

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

Formulaire à compléter et déposer par les porteurs du projet de thèse HDR via l'adresse mail suivante :

ed658@univ-amu.fr OU/ET romane.haddadi@univ-amu.fr

MERCI DE METTRE EN SUJET DU MAIL : Concours ED 658 2026 porteur de projet

Ces dossiers seront publiés pour que les candidats postulent.

au plus tard le 3 mars 2026.

INTITULÉ DU PROJET

(Fra) Rôle de multiples ATPases moteurs dans l'adaptation de la force de rétraction des pili de type IV à différentes conditions de substrat

(Eng) Role of Multiple Motors ATPases in Adapting Type IV Pilus Retraction Force to Different Substrate Conditions

1- Directrice ou directeur de thèse HDR

NOM	MAURIELLO	Prénom	Emilia
Téléphone portable	0699746828	Courriel	emauriello@imm.cnrs.fr
Unité de recherche (UR) de rattachement			
Code (acronyme et n°) de l'UR à AMU :		LCB (UMR7283)	
Nom de l'UR :	Laboratoire de Chimie Bactérienne		
Directrice ou directeur de l'UR			
Nom	MAGALON	Prénom	Axel

2- Codirectrice ou codirecteur de thèse, le cas échéant

NOM		Prénom	
Téléphone portable		Courriel	
Unité de recherche (UR) de rattachement			
Code (acronyme et n°) de l'UR à AMU :			
Nom de l'UR :			
Directrice ou directeur de l'UR			
Nom		Prénom	

SPECIALITE : (Rayer les mentions inutiles)

Microbiologie et interactions hôte-pathogènes

SOUS JURY POUR LE CONCOURS : (Rayer les mentions inutiles)

JURY 2 : MICROBIOLOGIE – GENOMIQUE

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

Description de la problématique de recherche - Project description

(Fra) Les pili de type 4a (T4aP) sont des polymères dont les sous-unités, appelées pilines de type IV, s'assemblent en appendices extracellulaires. Ils sont extrêmement répandus chez les bactéries, où ils assurent diverses fonctions, notamment la motilité (twitching), l'adhésion aux cellules et aux surfaces, la formation de biofilms et l'acquisition d'ADN extracellulaire.

Ces filaments partagent une caractéristique universelle : ils fonctionnent par cycles d'extension, d'adhésion à un substrat et de rétraction. Les T4aP sont les nanomachines capables de générer les forces de rétraction les plus élevées connues, pouvant atteindre jusqu'à 200 nN chez certaines espèces pour une seule fibre de pilus en cours de rétraction. Ces forces permettent aux bactéries de se déplacer en tirant leur corps cellulaire vers l'avant après l'attachement du T4aP au substrat, et même d'induire des réponses cellulaires essentielles chez l'hôte, dans le cas des bactéries pathogènes qui adhèrent aux cellules hôtes via les T4aP.

La rétraction des T4aP est assurée par des moteurs ATPasiques hexamériques, PilT, situés à la base du pilus dans le cytoplasme. Ces moteurs utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour entraîner la rotation d'un anneau inséré dans la membrane (PilC), via une interaction directe selon une stœchiométrie de 6PilT : 3PilC. L'anneau 3PilC en rotation dépolymérise la fibre de pilus en extrayant les sous-unités de piline à sa base et en les réinsérant dans la membrane cytoplasmique.

Alors que, chez quelques bactéries monodermes, la rétraction des T4aP est assurée par une seule protéine motrice, PilT, la plupart des bactéries exprimant des T4aP possèdent au moins un moteur de rétraction supplémentaire, PilU.

Le rôle de PilU est resté incertain, y compris chez des bactéries modèles telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio spp.* et *Neisseria spp.*, pour au moins trois raisons :

- i) l'absence de phénotypes clairs et cohérents chez les mutants délétés pour pilU selon les espèces ;
- ii) la difficulté d'observer directement les dynamiques d'extension et de rétraction des pili ;
- iii) le manque de compréhension concernant le positionnement de PilU au sein de la nanomachine du pilus et, par conséquent, son mode d'action.

L'un de nos systèmes modèles bactériens pour l'étude des T4aP est la bactérie du sol *Myxococcus xanthus*. Cette bactérie forme de vastes essaims de cellules se déplaçant de manière synchrone, capables de prédateur d'autres espèces bactériennes en « meutes de loups » ou, lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, de s'agréger en corps fructifères contenant des spores. Les T4aP sont essentiels à l'ensemble de ces processus, ce qui requiert une grande capacité d'adaptation pour assurer la rétraction sur des substrats variés et dans des conditions de croissance changeantes.

