



HAL
open science

Étude de la différenciation des lymphocytes T CD8 par des approches moléculaires au niveau cellule unique

Margaux Prieux

► **To cite this version:**

Margaux Prieux. Étude de la différenciation des lymphocytes T CD8 par des approches moléculaires au niveau cellule unique. Immunologie. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2023. Français. ⟨NNT : 2023ENSL0021⟩. ⟨tel-04167355⟩

HAL Id: tel-04167355

<https://theses.hal.science/tel-04167355v1>

Submitted on 20 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



Numéro National de Thèse : 2023ENSL0021

THESE

en vue de l'obtention du grade de Docteur, délivré par
l'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON

École Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Soutenue publiquement le 10/05/2023, par :

Margaux PRIEUX

Étude de la différenciation des lymphocytes T CD8 par des approches moléculaires au niveau cellule unique

Devant le jury composé de :

PACE, Luigia	Professeur	IIGM	Rapporteuse
DALOD, Marc	Directeur de recherche	CIML	Rapporteur
VALLOT, Céline	Directrice de recherche	Institut Curie	Examinatrice
GENESTIER, Laurent	Directeur de recherche	CIRI	Examineur
MARVEL, Jacqueline	Directrice de recherche	CIRI	Directrice de thèse
GANDRILLON, Olivier	Directeur de recherche	LBMC	Co-directeur de thèse

Margaux PRIEUX



Étude

de la **DIFFÉRENCIATION**

des *lymphocytes*

T CD8

par des

approches *MOLÉCULAIRES*

Thèse de doctorat de l'université de Lyon
Opérée par l'ENS de Lyon

au niveau
**CELLULE
UNIQUE**



Le travail de cette thèse a été réalisé dans l'Unité du Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI) ;

Inserm U1111 - CNRS UMR5308 - Université Claude Bernard - ENS de Lyon



Une partie du travail de cette thèse a été réalisé dans l'Unité du Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la Cellule (LBMC) ;

ENS de Lyon – CNRS UMR5239 – Inserm U1293 – Université Claude Bernard

Résumé

Les lymphocytes T (LT) CD8 sont des acteurs clés impliqués dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires et les cellules tumorales. Le stade auquel les LT CD8 mémoires divergent des cellules effectrices reste discuté bien qu'un engagement précoce de la mémoire soit relativement admis. Les cellules mémoires générées sont d'une importance cruciale pour conférer une protection efficace et durable à l'hôte qui est notamment dépendante de la qualité fonctionnelle des cellules. Le contexte d'immunisation influence notamment les voies que suivent les LT jusqu'à la mémoire. En effet, la persistance d'un antigène, dans le contexte d'une infection chronique ou d'un cancer, entraîne les LT CD8 activés dans une voie de différenciation parallèle à la voie de l'infection aiguë et mène à un dysfonctionnement des cellules mémoires. Nous avons ainsi étudié d'une part à quel stade les précurseurs de la mémoire sont générés et d'autre part, quel était l'impact d'une stimulation transitoire par une tumeur sur la qualité des LT CD8 mémoires par des approches en cellule unique. Pour ce premier axe, les outils de *machine learning* appliqués à des données de scRNA-seq ont permis de mettre en évidence que les précurseurs de la mémoire étaient générés en continu après une infection virale aiguë avec un nombre croissant et acquérant les fonctions effectrices au cours du temps. Afin d'étudier la génération des précurseurs de la mémoire à des étapes précoces post-activation, nous avons développé un modèle d'activation des LT CD8 *in vitro* en présence ou absence d'IL-2 exogène (IL-2ex). Les données de scRNA-seq ont montré que l'IL-2ex retarde la transition précoce des cellules T CD8 activées en cellules précurseurs de la mémoire, leur permettant d'acquérir des fonctions effectrices qui sont imprimées dans les cellules mémoires qu'elles génèrent. Pour le second axe, nous avons démontré qu'une stimulation unique par une tumeur était suffisante pour diminuer l'immunité protectrice des LT CD8 mémoires induits par la tumeur qui présentent des marqueurs d'épuisement et un défaut fonctionnel.

Mots clés : lymphocytes T CD8, mémoire immunitaire, trajectoire de différenciation, qualité fonctionnelle, transcriptomique en cellule unique

