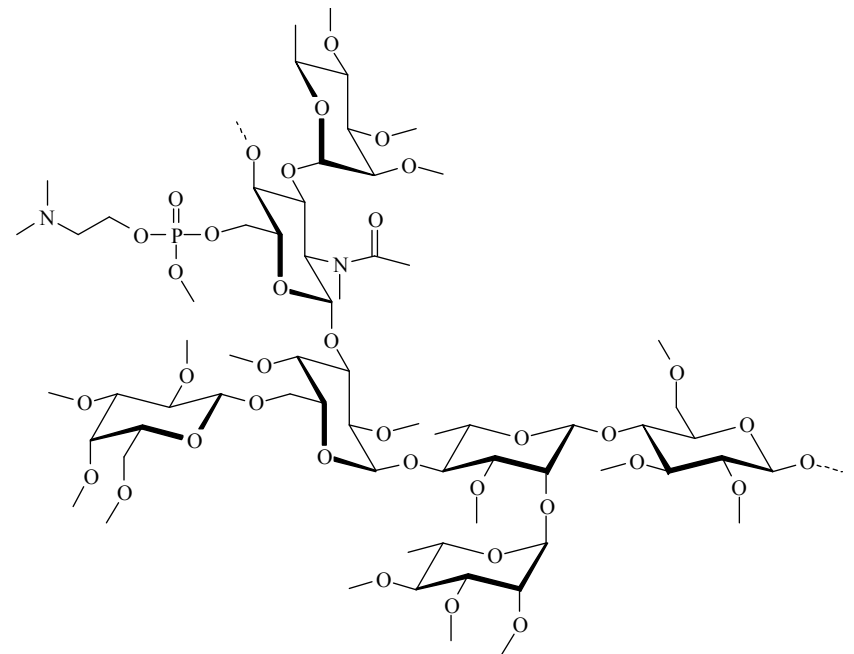
désavantage : laborieux, nombreux pics

Position des liens glycosidiques

Première étape : méthylation



Deuxième étape : *N*-acétylation



Acétates d'alditols partiellement méthylés

hydrolyse : TFA 2 M

2,3,4,6-tétra-*O*-Me-D-Gal
2,4-di-*O*-Me-D-Gal
2,3,6-tri-*O*-Me-D-Glc
2-*O*-Me-D-GlcNAc
2,3,4-tri-*O*-Me-D-Rha (2)
3-*O*-Me-D-Rha

réduction : NaBH₄/NH₄OH

2,3,4,6-tétra-*O*-Me-D-Gal-ol
2,4-di-*O*-Me-D-Gal-ol
2,3,6-tri-*O*-Me-D-Glc-ol
2-*O*-Me-D-GlcNAc-ol
2,3,4-tri-*O*-Me-D-Rha-ol (2)
3-*O*-Me-D-Rha-ol

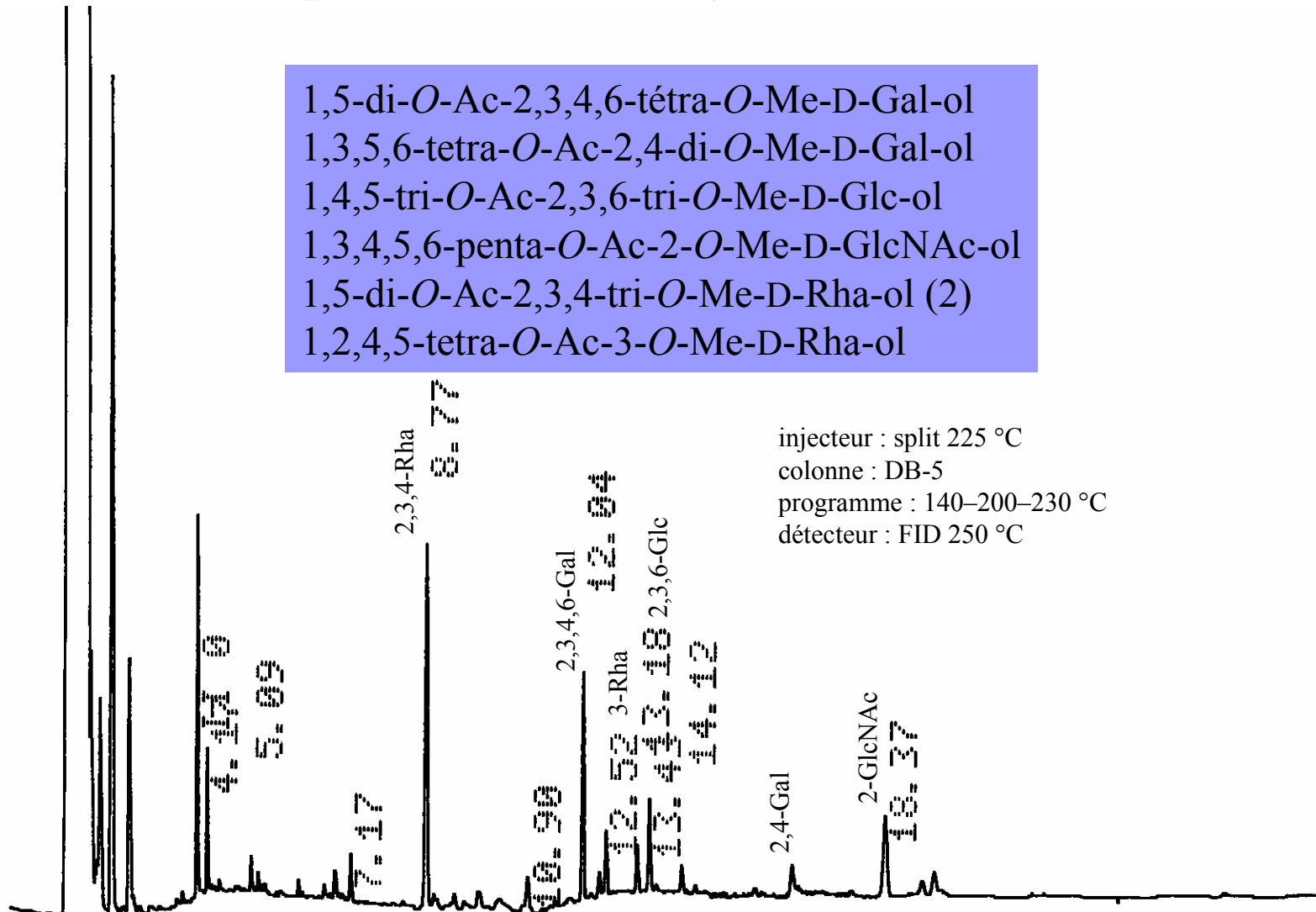
acétylation : Ac₂O/pyridine

1,5-di-*O*-Ac-2,3,4,6-tétra-*O*-Me-D-Gal-ol
1,3,5,6-tetra-*O*-Ac-2,4-di-*O*-Me-D-Gal-ol
1,4,5-tri-*O*-Ac-2,3,6-tri-*O*-Me-D-Glc-ol
1,3,4,5,6-penta-*O*-Ac-2-*O*-Me-D-GlcNAc-ol
1,5-di-*O*-Ac-2,3,4-tri-*O*-Me-D-Rha-ol (2)
1,2,4,5-tetra-*O*-Ac-3-*O*-Me-D-Rha-ol

