**Proposition de sujet de thèse**

**Campagne 2017 d’attribution des contrats doctoraux attribués à EDCSV**

**Directeur de thèse** (Supervisor), HDR rattaché à EDCSV: Antoine Royant, Institut de Biologie Structurale – Grenoble, 04-76-88-17-46, antoine.royant@ibs.fr, HDR obtenue en 2011

**Co-Directeur de thèse** (éventuel), titulaire HDR : non applicable

**Ou Co-encadrant** (si non HDR) : non applicable

*En cas de co-direction ou co-encadrement,* ***les taux d’encadrement seront de 50% chacun****.*

**Unité de Recherche**/Laboratory : Institut de Biologie Structurale, UMR 5075, Grenoble, dirigé par Winfried Weissenhorn

**Equipe de recherche**/Research team : Equipe icOS, dirigée par Antoine Royant, au sein du groupe GSY (groupe Synchrotron) dirigé par Jean-Luc Ferrer

**Titre du projet de thèse** (en français): Développement par une approche rationnelle de protéines fluorescentes dans le rouge lointain et l’infrarouge pour l’imagerie de corps entier

**Titre du projet de thèse** (en anglais): Structure-driven development of far-red and infrared fluorescent proteins for whole-body imaging

**Résumé** (en anglais): Précisez le contexte, les objectifs, les méthodes (500 mots maximum)

*Context:*  Green Fluorescent Protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria* has revolutionized cell biology, but is of more limited use in whole-body imaging, since tissues rich in haemoglobin and oxy-hemoglobin strongly absorb light below 650 nm, that is from the UV to the red part of the visible spectrum. Beyond 650 nm there is an optical window, limited around 900 nm by the absorption of water, in which fluorescence imaging is possible on multicellular organisms. Fluorescent Proteins (FPs) have been optimized in brightness for most of the visible light spectrum, except for the far-red and near-infrared regions. FPs homologous to GFP have the capacity to fluoresce in the far-red, albeit weakly, but not in the infrared. Besides, a small number of infrared fluorescent proteins (IFPs) have recently been developed by directed evolution from bacterial phytochromes, which use bilins as chromophore, paving the way to the design of fluorescent proteins that are not homologous to GFP. We have contributed to develop a number of such proteins (Shu *et al.* 2009, Yu *et al.* 2014, Yu *et al.* 2016) and determined the structure of of them (*ibid.*, Feliks *et al.* 2016).

*Goal:* We aim to develop fluorescent proteins in the far-red and near-infrared regions of the visible light spectrum with a significantly increased brightness compared to existing variants, in the same way as we developed the optimized cyan and red fluorescent proteins mTurquoise2 and mScarlet (Goedhart *et al.* 2012, Bindels *et al.* 2017).

*Methods:* We will start from structures of RFPs and IFPs solved in the team, and identify key residues for random mutagenesis. Screening for fluorescent bacterial colonies will highlight mutants of interest, for which structural analysis will provide rationale for fluorescence improvement.

Bindels, D.S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K.E., Mastop, M., Aumonier, S., Gotthard, G., Royant, A., Hink, M.A. & Gadella, T.W. Jr. *Nat. Methods* **14**, 53-56 (2017)

Feliks, M., Lafaye, C., Shu, X., Royant, A. & Field, M. *Biochemistry* **55**, 4263-4274 (2016)

Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimousin, M., Joosen, L., Hink, M. A., van Weeren L., Gadella, T. W. Jr & Royant, A. *Nat. Commun.* **3**, 751 (2012)

Shu, X., Royant, A., Lin, M.Z., Aguilera, T.A., Lev-Ram, V., Steinbach, P.A. & Tsien, R.Y. *Science* **324**, 804-807 (2009)

Yu, D., Dong, Z., Gustafson, W.C., Ruiz-González, R., Signor, L., Marzocca, F., Borel, F., Klassen, M.P., Makhijani, K., Royant, A., Jan, Y.N., Weiss, W.A., Guo, S. & Shu, X. *Protein Sci.* **25**, 308-315 (2016)

Yu, D., Gustafson, W. C., Han, C., Lafaye, C., Noirclerc-Savoye, M., Ge, W. P., Thayer, D. A., Huang, H., Kornberg, T. B., Royant, A., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Weiss, W. A. & Shu, X. *Nat Commun.* **5**, 3626 (2014)

**Mots-clés** (5 maximum) :

En français : protéine fluorescence, fluorescence infrarouge, évolution dirigée, cristallographie aux rayons X, imagerie de corps entier

En anglais : fluorescent protein, infrared fluorescence, directed evolution, X-ray crystallography, whole-body imaging

**Sujet éligible à une allocation de la Fondation pour la recherche médicale (FRM) :**

Oui **X** Non **□**

**Profil du candidat souhaité :** Connaissances en biologie moléculaire, biochimie et méthodes biophysiques de caractérisation de protéines ; bases de la cristallographie aux rayons X des protéines et de l’analyse structurale.