Summary

CD8 T cells are key players involved in the fight against intracellular pathogens and tumor cells. The stage at which memory CD8 T cells diverge from effector cells remains controversial, although early memory engagement is relatively accepted. The memory cells generated are of crucial importance for conferring effective and lasting protection to the host, which is dependent on the functional quality of the cells. The immunization context notably influences the pathways that T cells follow to memory. Indeed, the persistence of an antigen in the context of a chronic infection or cancer, drives the activated CD8 T cells in a differentiation pathway parallel to the pathway of the acute infection and leads to dysfunctional memory cells. We thus first studied at what stage the memory precursors cells are generated and, secondly, what was the impact of a transient stimulation by a tumor on the quality of memory CD8 T cells by single cell approaches. For this first axis, we demonstrate, using machine learning tools applied to scRNA-seq, that memory precursors cells were continuously generated after an acute viral infection with an increasing number and acquiring effector functions over time. In order to study the generation of memory precursors cells at early post-activation stages, we have developed an in vitro model of CD8 T cells activation in the presence or absence of exogenous IL-2 (exIL-2). The scRNA-seq data showed that exIL-2 delays the early transition of activated CD8 T cells into memory precursor cells, allowing them to acquire effector functions that are imprinted in the memory cells they generate. For the second axis, we demonstrated that a single stimulation by a tumor was sufficient to decrease the protective immunity of tumor-induced memory T cells that exhibit markers of exhaustion and a functional defect.

Key words: CD8 T cells, immunological memory, cell differentiation trajectory, functional quality, single-cell transcriptomics

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les rapporteurs, le Dr Luigia Pace et le Dr Marc Dalod ainsi que les examinateurs, le Dr Céline Vallot et le Dr Laurent Genestier, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie également les membres de mon Comité de Suivi de Thèse, le Dr Pierre Sujobert et le Dr Pierre Milpied, qui ont suivi l'évolution de mon travail de thèse.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, Jacqueline Marvel, pour son accompagnement pendant ces 4 ans. Elle m'a donné l'opportunité de développer mes connaissances et mes compétences à la fois en immunologie qui étaient limitées et en bio-informatique. Merci pour m'avoir formée mais surtout pour m'avoir fait confiance. Je la remercie aussi pour ses précieux conseils, sa disponibilité et sa patience, et pour tout ce que j'ai pu apprendre sur le plan scientifique et culturel.

Je remercie également Olivier Gandrillon qui a d'abord été mon encadrant de stage de Master 2 et qui a ensuite co-encadré ma thèse. C'est dans son équipe que je me suis pleinement initiée à la bio-informatique et que j'ai découvert la modélisation mathématique, ce qui a été fort enrichissant. Merci pour sa bienveillance, ses conseils avisés et l'autonomie qu'il m'a laissée dans mon apprentissage.

Je remercie ensuite sincèrement toute l'équipe de Jacqueline Marvel. Les premiers à m'avoir chaleureusement accueillie et intégré dans l'équipe : Daphné, Sophia, Séverine, Yann, Christophe et Shaoying. Merci pour votre aide, conseils, échanges et aussi votre bonne humeur qui a toujours été au rendez-vous même dans des drôles de périodes comme nous l'avons connu avec le confinement Covid. Daphné, un grand merci pour toute l'aide que tu m'as apportée sur les projets. Tu as été une super formatrice que ce soit en expérimentation animale ou en cytométrie en passant par un peu de culture cellulaire. Merci pour ta patience et ta bienveillance. Je n'oublie bien évidemment pas l'équipe « des jeunes » : Adèle, Maxence et Victor avec qui j'ai passé de très bons moments. Merci pour vos conversations parfois délirantes, vos blagues presque quotidiennes mais aussi votre soutien.

Je remercie ensuite l'équipe d'Oliver Gandrillon : Elodie, Sandrine, Catherine, Gérard, Laurent, Franck, Camille, Elias, Matteo, Maxime, Souad, Thao. Merci pour vos échanges, vos conseils, votre bienveillance et aussi votre soutien sur les problèmes de single-cell que j'ai pu rencontrer. La diversité des disciplines dans cette équipe a été fort enrichissante même si les maths c'est encore difficile à comprendre, j'ai beaucoup appris.

Merci également à toutes les personnes que j'ai rencontrées et côtoyées au CIRI ou au LBMC, et avec qui j'ai eu plaisir à échanger sur des sujets divers et variés. Merci à Simon De

Bernard avec qui nous avons collaboré sur les analyses de single-cell RNA-seq. Merci à Frédéric Flamant qui m'a donné l'envie de poursuivre sur le chemin de la génomique en recherche après mon stage de Master 1 et pour ces échanges depuis ces 5 dernières années.

Je remercie également les équipes des différents plateaux techniques de la SFR notamment l'animalerie AniRA-PBES et le plateau de cytométrie AniRa-cytométrie, qui ont contribué à la réalisation de ce projet de thèse.

Je remercie mes amis pour tous les merveilleux souvenirs que je peux avoir avec chacun : Justine et Romain, Romain, Marie, Théo, Thomas, Rébecca et Mickaël, Axèle et Jean, Salomé et Jolan, Morgane J, Sevda et Ogüz, Morgane H, Léna, Brigitte et Bernard, Brigitte et Serge. Justine, ma Poupette, depuis 14 ans que l'on se connaît, c'est toujours une amitié sans faille. Merci pour ton écoute, ton soutien et tout simplement d'être là à mes côtés.