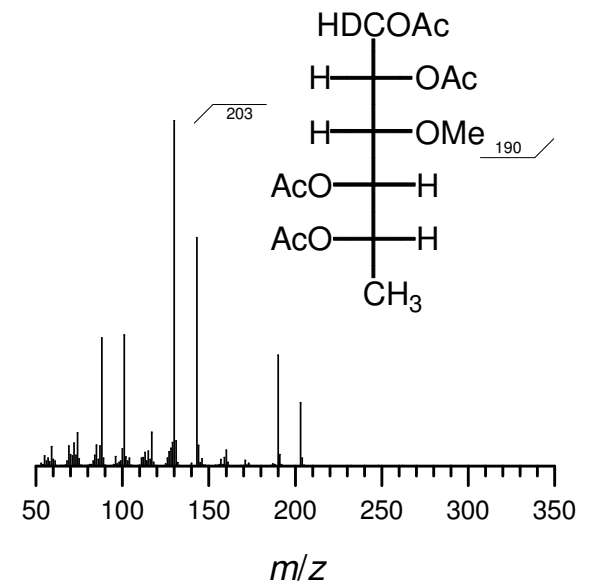
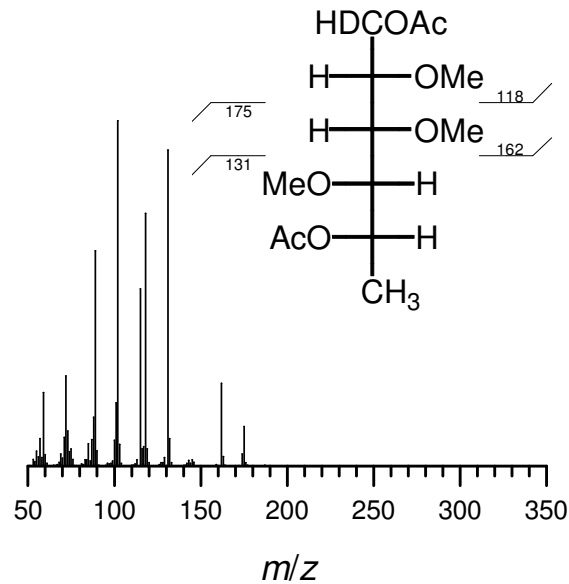
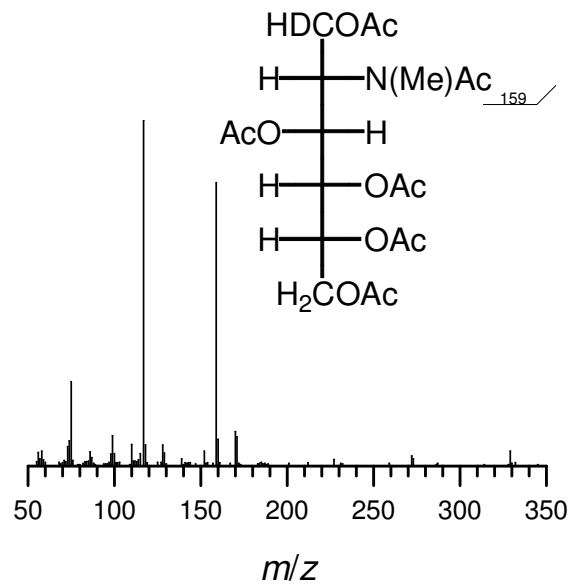
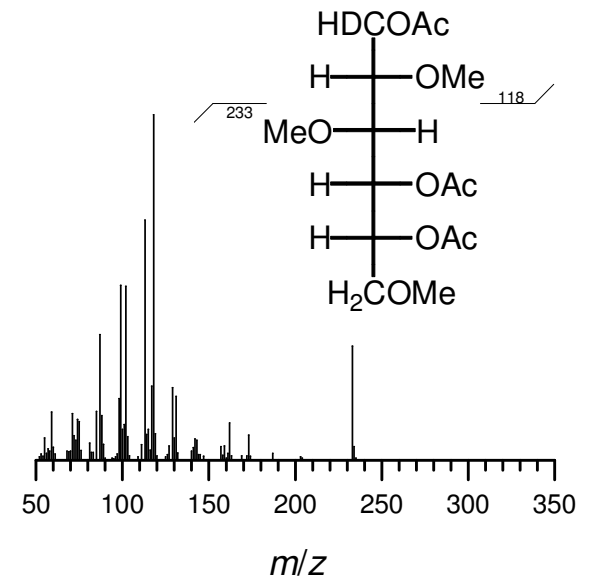
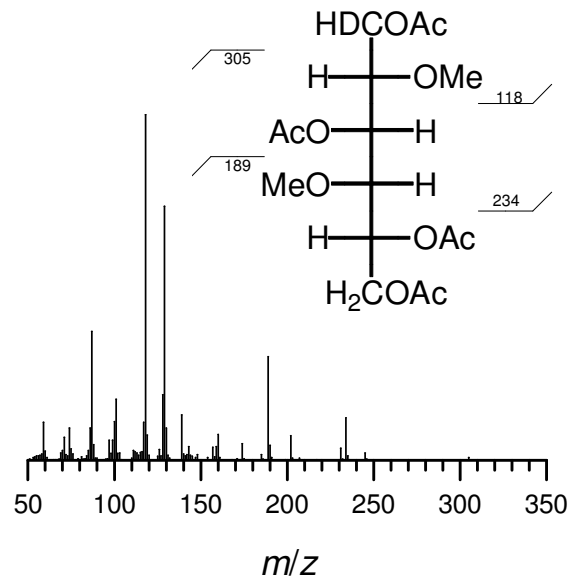
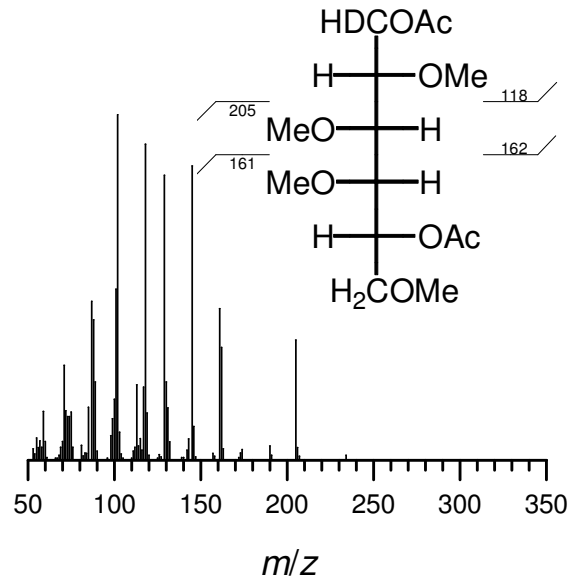
GC (EI-MS, CI-MS)

GC

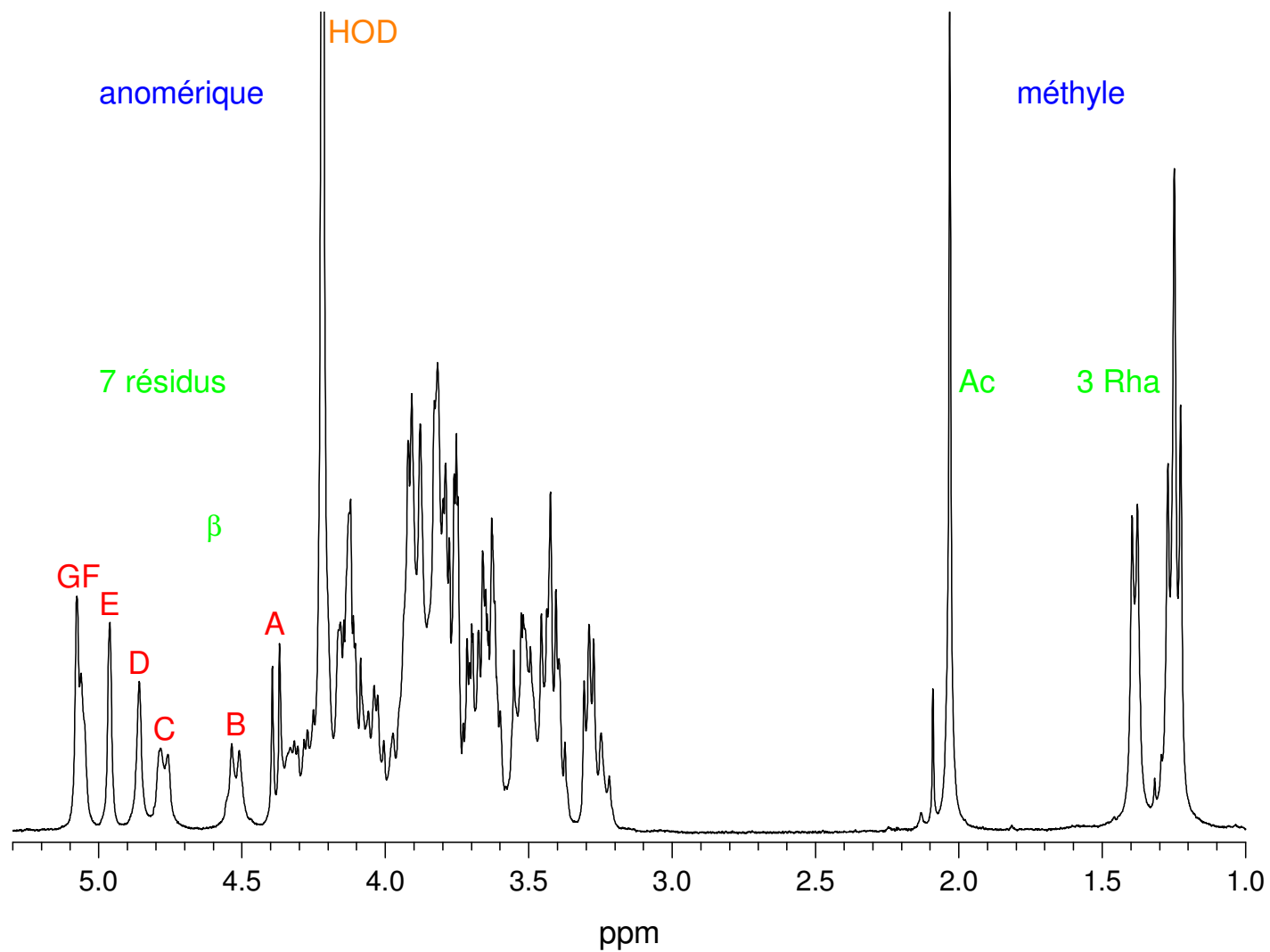
Acétates d'alditols partiellement méthylés



