

Avis de Soutenance

Madame Annabelle MEDALIN

Chimie

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Caractérisation des phospho-relais et des toxines chez les bactéries par couplage photo-dissociation laser et spectrométrie de masse

dirigés par Madame Marion GIROD et Monsieur Jérôme LEMOINE

Soutenance prévue le **mardi 16 décembre 2025** à 14h00

Lieu : Institut des Sciences Analytiques, salle de conférence au 5 rue de la Doua à Villeurbanne

Composition du jury proposé

Mme Marion GIROD	CNRS Lyon	Directrice de thèse
M. Vincent DUGAS	Université Lyon 1	Examinateur
Mme Claudia BICH	Université de Montpellier	Examinatrice
M. Jérôme LEMOINE	Université Lyon 1	Co-directeur de thèse
Mme Julie HARDOUIN	Université de Rouen	Rapporteuse
M. François BECHER	CEA Gif-sur-Yvette	Rapporteur

Mots-clés : Spectrométrie de masse, Bactérie, Dissociation induite par laser, Protéomique, Entérotoxines, TCS

Résumé :

Au cours de ma thèse, j'ai développé et appliqué une méthode analytique innovante combinant la spectrométrie de masse à la dissociation induite par laser (LID-MS/MS) pour l'étude de protéines bactériennes. Cette approche repose sur une fragmentation sélective basée non seulement sur la masse, mais également sur les propriétés optiques des analytes. Contrairement aux méthodes de fragmentation classiques en MS/MS non-discriminants, qui fragmentent indistinctement tous les ions isobariques -rendant la détection de composés peu abondants difficile sans enrichissement dans des matrices complexes- la LID ne cible que les ions capables d'absorber l'énergie du laser. Pour une meilleure spécificité, un laser émettant à 473 nm est choisi, car les protéines naturelles n'absorbent pas dans le domaine du visible, et ne sont donc pas détectées. La photo-fragmentation des composés ciblés est obtenue après greffage spécifique d'un chromophore -le Dabcyl-, qui absorbe à 473 nm, sur les protéines d'intérêt. Cette stratégie permet donc de cibler un sous-ensemble de peptides et de réduire virtuellement la complexité de l'échantillon puisque seuls ces peptides dérivés avec le chromophore sont détectés en LID. Dans un premier temps, cette approche a été appliquée à la détection et à la quantification de toxines produites par *Staphylococcus aureus*, une bactérie pathogène opportuniste, fréquemment retrouvée dans les environnements hospitaliers et alimentaires. Ce pathogène, souvent commensal chez l'Homme, est capable de provoquer de nombreuses infections, notamment via la production d'entérotoxines (SEs). Ces toxines présentent à la fois un pouvoir émétisant élevé et une capacité à sur-activer le système immunitaire, les

rendant particulièrement préoccupantes en santé publique. J'ai donc développé une méthode LID-MS/MS pour la quantification de sept entérotoxines (SEA, SEB, SEC, SED, SEH, SEQ et SER), sans enrichissement immunologique préalable. Dans le but d'améliorer la sensibilité envers ces protéines mineures, un acide aminé rare et présent sur la majorité des protéines est dérivé : la cystéine. La préparation des échantillons a été optimisée en utilisant des toxines purifiées ajoutées en matrices biologiques. Enfin, le protocole analytique complet a été validé par la détection et la quantification des SEs endogènes produites par des souches de *S. aureus*. La seconde partie de mon travail de thèse s'est intéressée à *Dickeya dadantii*, agent phytopathogène bactérien responsable de maladies destructrices chez de nombreuses cultures maraîchères. Sa virulence repose sur sa capacité à s'adapter à des stress environnementaux via des systèmes de régulation dits "à deux composants". Ces systèmes sont constitués d'un senseur i.e. protéine histidine kinase (HK) membranaire qui s'auto-phosphoryle sur une histidine en réponse à un stimulus environnemental, puis transfère son groupement phosphate au régulateur de réponse (RR), qui module l'expression génique en conséquence. Chez les bactéries, la phosphorylation se produit sur un résidu aspartate (pD) du RR. La clé de cette voie de signalisation réside dans le niveau de phosphorylation du RR. Or, cette phosphorylation est instable : les groupements phosphate des pD sont particulièrement labiles et difficiles à détecter. Les méthodes classiques d'enrichissement des protéines phosphorylées n'autorisent pas une mesure quantitative du taux d'occupation, car elles éliminent les formes non modifiées. Afin de pouvoir suivre cette dynamique, j'ai donc développé un protocole de dérivation spécifique des groupement pD, avec différentes sondes qui contiennent le chromophore Dabcyl et un groupement réactif hydroxylamine, afin de détecter, de façon spécifique, les peptides modifiés par LID-MS/MS sans enrichissement préalable. Les premiers tests, notamment pour déterminer la concentration en sonde et les solvants de réaction optimaux, ont été réalisés sur un TCS modèle: la protéine CpxR phosphorylée in vitro.