Merci à ma belle-famille pour tous les bons moments passés et ceux que l'on passera encore : mes beaux-parents, mes belles-sœurs et beaux-frères, mes 2 petites nièces Lise et Charlie, et une pensée pour notre mamie Nicole.

Je remercie du fond du cœur mon frère et mes parents, soutien indéniable dans les bons comme dans les moments les plus difficiles. Vous avez toujours cru en moi, m'avez soutenue dans mes choix, rassurée et encouragée. C'est en partie grâce à vous que j'en suis arrivée là. Merci aussi à ma mamie qui je sais est fière de moi.

Enfin, je remercie mon mari, mon moteur, ma force, mon pilier au quotidien. Je n'ai aucun doute que tu seras le meilleur des papas.

Table des matières

RESUME	5
SUMMARY	6
REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIERES	9
LISTE DES ABREVIATIONS	12
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLES	15
AVANT-PROPOS	16
INTRODUCTION	18
I. LES LYMPHOCYTES T CD8, CELLULES DE L'IMMUNITE ADAPTATIVE	18
1. Les lymphocytes T CD8 naïfs : de l'origine à leur survie	18
1.1 Origine, développement et maturation des lymphocytes T CD8	18
1.2 Maintenance et circulation des lymphocytes T CD8 naïfs	19
1.2.1 La maintenance des LT CD8 naïfs est régulée par différents signaux	19
1.2.2 Patrouille entre sang et OLI, et migration dans le ganglion lymphatique	20
2. Dynamique de la réponse T CD8 primaire face à une infection virale	22
2.1 Activation des lymphocytes T CD8 naïfs	22
2.1.1 Interaction avec la cellule présentatrice d'antigène	22
2.1.2 Mise en place des 3 signaux	24
2.1.3 L'aide des lymphocytes T CD4 pour une activation optimale	28
2.1.4 Cytokine à chaîne γ : importance de l'interleukine 2 (IL-2)	28
2.2 Prolifération et différenciation en cellules effectrices	31
2.2.1 Expansion clonale	31
2.2.2 Circulation et recrutement au site de l'infection	32
2.2.3 Acquisition des fonctions effectrices et cytolyse	33
2.3 Contraction clonale	35
2.4 Génération des cellules mémoires	36
2.4.1 Persistance de la mémoire : des cellules à longue durée de vie	37
2.4.2 Des cellules en nombre élevé et dans un état « hyper-répondeur »	38

3. Hétérogénéité fonctionnelle de la mémoire	40
3.1 Qualité des mémoires	40
3.2 Dysfonctionnement des cellules mémoires par épuisement	42
II. A QUEL(S) STADE(S) LES CELLULES MEMOIRES DIVERGENT DES CELLULES EFFECTRICES ?	44
1. Les modèles de différenciation des lymphocytes T CD8 proposés	44
1.1 Modèles linéaires	44
1.1.1 <i>Modèle de la force des signaux</i>	44
1.1.2 <i>Modèle du potentiel décroissant</i>	45
1.1.3 <i>Modèle de l'épuisement progressif</i>	45
1.2 Modèles branchés	48
1.2.1 <i>Modèle de la division asymétrique</i>	48
1.2.2 <i>Modèle SLEC/ MPEC</i>	48
1.2.3 <i>Modèle NELM linéaire progressif branché</i>	49
1.2.4 <i>Autre modèle super-branché</i>	51
2. Facteurs de transcription et régulateurs épigénétiques : des acteurs moléculaires de la différenciation effecteur/ mémoire	52
2.1 Acteurs moléculaires renforçant la différenciation vers le phénotype effecteur	53
2.2 Acteurs moléculaires renforçant la différenciation vers le phénotype mémoire	54
3. Existence de cellules souches mémoires	56
3.1 Les lymphocytes T mémoires souches (TSCM)	56
3.2 Les précurseurs de la mémoire (MP)	58
3.2.1 <i>Dans un contexte d'infection aiguë</i>	58
3.2.2 <i>Dans un contexte d'infection chronique</i>	59
III. ANALYSE DU TRANSCRIPTOME A L'ECHELLE DE LA CELLULE UNIQUE POUR L'ETUDE DE LA DIVERSITE DES LYMPHOCYTES T CD8	61
1. Technologies de single-cell RNA-seq	61
2. Méthodes computationnelles pour l'analyse de données de single-cell RNA-seq	66
2.1 Pré-traitement des données	67
2.2 Contrôle qualité	68
2.3 Normalisation des données	69
2.4 Visualisation des données et clustering	69