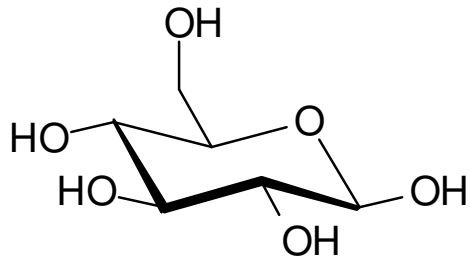
Spectres de masse



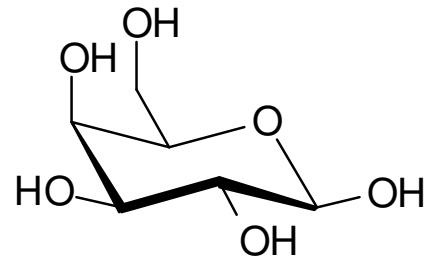
Spectre de RMN du ^1H 1D



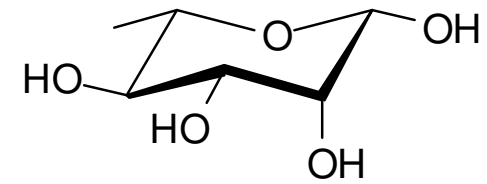
Configuration des sucres



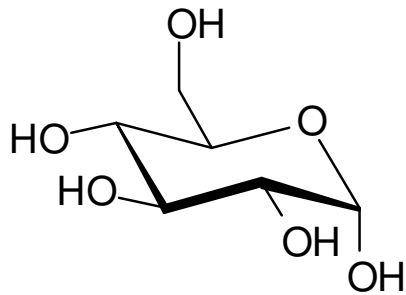
β -D-glucose



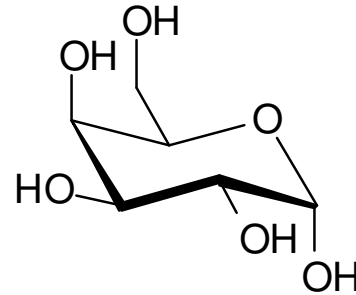
β -D-galactose



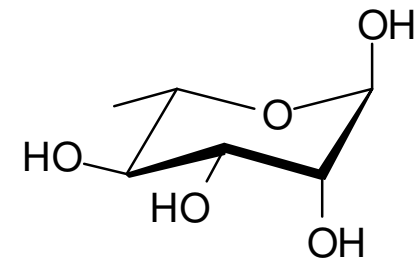
β -L-rhamnose