Nos données récentes montrent que, alors qu'un mutant de *M. xanthus* délété pour pilT est totalement incapable de rétracter les T4aP et donc de se déplacer (conformément à ce qui a été rapporté chez d'autres bactéries), un mutant pilU est encore capable d'assurer la rétraction, mais uniquement sur des substrats très mous. En d'autres termes, **PilT seul ne peut pas générer une force suffisante pour permettre à *M. xanthus* de se déplacer sur des substrats rigides, ce qui suggère que PilU joue un rôle dans l'augmentation de la force de rétraction lorsque cela est nécessaire. Inversement, PilU seul est incapable d'assurer la rétraction du pilus.**

Ces résultats nous ont conduits à étudier l'organisation moléculaire de PilT, PilU et PilC à l'aide de la modélisation structurale par IA (AlphaFold3). **Nous avons généré un modèle structural de haute confiance dans lequel un anneau 6PilU interagit avec un anneau 6PilT, formant une structure en double anneau (« double donut »).** Plus important encore, nos résultats montrent que seul l'hexamère 6PilT peut interagir avec l'anneau 3PilC, fournissant ainsi une explication moléculaire claire du caractère essentiel de PilT pour la rétraction du pilus, contrairement à PilU. Pour donner une analogie mécanique, PilC correspond à un engrenage, PilT au moteur directement connecté à cet engrenage, et PilU à un surcompresseur auxiliaire monté sur le moteur.

Sur la base de ces résultats préliminaires et d'autres données, l'objectif de ce projet est de comprendre la fonction précise de PilU, mais aussi, plus largement, le rôle de multiples moteurs de rétraction dans les

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

systèmes 4aP. Les objectifs spécifiques ainsi que les méthodologies que nous mettrons en œuvre sont décrits ci-dessous.

(Eng). (English). **Type 4a pili (T4aP) are polymers whose subunits, called type IV pilins, assemble into extracellular appendages.** They are extremely widespread in bacteria where they mediate a variety of functions, including motility (twitching), cell and surface adhesion, biofilm formation, and the uptake of extracellular DNA. **These filaments share the universal feature of functioning through cycles of extension, adhesion to a substrate, and retraction.** T4aP are the nanomachines capable of generating the highest retraction forces, up to 200 nN in some species for a single pilus fiber retracting. These forces enable bacteria to move by pulling their cell body forward after T4aP attachment to a substrate, and even to induce essential cellular responses within the host, for pathogenic bacteria that adhere to host cells via T4aP.

Retraction of T4aP is powered by hexameric ATPase motors, PilT, located at the base of the pilus in the cytoplasm. These retraction motors use the energy derived from ATP hydrolysis to drive the rotation of a membrane-embedded ring (PilC), through direct interaction at a stoichiometry of 6PilT : 3PilC. The rotating 3PilC ring depolymerizes the pilus fiber by extracting pilin subunits from its base and reinserting them into the cytoplasmic membrane.

While in few (monoderm) bacteria T4aP retraction is mediated by a single motor protein, PilT, most T4aP-expressing bacteria possess at least one additional retraction motor protein, PilU.

The role of PilU has remained unclear, including in model bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* spp., and *Neisseria* spp., for at least three reasons:

- i) the absence of clear and consistent phenotypic readouts in *pilU* deletion mutants across different species;**
- ii) the difficulty of directly observing pilus extension and retraction dynamics;**
- iii) the lack of understanding of how PilU is positioned within the pilus nanomachine and, consequently, how it functions.**

One of our bacterial model systems for studying T4aP is the soil bacterium *Myxococcus xanthus*. This bacterium produces large swarms of synchronously moving cells that can prey on other bacterial species in “wolf packs” or, when environmental conditions become unfavorable, aggregate into fruiting bodies containing spores. T4aP are essential for all these processes, requiring a high degree of adaptability to retract on diverse substrates and under varying growth conditions.

Our recent data show that, while a *M. xanthus pilT* deletion mutant is completely unable to retract T4aP and therefore cannot move (in accord to what was reported in other bacteria), a *pilU* mutant can still mediate retraction, but only on very soft substrates. In other words, **PilT alone cannot generate sufficient force for *M. xanthus* to move on hard substrates, suggesting that PilU plays a role in increasing retraction force when required. Conversely, PilU alone cannot mediate pilus retraction at all.**

These results prompted us to investigate the molecular organization of PilT, PilU, and PilC using AI structural modelling (AlphaFold3). **We generated a high-confidence structural model in which a 6PilU ring interacts with a 6PilT ring, forming a double-donut structure. Most importantly, our results also show that only the 6PilT hexamer can interact with the 3PilC ring, providing a clear molecular explanation for why PilT is essential for pilus retraction whereas PilU is not.** To provide a mechanical analogy, PilC is a gear, PilT is the engine directly connected to the gear and PilU is an auxiliary booster mounted on the engine.