2.5	Analyse de l'information biologiques des données	70
2.5.1	<i>Différentiel d'expression</i>	70
2.5.2	<i>Inférence de trajectoire et réseaux de gènes</i>	71
OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE		73
RESULTATS		75
I. ÉTUDE DU STADE AUQUEL LES LT CD8 ACTIVÉS S'ENGAGENT DANS LE DESTIN MEMOIRE ET DIVERGENT DES EFFECTEURS PAR DES APPROCHES EN CELLULE UNIQUE		75
1.	Article 1 – Génération des précurseurs de la mémoires T CD8 après infection virale et persistance <i>in vivo</i>	75
2.	Article 2 – Impact de l'IL-2 exogène sur la génération des précurseurs de la mémoire à des étapes précoces post-activation des LT CD8 <i>in vitro</i>	121
II. CARACTERISATION DE L'HETEROGENEITE FONCTIONNELLE DE LA MEMOIRE PAR DES APPROCHES EN CELLULE UNIQUE		153
1.	Article – Impact d'une stimulation transitoire par une tumeur sur la qualité fonctionnelle des LT CD8 mémoires	153
DISCUSSION		181
I. LA DIFFERENCIATION DES LT CD8 IN VIVO ET IN VITRO		181
1.	Identification du stade auquel les précurseurs de la mémoire sont générés	181
2.	L'IL-2 : régulateur du processus de génération de précurseurs de la mémoire	186
3.	Identification des cellules précurseurs de la mémoire dans nos modèles	189
II. QUALITE DES LT CD8 MEMOIRES GENEREES		190
ANNEXES		195
I. ARTICLES		195
1.	Institut des Sciences Biologiques du CNRS (INSB) : « A quelle(s) étape(s) après infection les cellules T CD8 mémoires sont-elles générées ? »	195
2.	Science Pour tous de l'UCBL : « la bio-informatique, des données au sens biologique »	198
II. POSTER		203
1.	Congrès IRCI 2022 : « CD8 memory precursor cell generation is a continuous process »	203
RÉFÉRENCES		204

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
APC	Analyse en Composante Principale
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
cDC	Cellule dendritique conventionnelle
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPAp	Cellule Présentatrice d'Antigène Professionnelle
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CTLA4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DC	Cellule dendritique (<i>dendritic cell</i>)
DE	Différentiel d'expression
DN	Double négatif
DP	Double positif
EEC	Cellule effectrice précoce (<i>Early effector cell</i>)
FT	Facteur de transcription
GFP	Protéine fluorescente verte
GRN	Réseau de régulation de gènes (<i>Gene regulatory network</i>)
Gzm	Granzyme
HEV	Veinule à endothélium épais (<i>high endothelial venules</i>)
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IVT	Transcription <i>in vitro</i> (<i>In vitro transcription</i>)
KO	Knockout
LB	Lymphocyte B
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire (<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>)
LCMV-A	LCMV Armstrong
LCMV-C	LCMV Clone13
LT	Lymphocyte T
MP	Cellule précurseur de la mémoire
MPEC	Cellule effectrice précurseur de la mémoire (<i>Memory precursor effector cell</i>)
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NFAT	Facteur nucléaire des lymphocytes T actives (<i>Nuclear factor of activated T cells</i>)
OLI/II	Organe lymphoïde primaire / secondaire
PD1	Protéine 1 de la mort cellulaire programmée (<i>Programmed cell death protein1</i>)

PCR	Réaction de polymérase en chaine (<i>Polymerase chain reaction</i>)
Pre-T	Précurseur T ou thymique
Pro-T	Progéniteur T ou thymique
RI	Réponse immunitaire
ScRNA-seq	Séquençage de l'ARN en cellule unique (<i>Single-Cell RNA-sequencing</i>)
SI	Système immunitaire
SLEC	Cellule effectrice à courte durée de vie (<i>Short live effector cell</i>)
SP	Simple positif
TCF1	Facteur de cellules T 1 (<i>T cell factor 1</i>)
TCM	LT mémoires centraux (<i>Central memory T cells</i>)
TCR	Récepteur des cellules T (<i>T cell receptor</i>)
TEC	Cellule épithéliale thymique (<i>Thymic epithelial cell</i>)
TEM	LT mémoires effecteurs (<i>Effector memory T cells</i>)
TNF	Facteur de Nécrose Tumorale (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TRM	LT mémoires résidents (<i>Tissue-resident memory T cells</i>)
TSCM	Cellule souche à mémoire T (<i>T memory stem cell</i>)
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
UMI	Identifiant moléculaire unique (<i>Unique molecular identifier</i>)
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
VV	Virus de la vaccine (<i>Vaccinia virus</i>)