α -D-glucose



α -D-galactose



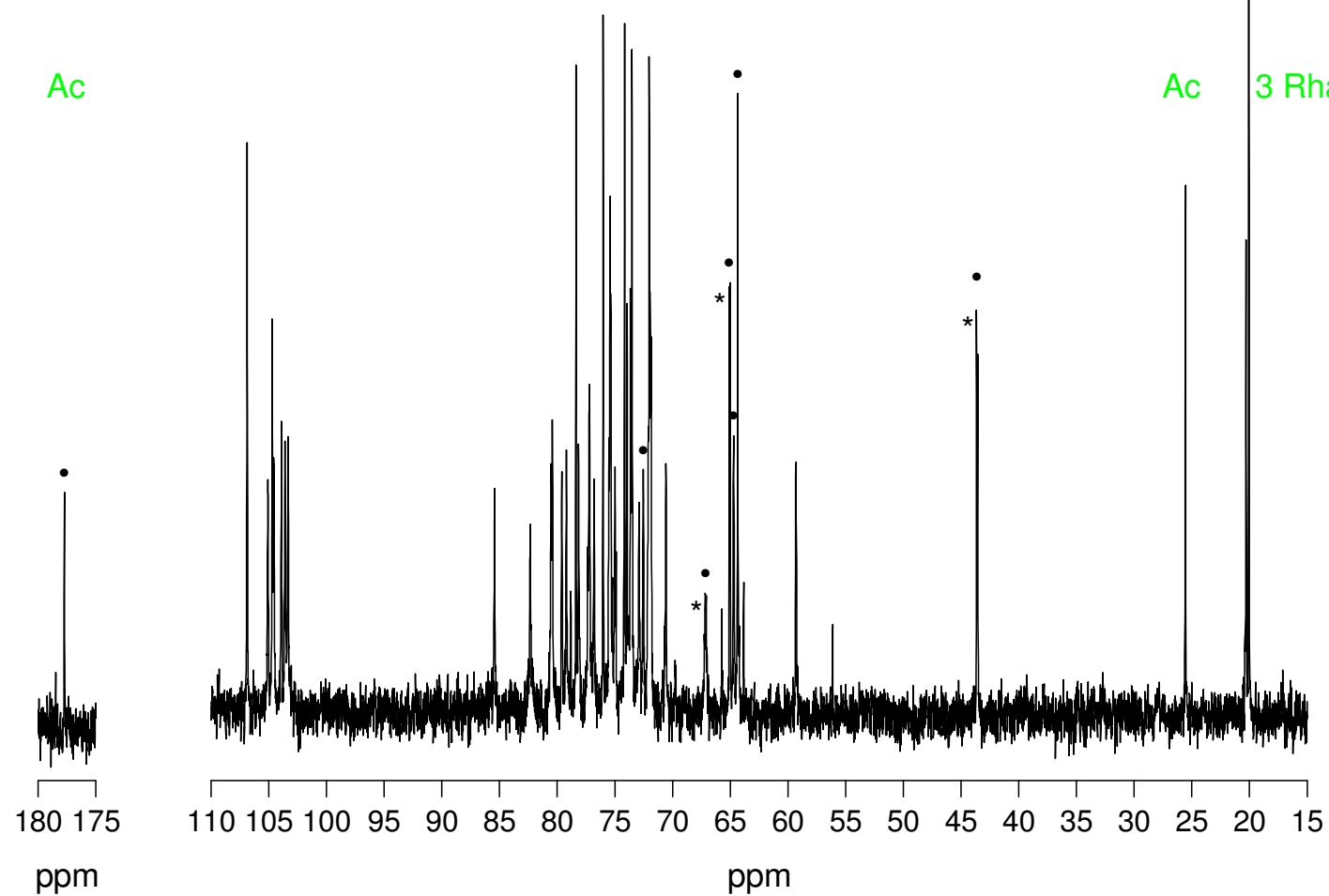
α -L-rhamnose

Spectre de RMN du ^{13}C 1D

carbonyle

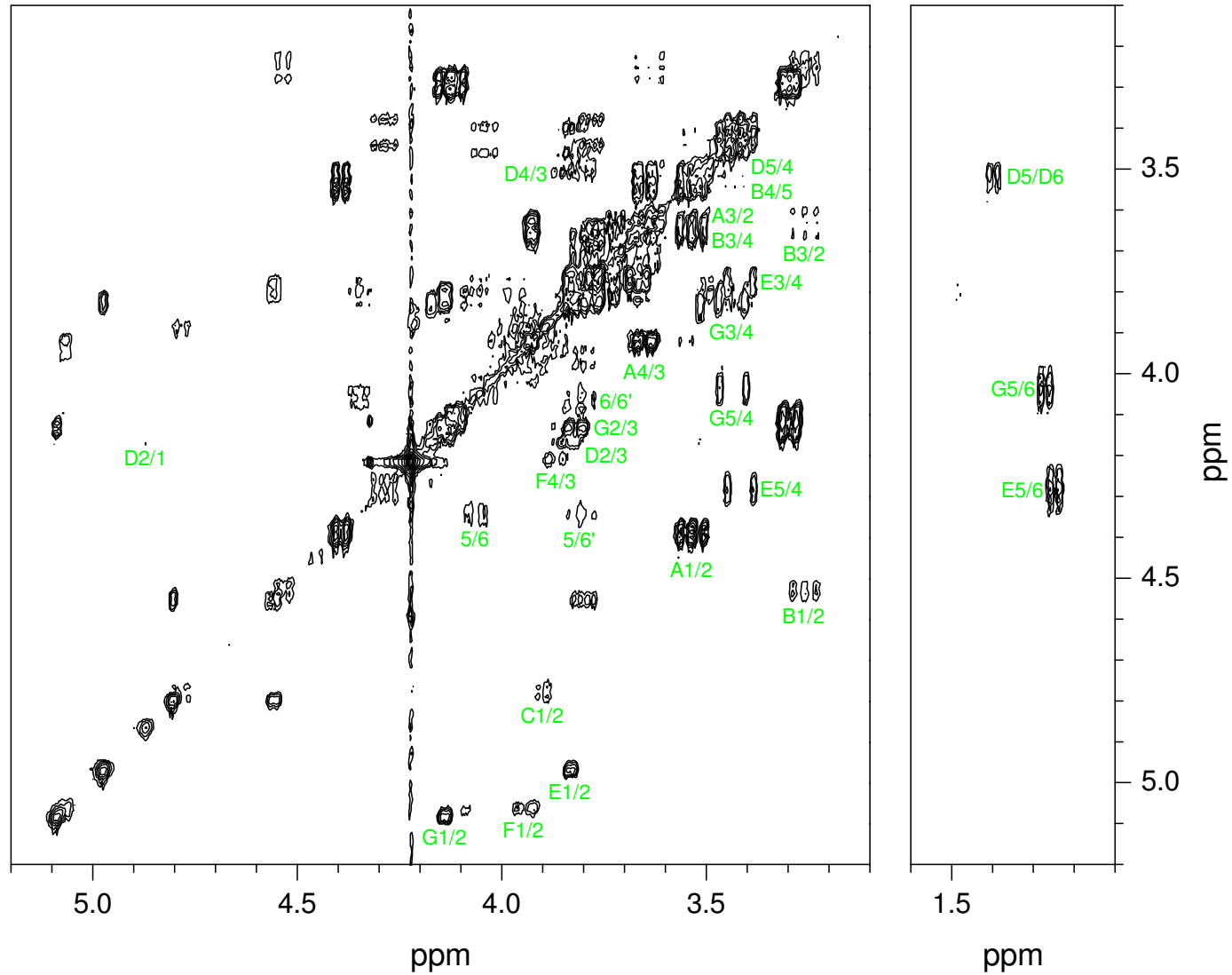
anomérique

méthyle



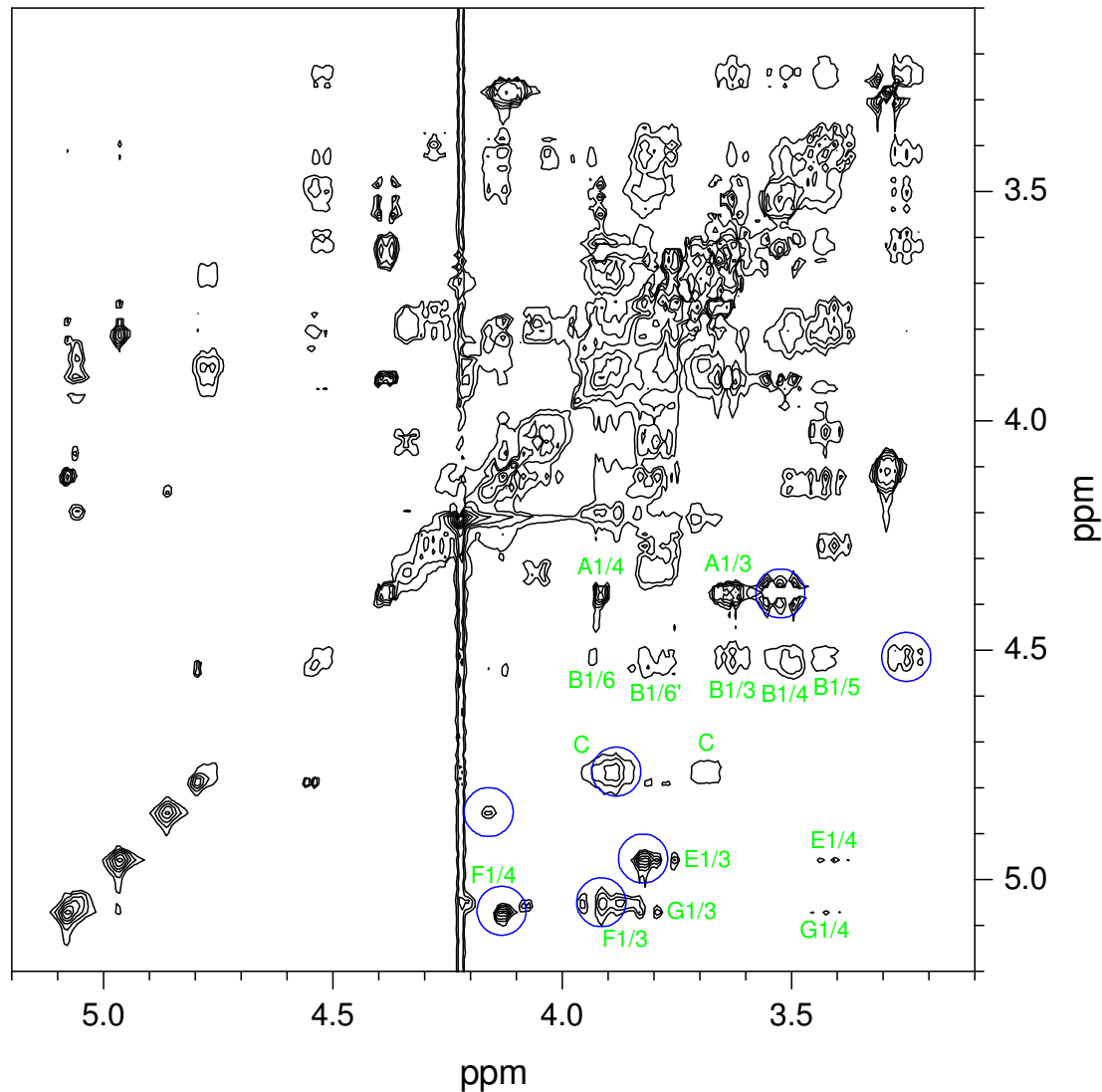
COSY 2D

corrélations entre protons couplés



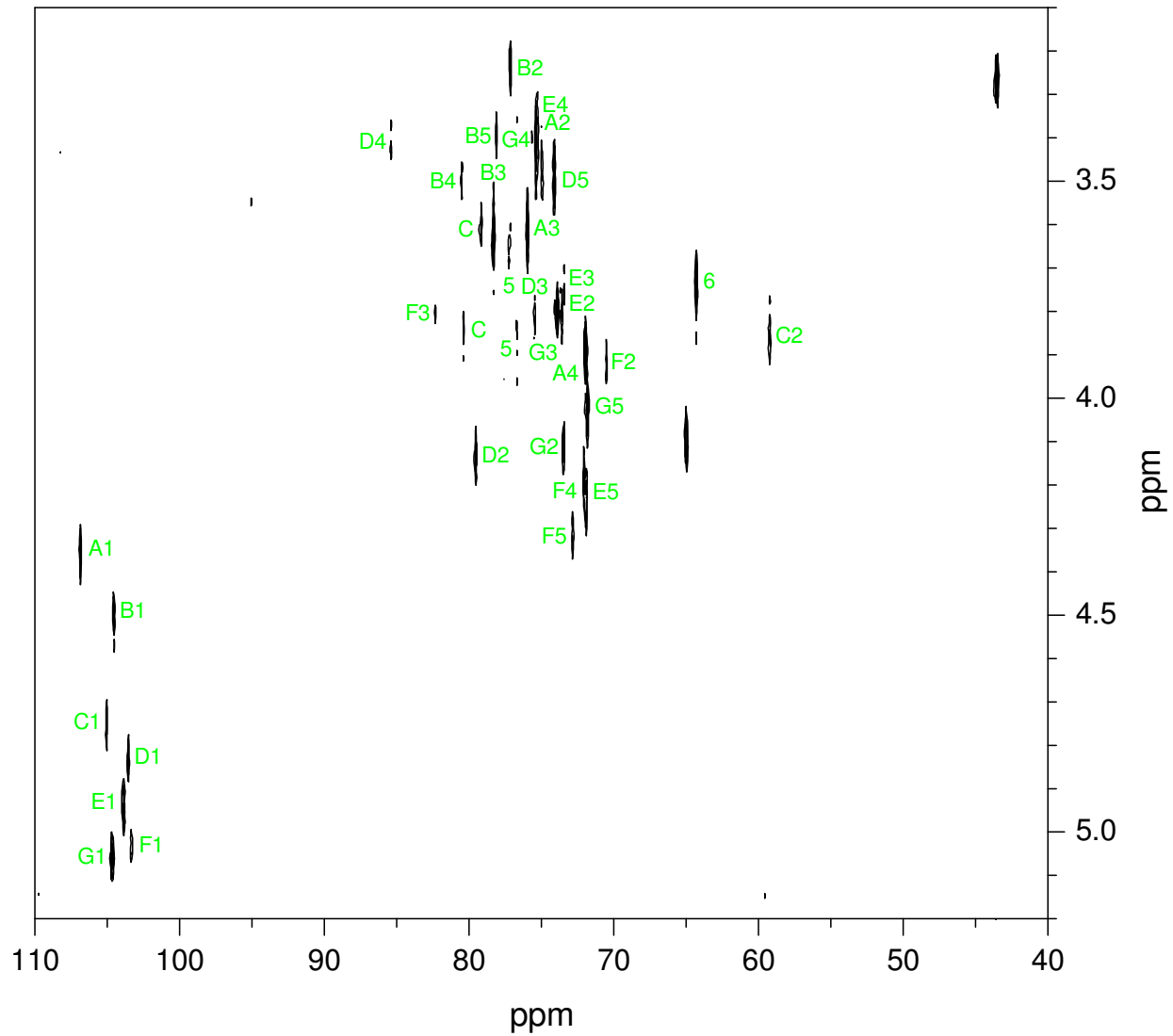
TOCSY 2D (temps de mélange : 125 ms)