Based on these and other preliminary results, the scope of this project will be to understand the exact function of PilU, but also more broadly the role of multiple retraction motors in 4aP systems. The specific objectives and the methodologies that we will employ, are described below.

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

Mots clés – Keywords

(Fra)

Pili de type 4a (T4aP)

Rétraction

Motilité

Twitching

Myxococcus xanthus

(Eng)

Type 4a pili (T4aP)

Retraction

Motility

Twitching

Myxococcus xanthus

Thématique / Domaine / Contexte - Theme / Field / Context

(Fra)

Thème :

Mécanismes moléculaires de la rétraction des Pili de Type 4a chez les bactéries.

Domaine :

Microbiologie – Biologie cellulaire bactérienne – Biologie moléculaire bactérienne – Biologie structurale.

Contexte :

Les Pili de Type 4a (T4aP) sont des nanomachines bactériennes dynamiques qui assurent la motilité, l'adhésion cellulaire, la formation de biofilms et les interactions avec l'hôte. La rétraction de ces filaments est principalement alimentée par les moteurs ATPasiques PilT et, chez la plupart des bactéries didermes telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* spp. et *Neisseria* spp., par un moteur supplémentaire appelée PilU. Si PilT est indispensable à la rétraction du pilus, le rôle exact de PilU reste encore mal compris. En utilisant *Myxococcus xanthus* comme organisme modèle, des résultats récents suggèrent que PilU contribue à augmenter la force de rétraction dans des conditions mécaniques contraignantes, indiquant l'existence d'un mécanisme coopératif entre plusieurs moteurs ATPasiques permettant l'adaptation de la génération de force bactérienne aux variations environnementales.

(Eng)

Theme:

Molecular mechanisms of retraction in bacterial Type 4a pili.

Field:

Microbiology – Bacterial cell biology – Molecular bacteriology – Structural biology.

Context:

Type 4a pili (T4aP) are dynamic bacterial nanomachines that mediate motility, adhesion, biofilm formation, and host interactions. Retraction of these filaments is powered by the PilT ATPases motor and, in most diderm bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* spp., and *Neisseria* spp., an additional ATPase motor, PilU. While PilT is essential for pilus retraction, the precise role of PilU remains poorly understood. Using *Myxococcus xanthus* as a model organism, recent findings suggest that PilU enhances retraction force under mechanically demanding

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

conditions, pointing to a cooperative mechanism between multiple ATPases motors in adapting bacterial force generation to changing environments.

Objectifs - Objectives

(Fra)

En utilisant *Myxococcus xanthus* comme organisme modèle, nous analyserons précisément le rôle de PilU lors de la rétraction du pilus en poursuivant les objectifs suivants :

- **Déterminer la fonction du moteur PilU au cours de la motilité et de la rétraction du pilus.** Nous utiliserons des mutants spécifiques (incluant $\Delta pilT$, $\Delta pilU$ et des doubles mutants) afin de caractériser la motilité bactérienne sur des substrats de rigidité variable. En parallèle, nous quantifierons les dynamiques d'extension et de rétraction des pili à l'aide de microscopie à haute résolution combinée à un marquage spécifique de la fibre du pilus.
- **Étudier l'interdépendance entre PilT et PilU.** Nous analyserons la relation mécanistique entre PilT et PilU en générant et en caractérisant des mutants ponctuels déficients en activité ATPasique. Cela nous permettra de déterminer comment les activités enzymatiques de ces moteurs contribuent, individuellement et de manière coopérative, à la génération de force.
- **Études de localisation subcellulaire.** Nous déterminerons la localisation de PilT et PilU en les fusionnant à des marqueurs fluorescents, puis en observant leur distribution dans un fond génétique sauvage et dans certains mutants sélectionnés. Cette approche permettra de révéler non seulement leur organisation spatiale au sein de la cellule, mais aussi s'ils colocalisent systématiquement (et donc interagissent), ou si leur colocalisation dépend des conditions environnementales, telles que la rigidité du substrat.
- **Caractérisation structurale du complexe PilT–PilU.** Enfin, si le temps le permet, nous tenterons de résoudre la structure proposée en « double anneau » (« double donut ») du complexe PilT–PilU par microscopie électronique cryogénique, en collaboration avec l'équipe Durand

(Eng)

Using *Myxococcus xanthus* as a model organism, we will dissect the precise role of PilU during pilus retraction by pursuing the following objectives:

- **Determining the function of the PilU motor during motility and pilus retraction.** We will use specific mutants (including $\Delta pilT$, $\Delta pilU$, and double mutants) to characterize bacterial motility on substrates of varying stiffness. In parallel, we will quantify pilus extension and retraction dynamics using high-resolution microscopy combined with specific labeling of the pilus fiber.
- **Studying PilT–PilU interdependence.** We will investigate the mechanistic relationship between PilT and PilU by generating and analyzing ATPase-deficient point mutants. This will allow us to determine how the enzymatic activities of these motors contribute individually and cooperatively to force generation.
- **Subcellular localization studies.** We will determine the localization of PilT and PilU by fusing them to fluorescent tags and observing their localization in wild-type and selected mutant backgrounds. This approach will reveal not only their spatial organization within the cell but also whether they always colocalize (therefore interact), or if their colocalization depends on environmental conditions, such as substrate stiffness.
- **Structural characterization of the PilT–PilU complex.** Finally, if time permits, we will attempt to resolve the proposed PilT–PilU “double-donut” structure using cryo-electron microscopy, in collaboration with the Durand team.

**APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026
CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant**

Méthode – Method

(Fra)

Pour atteindre les objectifs décrits, nous mettrons en œuvre les méthodes suivantes :

- Construction et utilisation de mutants spécifiques chez *Myxococcus xanthus* afin d'analyser la contribution fonctionnelle de chaque moteur ATPasique.
- Analyse quantitative de la motilité bactérienne à l'échelle de la colonie et de la cellule unique, dans des conditions environnementales définies. Pour cela, nous utiliserons également la microscopie ainsi que des approches avancées de suivi cellulaire et d'analyse d'images.
- Visualisation et quantification de l'extension et de la rétraction des pili par microscopie à haute résolution couplée à un marquage spécifique de la fibre du pilus.
- Microscopie en fluorescence afin de déterminer l'organisation spatiale de PilT et PilU fusionnés à des marqueurs fluorescents.

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

- Purification protéique et microscopie électronique cryogénique pour valider le complexe double hexamérique PiLT–PiLU proposé, en collaboration avec l'équipe Durand.

(Eng)

For the described objectives we will employ the following methods:

- Construction and use of specific mutants in *Myxococcus xanthus* to dissect the functional contribution of each ATPase motor.
- Quantitative analysis of bacterial motility at the colony- and single-cell level under defined environmental conditions. For this will use also microscopy and advanced cell tracking and image analysis.
- Visualization and quantification of pilus extension and retraction using high-resolution microscopy coupled with specific labeling of the pilus fiber.
- Fluorescence microscopy to determine the spatial organization of PiLT and PiLU fused to fluorescent tags.
- Protein purification and cryo-electron microscopy to validate the proposed PiLT–PiLU double-hexamer complex, in collaboration with the Durand team.

Références bibliographiques

Pellic V. Mechanism of assembly of type 4 filaments: everything you always wanted to know (but were afraid to ask). Microbiology (2023). 169(3).

Solanki V., et al. (2018). "Structural insights into the mechanism of type IVa pilus extension and retraction ATPase motors." FEBS Journal 285: 3402–3421.

Adams DW, et al. (2019). "The type IV pilus protein PiLU functions as a PiLT-dependent retraction ATPase." PLoS Genet. 2019 Sep 16;15(9):e1008393. doi: 10.1371/journal.pgen.1008393.

Chlebek JL, et al. (2019). "PiLT and PiLU are homohexameric ATPases that coordinate to retract type IVa pili." PLoS Genet. 2019 Oct 18;15(10):e1008448. doi: 10.1371/journal.pgen.1008448.

**APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026
CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant**

Conditions scientifiques matérielles et financières du projet de recherche - Scientific, material, and financial conditions of the research project

(Fra)

L'étudiant bénéficiera des équipements et de l'expertise disponibles au sein de l'équipe Pelicic, du LCB et de l'IM2B. L'ensemble des équipements nécessaires au développement du projet est disponible à l'Institut. L'équipe Pelicic est financée par l'ANR et AMIDEX. D'autres demandes de financement sont actuellement en cours.

(Eng)

The student will benefit from the equipment and expertise available within the Pelicic team, the LCB and the IM2B. All the equipment needed to develop the project is available at the Institute. The Pelicic team is funded by the ANR and AMIDEX. Other funding requests are ongoing.

Profil et compétences recherchées - Profile and skills required

(Fra)

Le/la candidat(e) devra posséder des connaissances de base en microbiologie, en biochimie et/ou en biologie cellulaire bactérienne.

Il/elle devra faire preuve de capacité, de curiosité scientifique et d'enthousiasme pour développer un projet de recherche personnel ambitieux, ainsi que de la capacité à travailler au sein d'une équipe de recherche.

(Eng)

The candidate should have some basic knowledge in microbiology, biochemistry and/or bacterial cell biology. He/She should show the ability, scientific curiosity and excitement to develop an ambitious personal research project, and the ability to work within a research group.