Liste des figures

Figure 1 : Développement et maturation des LT dans le thymus.....	19
Figure 2 : ENTREE des LT dans le ganglion lymphatique par les veinules a endothélium epais (HEV)	21
Figure 3 : Structure d'un ganglion lymphatique	22
Figure 4 : Dynamique de la réponse T CD8 lors d'une infection virale.....	22
Figure 5 : Structure de la synapse immunologique LT CD8/ cellule dendritique	24
Figure 6 : Complexe TCR/ CD3 et transduction du signal	25
Figure 7 : Activation ou inhibition des LT CD8 médiés par les 3 signaux delivres par la cellule dendritique	27
Figure 8 : Signalisation Via le recepteur à l'IL-2	29
Figure 9 : role de l'IL-2 sur la differenciation des cellules.....	31
Figure 10 : circulation des LT CD8 entre le ganglion et le site d'infection.....	33
Figure 11 : Mise en place de la synapse secretoire entre la Lt CD8 et la cellule cible	34
Figure 12 : Modifications epigenetiques via la modification des histones	39
Figure 13 : Modeles de differenciation lineaire.....	47
Figure 14 : Modèles de differenciation brancheE	50
Figure 15 : Modele super-branche	52
Figure 16 : Facteurs de transcription regulant la differenciation effecteur ou mémoire.....	56
Figure 17 : Schéma des etapes de preparation des banques des differentes methodes de scRNA-seq	62
Figure 18 : Isolement des cellules par microfluidique	63
Figure 19 : Principe du sequencage illumina.....	65
Figure 20 : Flux de travail d'analyse de donnees de single-cell RNA-seq.....	67
Figure 21 : Classification des cellules dans les phases du cycle cellulaire et expression de mki67.....	182
Figure 22 : Analyse par facs de l'Expression du Gzmb par les mémoires BrdU+	184
Figure 23 : Evaluation des fonctions effectrices entre les LT CD8 activés en présence ou absence d'IL-2ex.....	188
Figure 24 : Phénotype KLRG1/ IL7R des LT CD8 P14 vs LT CD8 F5	190
Figure 25 : Capacité de migration des LT mémoires apres rechallenge virale	191
Figure 26 : Expression des genes codant pour les proteines marqueurs des cellules epuisees progenitrices et intermediaires.....	194

Liste des tables

Table 1 : Caractéristiques des principales populations de IT CD8 mémoires chez la souris	41
Table 2 : Comparaison des propriétés entre des LT CD8 mémoires fonctionnelles et des LT CD8 mémoires épuisées	43
Table 3 : comparaison du phénotype des Tscm aux Lt naïfs, effecteurs et mémoires chez l'homme	58
Table 4 : Comparatif des méthodes de scRNA-seq selon les caractéristiques mentionnées	66

Avant-propos

Le système immunitaire (SI) est un réseau composé d'organes, de cellules et de molécules ayant pour fonction principale de défendre l'organisme contre des agents pathogènes (virus, bactéries, parasites), des toxines ou des cellules cancéreuses. Il se subdivise en 2 systèmes interconnectés : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Le SI inné se met en place dès les premières heures de reconnaissances des signaux étrangers et constitue ainsi la première barrière de défense de l'organisme. Cependant, cette réponse peu spécifique n'est pas toujours suffisante pour l'élimination des pathogènes et nécessite en parallèle la mise en place d'une réponse immunitaire (RI) adaptative. Celle-ci est plus lente mais spécifique du pathogène et permet une protection au long terme par l'établissement d'une mémoire immunitaire.

La RI adaptative est ainsi caractérisée par la participation des lymphocytes B responsables de la réponse humorale par la différenciation en plasmocytes et production d'anticorps, et les lymphocytes T (LT) participant à l'immunité à médiation cellulaire. Ces LT sont subdivisés en 2 types à savoir les LT CD4 qui jouent un rôle de régulateur et « d'aide » à l'activation d'autres cellules du SI, et les LT CD8 destinés à devenir des cellules cytotoxiques. Ces LT CD8 sont en effet capables, après activation par reconnaissance de l'antigène de l'agent pathogène ou de la tumeur, de migrer au site de l'infection et de détruire les cellules infectées ou tumorales par lyse des cellules. Une fois le pathogène éliminé, les LT CD8 se différencient en cellules dites mémoires conférant à l'hôte une protection contre le pathogène en question. En effet, la spécificité des LT CD8 mémoires réside dans leur capacité à se maintenir à long terme, leurs propriétés migratrices accrues et fonctions effectrices améliorées permettant des réponses plus rapides et plus efficaces en cas de réinfection par le même pathogène.

Malgré des caractéristiques communes, les LT CD8 mémoires constituent une population très hétérogène. Les différentes sous-populations décrites, identifiées initialement sur la base d'expression de protéines à leur surface, se distinguent par leurs capacités migratoires et effectrices. Différents facteurs/signaux peuvent influencer les voies que suivent les LT CD8 pour se différencier en cellules mémoires. Notamment, le contexte d'immunisation (infection chronique/tumeur) aboutit à l'expression de molécules inhibitrices à la surface des LT CD8 compromettant leur réponse et diminuant la protection associée à la mémoire. De plus, suite à l'activation des LT CD8, le stade auquel les LT mémoires sont générés reste discuté, plusieurs études suggérant que cet engagement pourrait avoir lieu à différentes étapes de la réponse.