corrélations proton-proton dans un même système de spins



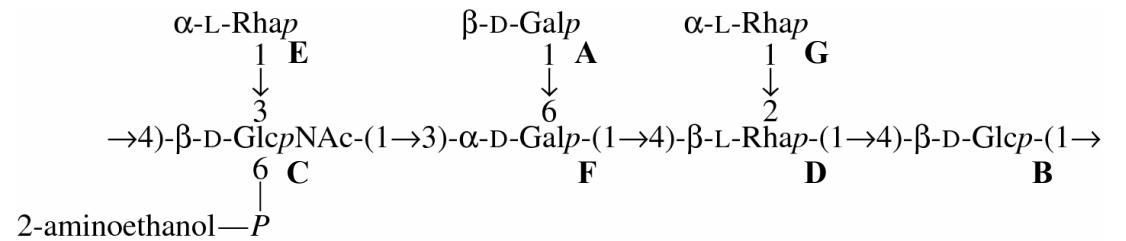
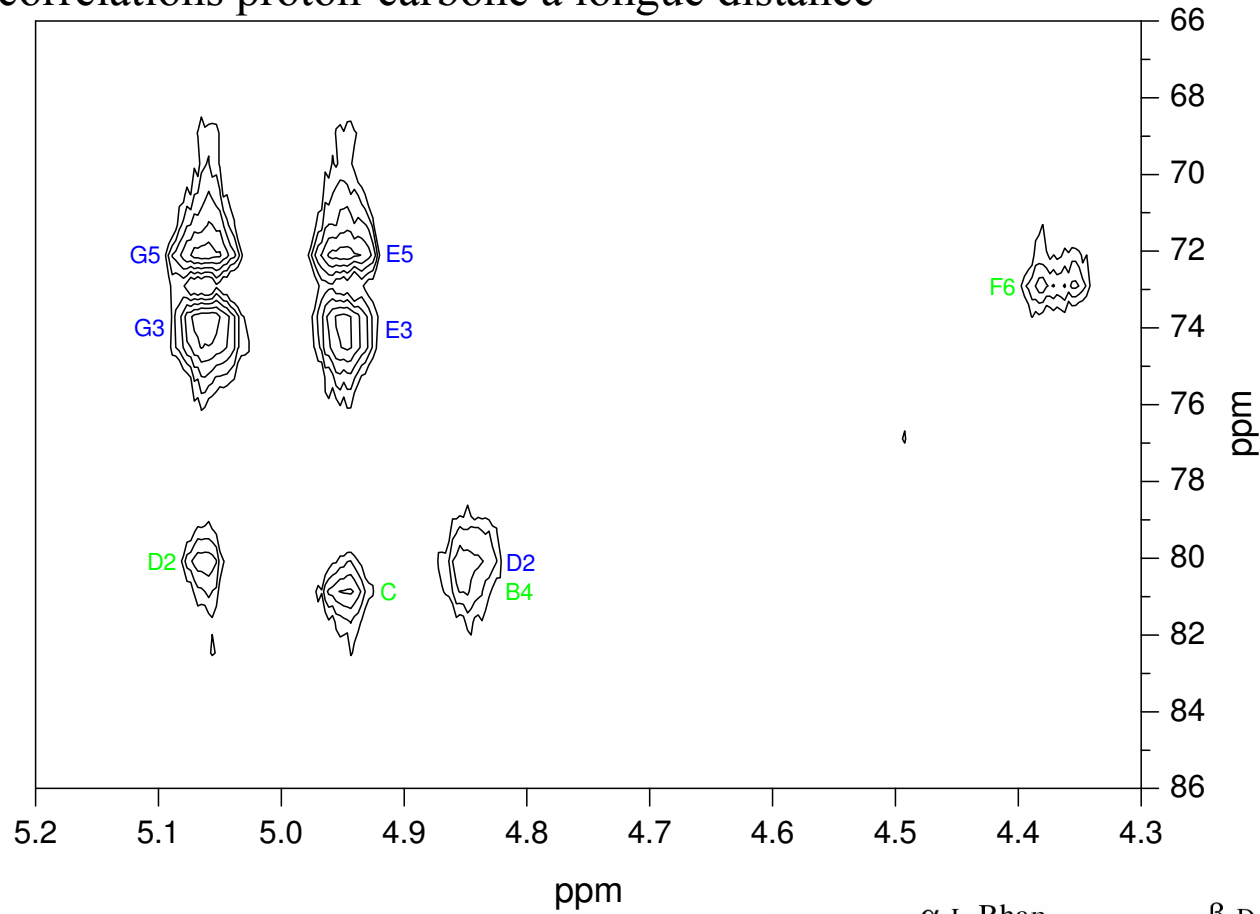
HETCOR 2D

corrélations carbone-proton



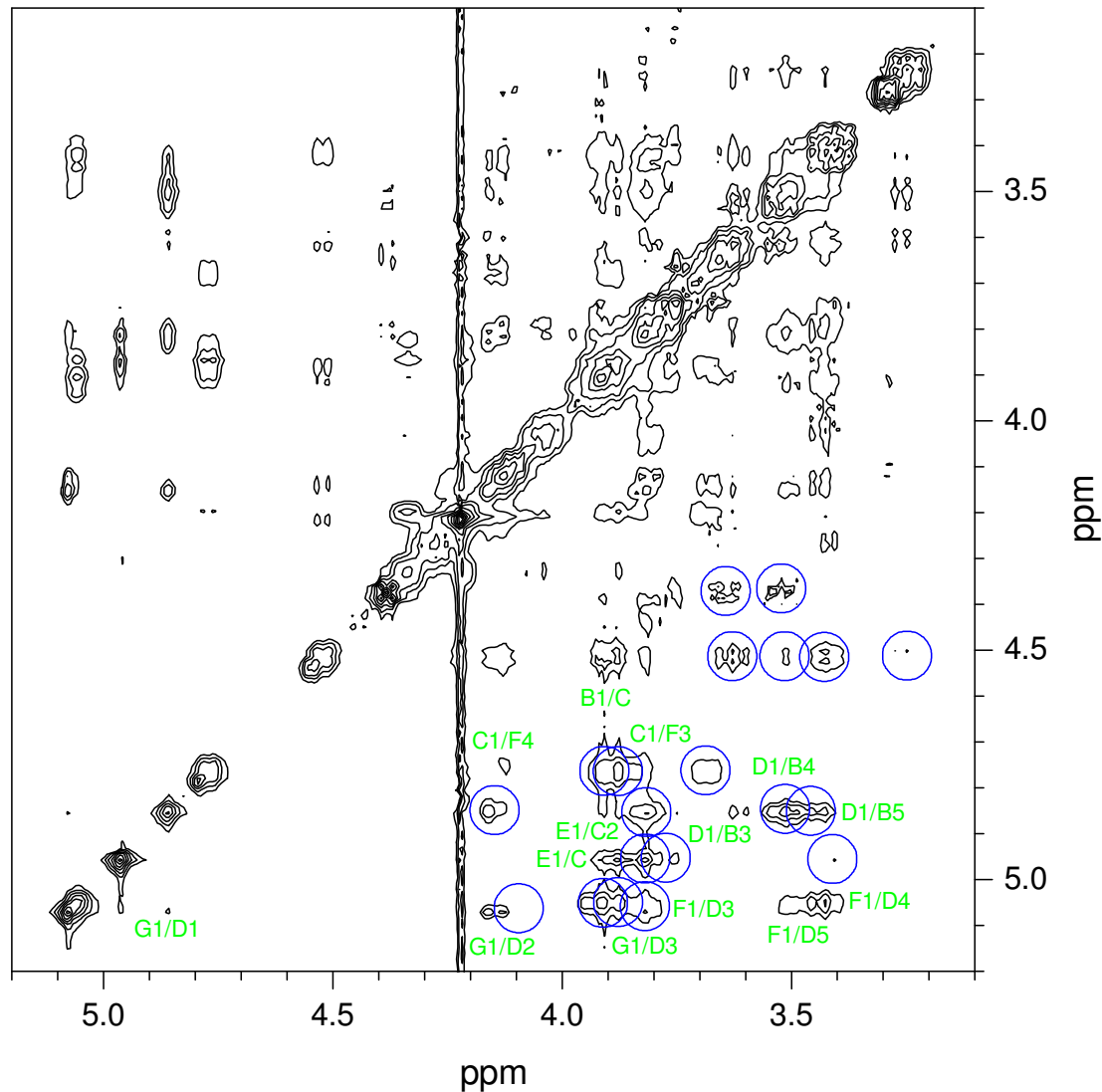
HMBC 2D

corrélations proton-carbone à longue distance



NOESY 2D (temps de mélange : 300 ms)

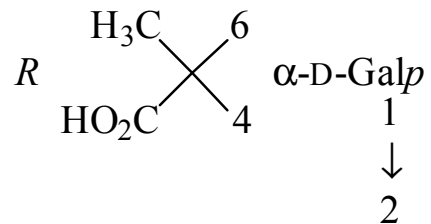
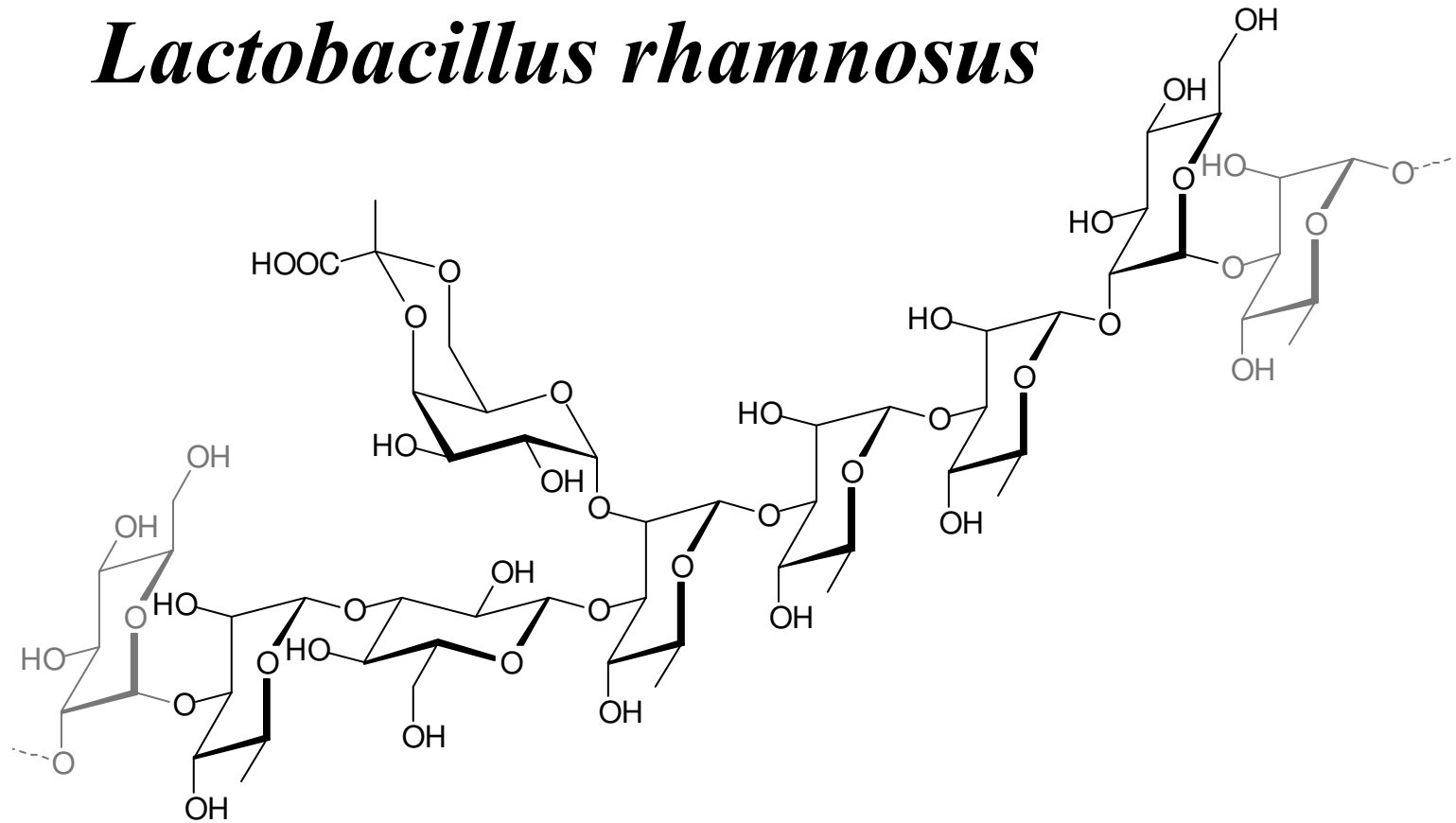
corrélations proton-proton dans l'espace