**Trois publications récentes du Directeur de thèse** (et du co-directeur, s’il y a lieu) :

Makhijani, K., To, T.-L., Ruiz-González, R., Lafaye, C., Royant, A. & Shu, X. Precision optogenetic tool for selective single- and multiple-cell ablation in a live animal model system. *Cell Chem. Biol.* **24**, 110-119 (2017)

Bindels, D.S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K.E., Mastop, M., Aumonier, S., Gotthard, G., Royant, A., Hink, M.A. & Gadella†, T.W. Jr. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat. Methods* 14, 53-56 (2017)

Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., Kimura, T., Tanaka, T., Tono, K., Song, C., Tanaka, R., Arima, T., Yamashita, A., Kobayashi, J., Hosaka, T., Mizohata, E., Nogly, P., Sugahara, M., Nam, D., Nomura, T., Shimamura, T., Im, D., Fujiwara, T., Yamanaka, Y., Jeon, B., Nishizawa, T., Oda, K., Fukuda, M., Andersson, R., Båth, P., Dods, R., Davidsson, J., Matsuoka, S., Kawatake, S., Murata, M., Osamu, O., Owada, S., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Schertler, G., Yabashi, M. ,Bondar, A.-N., Standfuss, J., Neutze, R. & Iwata, S. A three dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin. *Science* **354**, 1552-1557 (2016)

**Docteurs encadrés par le Directeur de thèse** (et du co-directeur s’il y a lieu) **ayant soutenu leur thèse** (dans les 5 dernières années). Indiquer la date de soutenance, la durée de la thèse (en mois), les publications relatives au sujet de thèse et leur situation actuelle :

**(1) Gaëlle BATOT**

**Soutenance de thèse :** le 11 décembre 2013 à Grenoble

**Durée de la thèse :** 39 mois

**Publications :**

Jørgensen, R., Batot, G., Mannerstedt, K., Imberty, A., Breton, C., Hindsgaul, O., Royant, A. & Palcic† M. M. Structures of a human blood group glycosyltransferase in complex with a photo-activatable UDP-Gal derivative reveal two different binding conformations. *Acta Crystallogr. F***70**, 1015-1021 (2014)

von Stetten, D., Batot, G. O., Noirclerc-Savoye, M. & Royant, A. Alteration of fluorescent protein spectroscopic properties upon cryoprotection. *Acta Crystallogr. D***68**, 1578-1583 (2012)

**Situation actuelle :** postdoc dans le laboratoire de Chris Hill à l’Université d’Utah

**(2) Damien CLAVEL**

**Soutenance de thèse :** le 20 décembre 2016 à Orsay

**Durée de la thèse :** 38 mois

**Publication :**

Clavel, D., Gotthard, G., von Stetten, D., De Sanctis, D., Pasquier, H., Lambert, G.G., Shaner, N.C., Royant, A. Structural analysis of the bright monomeric yellow-green fluorescent protein mNeonGreen obtained by directed evolution. *Acta Crystallogr.* D**72**, 1298-1307 (2016)

**Situation actuelle :** postdoc de 6 mois au sein de l’IBS à Grenoble

**Thèses en cours encadrées par le Directeur de** **thèse**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nom, Prénom du doctorant | Date de début de thèse | Type de financement | Indiquer, le cas échéant, s’il s’agit d’une co-direction, d’une co-tutelle,… |
| LAFUMAT Bénédicte | Sep. 2013 | ESRF + ESS Lund | Co-encadrants : Gordon Leonard et Philippe Carpentier |
| AUMONIER Sylvain | Sep. 2015 | ESRF | Co-tutelle (Directeur de thèse : Gordon Leonard, autre co-encadrant : David von Stetten) |

**Nombre de chercheurs et enseignant-chercheurs titulaires d’une HDR dans l’équipe/groupe** : 1 (4)

**Nombre total de thèses en cours dans l’équipe/groupe :** 2 (2)