L'essor des technologies en cellule unique et des méthodes computationnelles a permis une grande avancée dans l'exploration de l'hétérogénéité du SI apportant de nouvelles connaissances sur la composition, la dynamique et les mécanismes de régulations cellulaires. Ainsi, des approches en cellule unique ont été employées afin d'étudier les mécanismes contrôlant la différenciation et la qualité fonctionnelle des LT CD8 mémoires.

Ces travaux de thèse ont donc pour objectifs de savoir à quel stade de la RI les cellules mémoires sont générées et quels sont les mécanismes moléculaires soutenant la génération de sous-types de mémoires fonctionnellement pertinents. La première partie de ce mémoire permet d'introduire l'établissement de la mémoire des LT CD8 au cours d'une infection, puis le stade auquel les précurseurs de cellules mémoires sont générées et divergent des cellules effectrices est discuté. Enfin, j'introduis les technologies et les méthodes computationnelles pour l'analyse de données de transcriptomique en cellule unique (*Single-cell RNA-seq*). Ce travail bibliographique est suivi des principaux résultats obtenus au cours du doctorat qui sont ensuite discutés.

Introduction

I. LES LYMPHOCYTES T CD8, CELLULES DE L'IMMUNITE ADAPTATIVE

1. Les lymphocytes T CD8 naïfs : de l'origine à leur survie

1.1 Origine, développement et maturation des lymphocytes T CD8

L'hématopoïèse est le mécanisme assurant la production continue et régulière des cellules du sang. Ce processus découle de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et se déroule au niveau de la moelle osseuse chez l'Homme (Till and McCulloch 1961). Ces CSH sont localisées plus particulièrement dans des niches hématopoïétiques générant un micro-environnement (cellules stromales, endothéliales, cytokines, ...) favorable à leur auto-renouvellement et différenciation (Wei and Frenette 2018). Ces cellules sont dites multipotentes et vont notamment donner naissance aux lignées de progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes, à l'origine des lymphocytes. Toutefois, le développement des lymphocytes T nécessite la migration des progéniteurs T au sein du thymus, un organe lymphoïde primaire (OLI), pour y subir leur maturation et sélection (**Figure 1**).

Le thymus est constitué de deux lobes indépendants composés chacun d'une partie périphérique appelée cortex et d'une partie interne, la médulla. Ainsi, les progéniteurs thymiques (pro-T) provenant de la moelle osseuse par le système circulatoire, entrent au niveau de la jonction cortico-médullaire et vont subir plusieurs étapes de différenciation qui correspondent à la recombinaison de leur TCR (T-cell receptor) (récepteur permettant de reconnaître spécifiquement des antigènes) ainsi qu'à l'expression des co-récepteurs CD4 ou CD8 (Casal and Zúñiga-Pflücker 2022). Initialement, ces pro-T sont doubles négatifs (DN) pour les co-récepteurs CD4 et CD8. Ce stade DN est composée de 4 sous-types de thymocytes caractérisés par l'expression de CD44 (protéine d'adhésion) et CD25 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-2) chez la souris. Ainsi, les pro-T DN1 ($CD44^+ CD25^-$) migrent au niveau du cortex et se différencient en DN2 acquérant l'expression de CD25 ($CD44^+ CD25^+$) puis en DN3 ($CD44^{low} CD25^+$). A ce stade, les thymocytes expriment un pré-TCR suite au réarrangement de la chaîne β du TCR et de son association avec une chaîne invariante pré-TCR α (PT α). Ils subissent ensuite la β -sélection telle que si la chaîne β est fonctionnelle, le précurseur T (pré-T) reçoit alors un signal de survie. Il se différencie ainsi en DN4 ($CD44^{low} CD25^-$) puis en cellule double positive (DP) pour les co-récepteurs CD4 et CD8 ($CD4^+ CD8^+$) migrant en parallèle vers la zone cortico-médullaire. La chaîne α du TCR va être réarrangée et s'associer à la chaîne β , remplaçant le PT α , pour former un hétérodimère TCR $\alpha\beta$ complet à la surface des cellules. Les thymocytes immatures subissent ensuite une sélection dite positive (Takaba and Takayanagi 2017). Ainsi, seuls les thymocytes reconnaissant avec une faible affinité le complexe CMH/antigène du soi présenté par les cellules épithéliales thymiques (TEC) recevront un signal de survie et se différencieront en cellules simples positives (SP) CD4 ou CD8 selon leur affinité

avec le CMH de classe II ou I (CMH-II/I) respectivement. Enfin, les thymocytes migrent au niveau de la médulla pour y subir la sélection négative. Cette sélection permet l'élimination par apoptose des lymphocytes reconnaissant avec une forte affinité les complexes CMH/peptides du soi. Ce mécanisme dit de tolérance centrale conduit ainsi à la survie de 20 à 50% des lymphocytes positivement sélectionnés ce qui en fait un des moyens clés pour prévenir l'auto réactivité des LT (Yates 2014).