Diversité chez *Lactobacillus helveticus*

TY1-2	$ \begin{array}{c} (\alpha\text{-D-Galp})_{0,8} \\ \downarrow 1 \\ \downarrow 4 \\ \rightarrow 6\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow \\ \uparrow 6 \\ \beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp} \end{array} $	TN-4, Lh59
		$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp} \\ \downarrow 1 \\ \downarrow 3 \\ \rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 5)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow \end{array} $
	Yamamoto, Murosaki, Yamauchi, Kato, Sone (1994)	Yamamoto, Nunome, Yamauchi, Kato, Sone (1995); Stingele, Lemoine, Neeser (1997)
766	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp} \\ \downarrow 1 \\ \downarrow 3 \\ \rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow \end{array} $	2091
	Robijn, Thomas, Haas, van den Berg, Kamerling, Vliegthart (1995)	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp} \\ \downarrow 1 \\ \downarrow 6 \\ \rightarrow 6\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow \end{array} $
		Staaf, Widmalm, Yang, Huttunen (1996)
Lb161	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Glcp} \\ \downarrow 1 \\ \downarrow 3 \\ \rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow \end{array} $	K16
	Staaf, Yang, Huttunen, Widmalm (2000)	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp} \\ \downarrow 1 \\ \downarrow 4 \\ \beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Glcp} \\ \downarrow 1 \\ \downarrow 6 \\ \rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow \end{array} $
		Yang, Staaf, Huttunen, Widmalm (2000)
NCC2745	$ \begin{array}{c} \beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp} \\ \downarrow 1 \\ \downarrow 6 \\ \rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow \end{array} $	CNRZ 32
	Jolly, Newell, Porcelli, Vincent, Stingele (2002)	$ \begin{array}{c} \alpha\text{-L-Rhap} \\ \downarrow 1 \\ \downarrow 3 \\ \rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow \\ \downarrow 6 \\ 2\text{-aminoethanol}-P \end{array} $

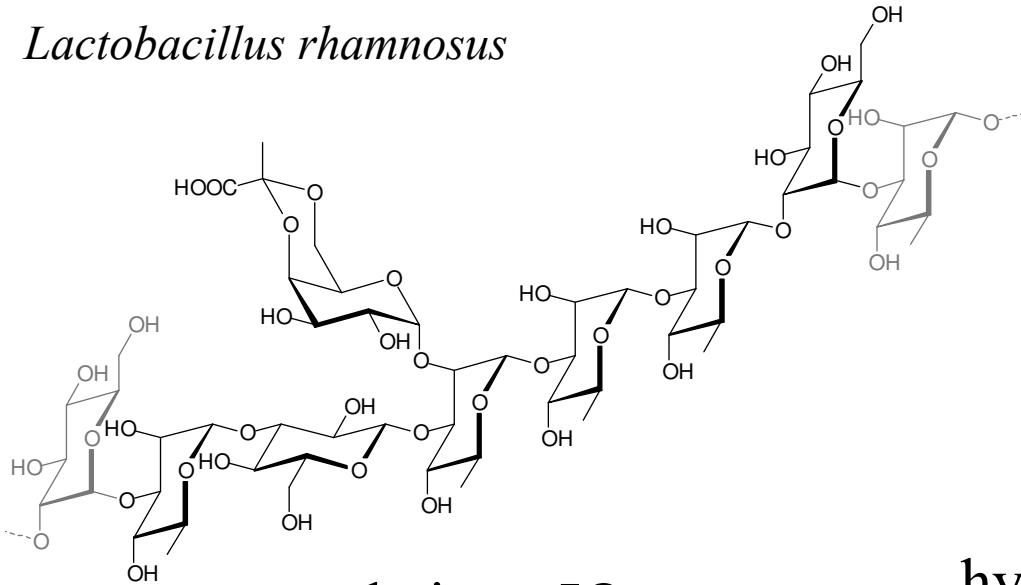
Lactobacillus rhamnosus



→3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-D-Glcp-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→2)-α-D-Glcp-(1→

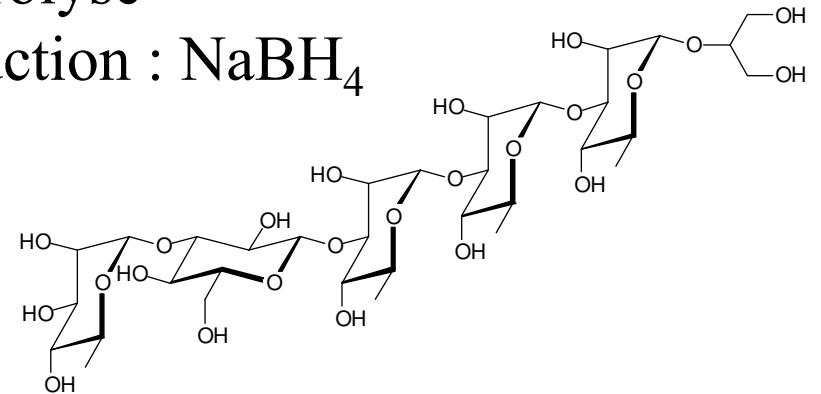
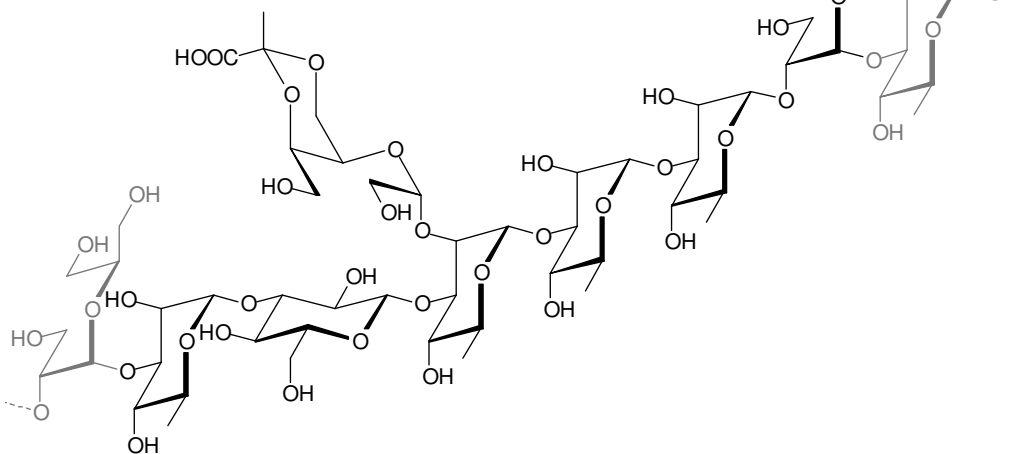
Modification chimique

