Laboratoire: UMR CNRS 7275 / Université Côte d’Azur – IPMC

Responsable du Laboratoire/Equipe : Dr Pascal BARBRY

Encadrants : Laure-Emmanuelle Zaragosi et Elisa Redman

**Analyse fonctionnelle de la régénération et du remodelage de l’épithélium respiratoire humain dans l’asthme, par approche CRISPR-Cas9**

Le but de ce projet est d’identifier de nouveaux mécanismes moléculaires et cellulaires au sein de l’épithélium respiratoire en réponse à l’asthme sévère.

L’épithélium respiratoire est composé principalement de cellules basales, de cellules à mucus et de cellules multiciliées. Il protège l’organisme en piégeant les pathogènes dans un mucus sécrété qui est ensuite évacué par le battement coordonné des cils présents à la surface apicale des cellules multiciliées. Dans l’asthme, une maladie chronique affectant des millions de personnes dans le monde, l’épithélium respiratoire subit une inflammation et un remodelage pathologique résultant en un défaut de clairance du mucus, ce qui aggrave la maladie.

Notre équipe a identifié plusieurs régulateurs de la régénération de l’épithélium grâce à l’utilisation d’un modèle de culture 3D capable de reconstituer *in vitro* un épithélium respiratoire similaire à celui *in vivo*, ainsi qu’au séquençage d’ARN sur cellules uniques (single-cell RNAseq) (Ruiz Garcia et al., Development, 2019). Cette dernière approche nous a aussi permis d’établir un atlas moléculaire et cellulaire de toutes les cellules peuplant les voies respiratoires humaines (Deprez, AJRCCM, 2020).

Déchiffrer les mécanismes moléculaires épithéliaux est extrêmement important à la vue du rôle central de ce tissu dans la cascade inflammatoire asthmatique et du manque de thérapies efficaces chez les asthmatiques sévères. Grâce à notre dernier atlas single-cell RNAseq incluant des cellules de donneurs sains et d’asthmatiques sévères, nous avons dressé une liste de gènes candidats prometteurs, potentiels régulateurs de la réponse épithéliale saine et pathologique. Nous avons développé une technique CRISPR-Cas9 RNP grâce à laquelle nous pouvons maintenant envisager des études fonctionnelles à large échelle.

Notre projet est une analyse unique à multi-échelle des cellules épithéliales dans l’asthme, et intègre des données moléculaires, cellulaires et cliniques, qui apportent une nouvelle description de la physiopathologie de la maladie.

Le/la stagiaire évaluera le rôle fonctionnel de nouveaux acteurs moléculaires dans le développement de l’asthme sévère en :

1. Validant l’expression des candidats sélectionnés dans des tissus sains et asthmatiques par immunohistochimie ou RNAscope.
2. Invalidant leur expression par CRISPR-Cas9 RNP dans le modèle de culture 3D.
3. Mesurant l’effet de l’invalidation sur la composition épithéliale durant i) la différenciation normale, ii) en réponse à certains stimuli et iii) dans des échantillons de donneurs malades, par diverses techniques de biologie cellulaire (immunocytochimie, microscopie électronique) et par analyses transcriptomiques.

Les résultats de ce projet pourront enrichir les observations cliniques et à terme contribuer à améliorer les traitements des patients.

**Functional Analysis Of Human Airway Regeneration And Remodeling In Asthma By CRISPR-Cas9**

The aim of this project is to identify new molecular and cellular mechanisms in the respiratory epithelium responding to severe asthma.

The respiratory epithelium is mainly composed of basal cells, mucus-secreting cells and multiciliated cells. It protects the organism by trapping pathogens in a secreted mucus that is then evacuated by the coordinated beating of motile cilia present at the apical surface of multiciliated cells. In asthma, a chronic respiratory disorder affecting millions of people worldwide, the airway epithelium is exposed to inflammation and undergoes pathological remodeling, resulting in a defective mucus clearance, aggravating the disease.

Our team has identified several regulators of epithelial regeneration with the use of a 3D cellular differentiation model able to reconstruct in vitro an airway epithelium similar to the respiratory epithelial tissue in vivo, and with the use of single-cell RNA sequencing (Ruiz Garcia et al., Development, 2019). The latter technique also allowed us to establish a cellular and molecular atlas of all the cells populating the human airways (Deprez, AJRCCM, 2020).

Deciphering the epithelium-related molecular mechanisms is of paramount importance considering the pivotal roles of this tissue in the asthmatic inflammatory cascade and the lack of efficient therapies in severe asthmatics. Relying on our latest single-cell RNAseq atlas composed of cells from healthy and severely asthmatic donors, we have established a list of strong candidates with the aim of identifying novel regulators of the epithelial response in health and disease. We have developed a CRISPR-Cas9 RNP technique allowing us to perform large-scale functional studies. Our project is therefore a unique multiscale analysis of epithelial cells in asthma, integrating molecular, cellular and clinical data, and providing a novel description of the pathophysiology of this disease.

The intern will evaluate the functional contribution of new molecular players in the development of severe asthma and:

1. Validate the expression of the selected candidate genes within healthy and asthmatic tissues, by immunohistochemistry or RNAscope.
2. Induce their invalidation by the CRISPR-Cas9 RNP approach, in the 3D airway epithelium model.
3. Measure the consequences of the invalidation on epithelial composition during i) normal tissue differentiation, ii) in response to selected stimuli and iii) in diseased samples, by cell biology techniques (immunocytochemistry, electron microscopy) and by transcriptomic analysis.

The results are likely to be translated into clinically relevant observations that will contribute to optimize treatments in each patient.