Suite à ces différentes étapes, les LT CD8 sont dits matures et naïfs puisqu'ils n'ont pas encore rencontré d'antigènes. Ils quittent le thymus pour rejoindre la circulation sanguine et vont recevoir différents signaux pour maintenir le pool de LT CD8 naïfs dans le temps.

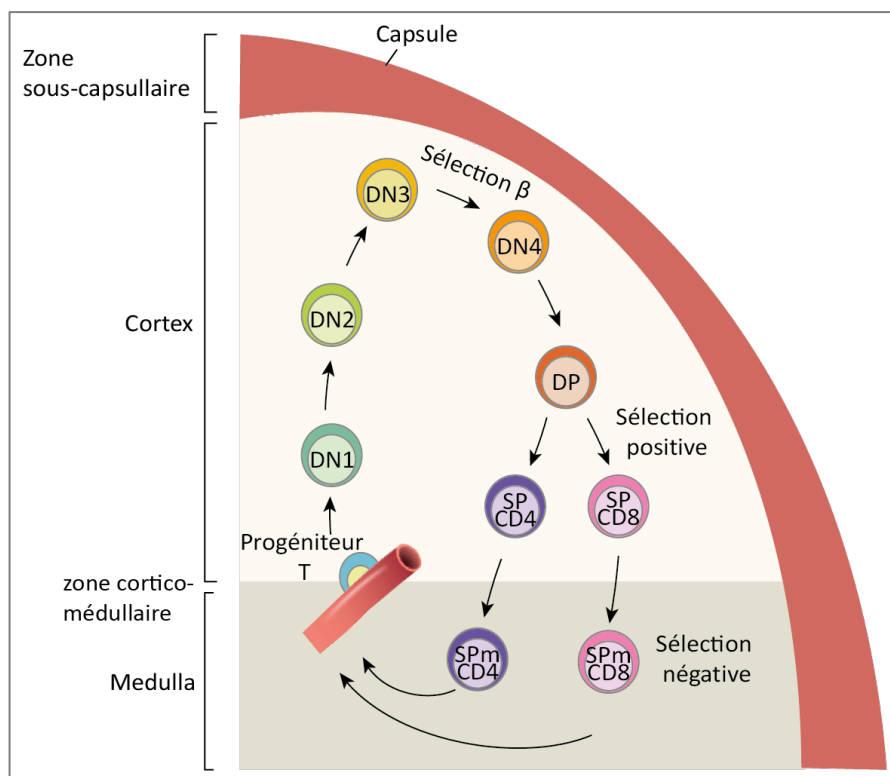


FIGURE 1 : DEVELOPPEMENT ET MATURATION DES LT DANS LE THYMUS

Les progéniteurs T arrivent dans le thymus par la circulation sanguine et se différencient en cellules doubles négatives (DN, cd4- cd8-) DN1, DN2 puis DN3. En périphérie du cortex, les thymocytes subissent la sélection de la chaîne beta de leur TCR. Si celui-ci est fonctionnel, les thymocytes poursuivent leur différenciation en DN4, expriment la chaîne alpha du TCR et acquièrent l'expression des co-récepteurs CD4 et CD8 (stade double positif - DP) tout en migrant vers la zone centrale du cortex. A cette étape, seuls les thymocytes DP reconnaissant avec une faible affinité le complexe CMH/antigène du soi vont survivre (sélection positive) aboutissant ainsi à la génération de cellules simples positives (SP – CD4+ ou CD8+) comportant un TCR fonctionnel. Enfin, ils migrent ensuite dans la médulla et les cellules auto-réactives sont éliminées par un processus de sélection négative. Les lymphocytes matures naïfs quittent ainsi le thymus pour rejoindre la circulation sanguine.

1.2 Maintenance et circulation des lymphocytes T CD8 naïfs

1.2.1 La maintenance des LT CD8 naïfs est régulée par différents signaux

Les LT CD8 naïfs sont des cellules à longue durée de vie dont la demi-vie a été estimée à 6,5 ans chez l'Homme (Vrisekoop et al. 2008). Leur survie dépend notamment de deux signaux cruciaux dont le premier concerne le signal TCR. En effet, les LT CD8 naïfs requièrent une interaction de leur TCR avec le complexe CMH/peptide pour survivre sans que cela n'induit l'activation de la cellule (Kieper, Burghardt, and Surh 2004). Ceci a été mis en évidence par le déclin de la population de LT CD8 naïfs après transfert de ces cellules dans des souris déficientes en CMH-I ou exprimant un haplotype différent de CMH (Tanchot et al. 1997). Cependant, ce signal est insuffisant pour maintenir la survie des LT naïfs qui requièrent un signal cytokinique. Les cytokines agissent comme des messagers assurant un rôle primordial pour la communication entre les cellules du système immunitaire. Tan, et al. ont montré l'importance de l'interleukine 7 (IL7) pour la survie et la prolifération homéostatique des LT CD8 naïfs (Tan et al. 2001). L'activation du récepteur à l'IL7 (IL7R) conduit à l'expression des gènes codant pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1, favorisant ainsi, la survie cellulaire (Opferman et al. 2003; Surh and Sprent 2008). Les cellules stromales localisées au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLII – ganglions lymphatiques, rate, tissus lymphoïdes) sont une source de facteurs de survie. Parmi celles-ci, les cellules réticulaires fibroblastiques seraient une source majeure d'IL7 dans les ganglions lymphatiques (Link et al. 2007). La domiciliation des LT CD8 naïfs dans ces organes est donc essentielle pour maintenir une taille de population stable. En effet, une réduction de l'entrée dans les ganglions par la neutralisation des molécules d'entrée tels que la sélectine CD62L et des intégrines CD11a et CD49d, conduit à une diminution du nombre de cellules T CD8.