Lactobacillus rhamnosus



oxydation : IO_4^-
réduction : NaBH_4

hydrolyse
réduction : NaBH_4

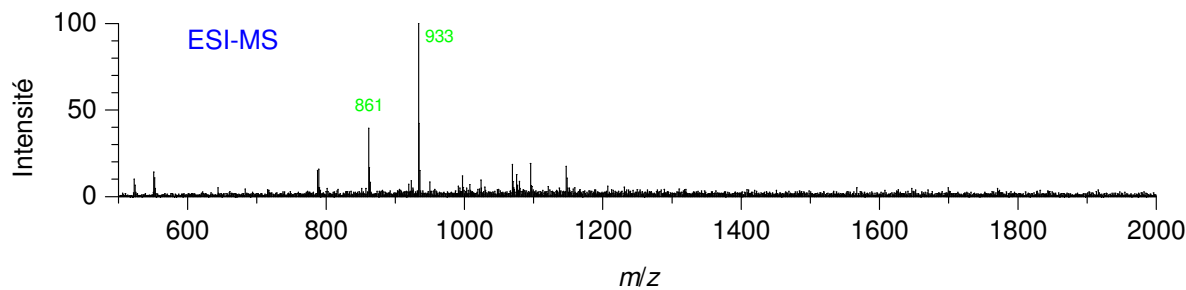
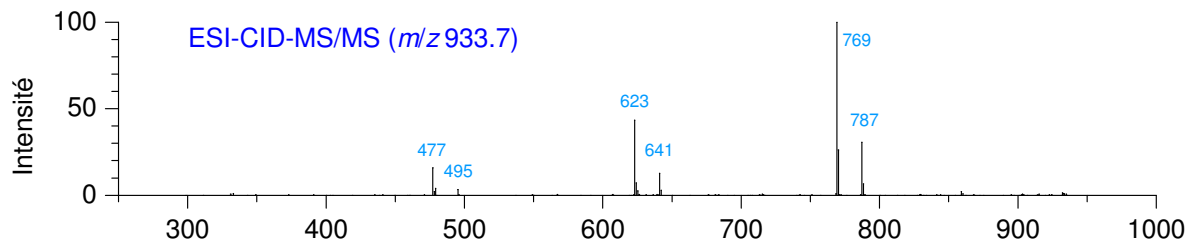
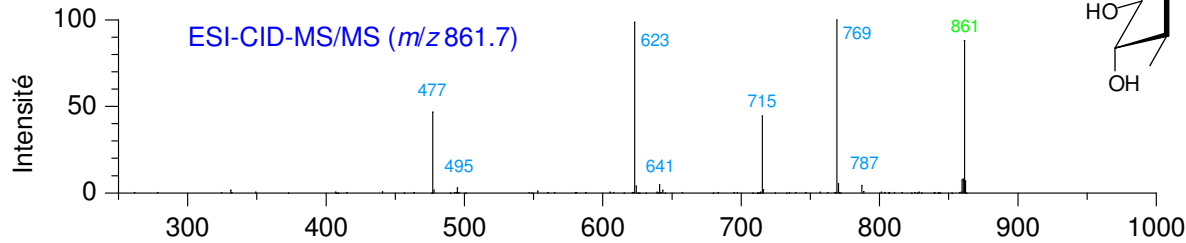
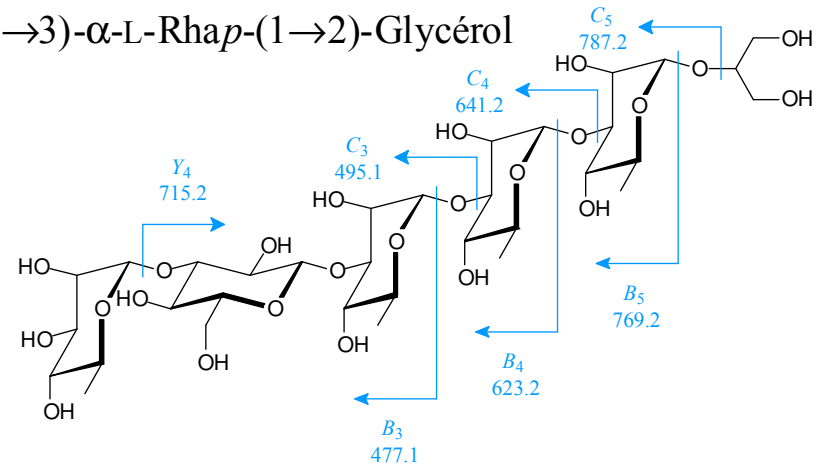


ESI-MS, ESI-CID-MS/MS

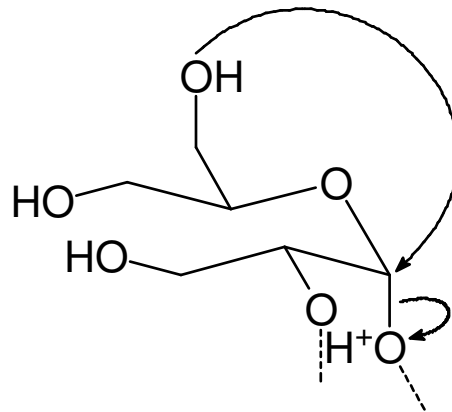
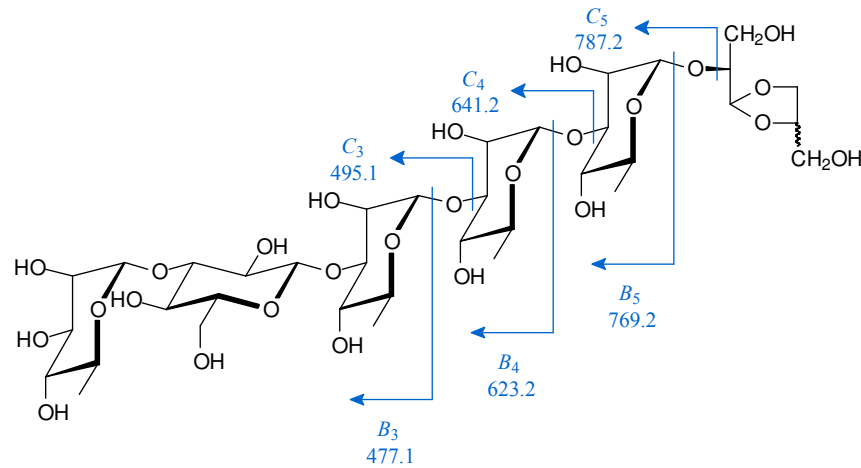
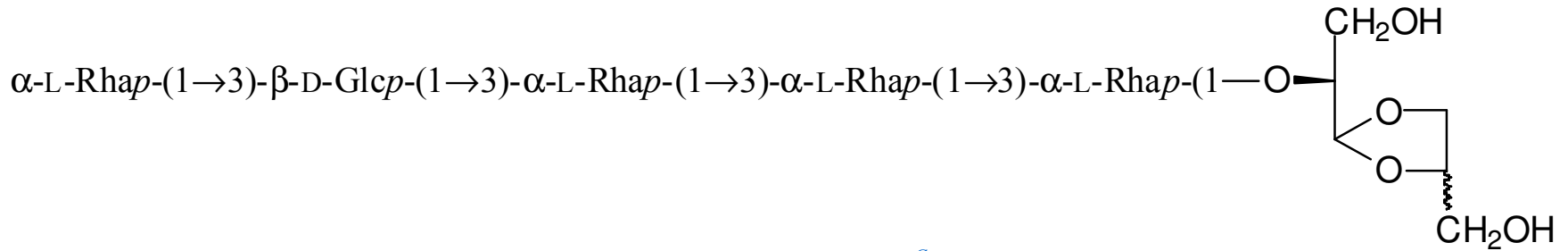
Résultat attendu : $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z 861$

Spectres de masse

α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-Glycérol



Formation de l'acétal cyclique

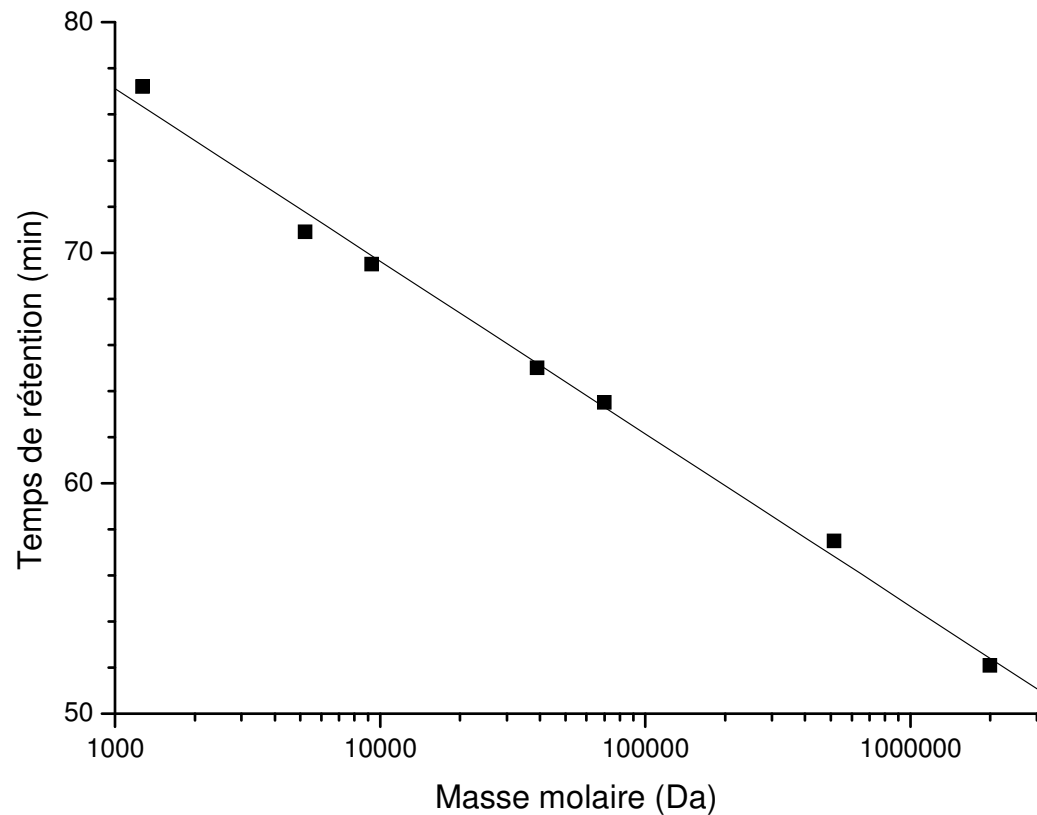


Perméation sur gel

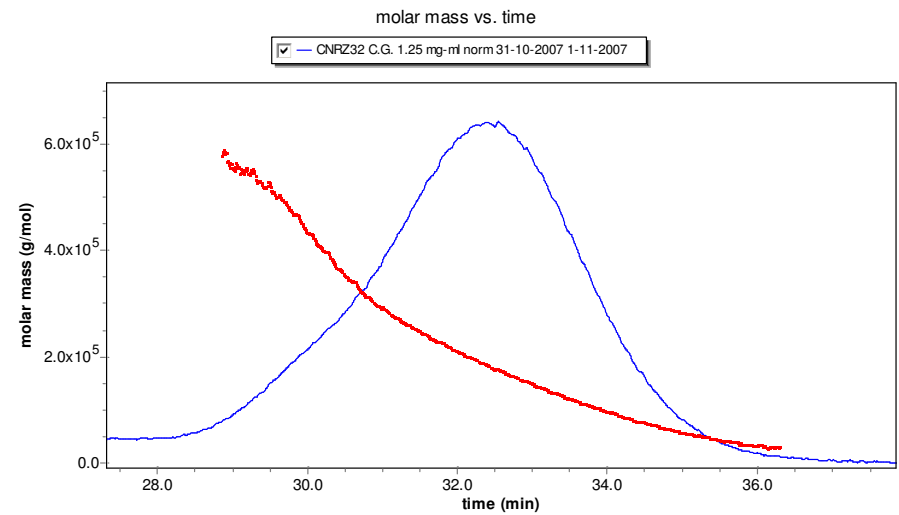
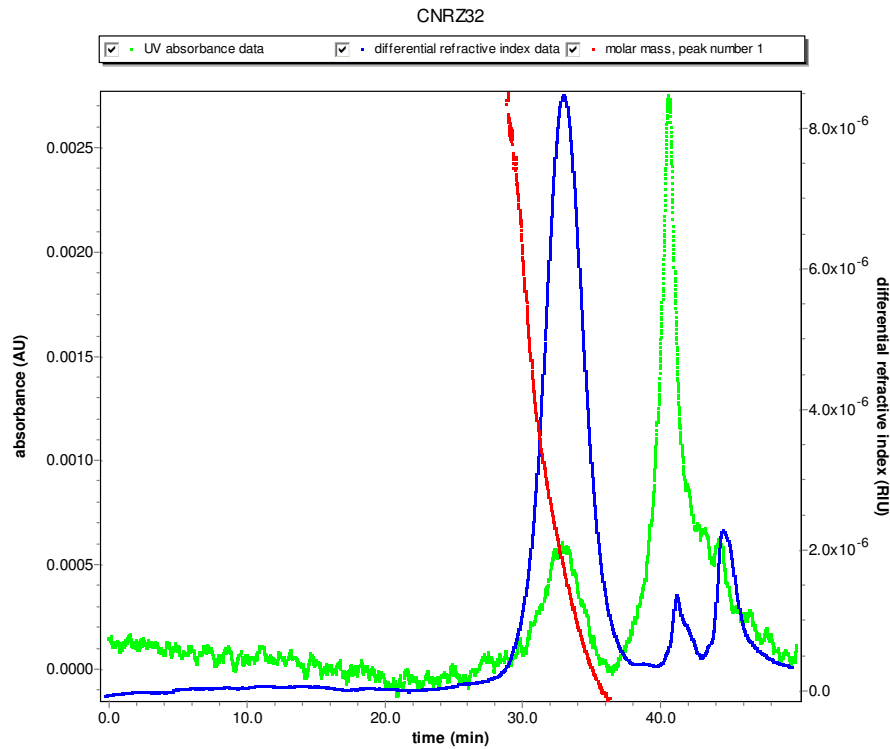
Colonnes Shodex OHpak :
KB-802.5 : 8.5×10^3 Da
KB-805 : 2×10^6 Da
KB-806M : 1×10^7 Da

Calibration :
standards de dextran

Détection :
indice de réfraction
diffusion de la lumière



Diffusion de la lumière



MALS

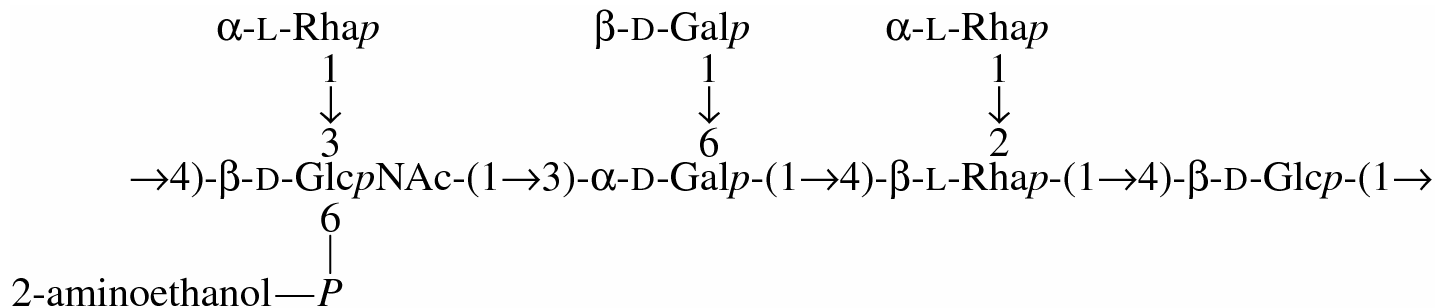
M_w (Da)	1.638×10^5 (0.6%)
R_w (nm)	15.1 (13%)
M_w/M_n	1.514 (2%)

Propriétés rhéologiques

- Masse moléculaire
- Compacité
 - branchements
- Rigidité de la chaîne
 - $\beta(1-4) > \beta(1-3), \beta(1-2) \gg \beta(1-6)$
 - α plus flexible

■ Charge

- neutre
 - viscosité
- négative
 - élasticité



Rétention d'eau dans le fromage

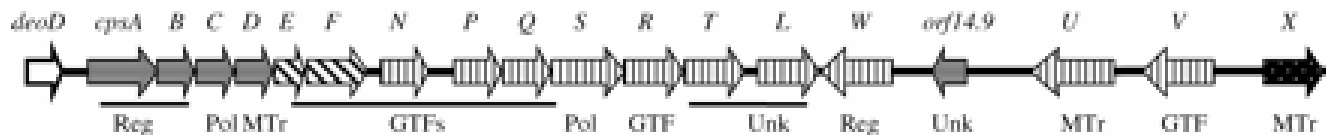
■ Mozzarella faible en gras

Streptococcus thermophilus MR-1C

Combinaison de ferments	Niveau d'hydratation du fromage (%) ^a		
	Essai 1	Essai 2	Essai 3
<i>S. thermophilus</i> MR-1C + <i>L. helveticus</i> LH100	61.2 ± 0.0	62.8 ± 0.5	61.8 ± 0.4
<i>S. thermophilus</i> DM10 + <i>L. helveticus</i> LH100	57.7 ± 0.2	58.8 ± 0.5	58.8 ± 0.1

^a Moyennes de deux échantillons ± écarts types.

Low, Ahlgren, Horne, McMahon, Oberg, Broadbent (1998)



Broadbent, McMahon, Welker, Oberg, Moineau (2003)



Propriétés anti-inflammatoires

- Induction de la production d'IL-10
- Pas d'induction de la production d'IL-12
- Synergie avec le LPS dans la production d'IL-10
- Inhibition de la production d'IL-12



Remerciements

■ Collaborateurs

- Dr André Bégin, Dr Edward Farnworth (CRDA, AAC, Saint-Hyacinthe, Québec)
- Dr Denis Roy, Dr Gisèle LaPointe, Dr Sylvain Moineau (Université Laval, Québec)
- Dr Monique Lacroix, Dr Daniel Oth (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec)
- Dr Corinne Pau-Roblot (Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France)
- Dr Christophe Gilbert (Université de Lyon 1, Villeurbanne, France)
- Dr Jeffery R. Broadbent (Utah State University, Logan, Utah)
- Dr Lucie Lamontagne (Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec)

■ Financement

- CORPAQ
- VRQ
- FQRNT

■ Personnel

- Isabelle Dupont, Barthélémy Watters, Gaëtan LeClair, Dr Maria Guadalupe Macedo-Espinosa, Dr Lynda Gamar-Nourami, Mélanie Côté, Dr Phuong Lan Pham, Marie-Caroline Guggisberg, Hélène Deveau, Nancy Guertin, Cathy Corriveau (production et purification)
- Pierre Ward (production, purification, analyses chimiques)
- Christine Laverdure (analyses et modifications chimiques)
- Daniel Goupil (purification, analyses et modifications chimiques)
- Sonia Rogacheva (production, purification, analyses et modifications chimiques)
- Jean Ledoux, Angelina Zelaya (analyses chimiques)
- Fleur Gagnon (purification, analyses et modifications chimiques, MS)
- Claude Danis (HPLC, GPC, MS)
- Brian Stewart, Dr Hassan Sabik (MS)