1.2.2 Patrouille entre sang et OLII, et migration dans le ganglion lymphatique

Les LT CD8 naïfs sont doués d'une grande capacité de recirculation. Ils patrouillent les OLII à travers le réseau sanguin et lymphatique à la recherche d'antigènes du non soi pouvant être reconnu par leur TCR. Il a été montré que seules 80 à 1200 cellules T par souris disposent d'un TCR spécifique d'un antigène donné (Masopust and Schenkel 2013; Obar, Khanna, and Lefrançois 2008). Le processus de migration des LT naïfs dans les OLII implique des interactions entre molécules d'adhésion (sélectines, intégrines), chimiokines et leurs récepteurs à la surface des veinules à endothélium épais (HEV), porte d'entrée dans les ganglions lymphatiques. Les LT, en roulant au niveau de la surface de l'endothélium, engagent la L-sélectine CD62L exprimée à leur surface qui interagit avec la protéine PNA_d présente sur l'endothélium (Nolz, Starbeck-Miller, and Harty 2011) (**Figure 2**). Le récepteur CCR7 exprimé par les LT est ensuite stimulé par la chimiokine CCL21 induisant l'activation de l'intégrine LFA-1 qui se lie à son ligand ICAM-1 exprimé par l'endothélium. Cette interaction provoque une adhésion ferme du lymphocyte sur l'endothélium puis son extravasation par diapédèse pour entrer dans le ganglion au niveau du paracortex ou zone « T » (**Figure 3**).

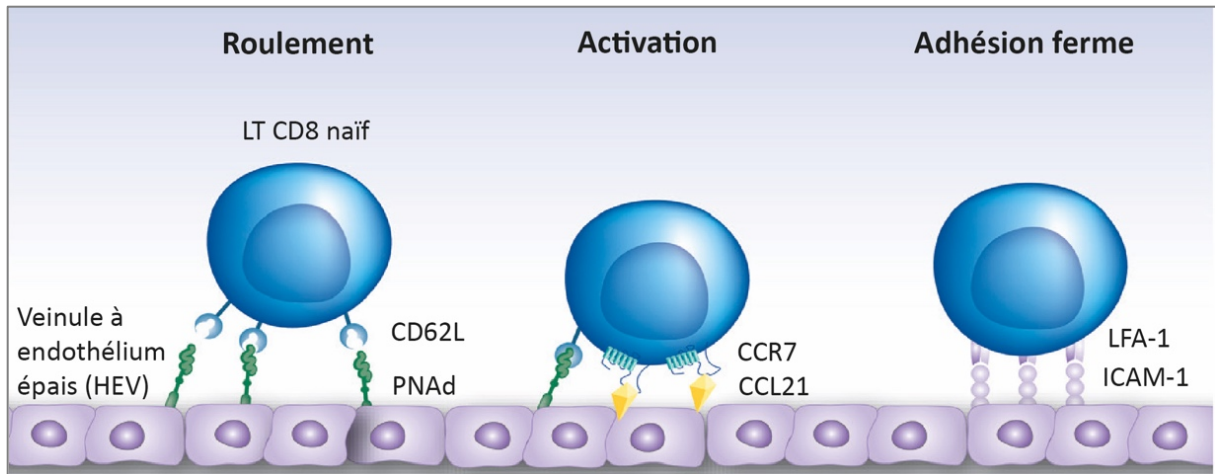


FIGURE 2 : ENTREE DES LT DANS LE GANGLION LYMPHATIQUE PAR LES VEINULES A ENDOTHELIUM EPAIS (HEV)

Les LT CD8 naïfs roulent le long des HEV et la L-sélectine CD62L interagit avec PNAd à la surface de l'endothélium. L'expression et la stimulation du récepteur CCR7 par la chimiokine CCL21 favorisent l'activation de l'intégrine LFA-1 qui interagit avec ICAM-1 à la surface de l'endothélium. Ceci entraîne un attachement du LT à la paroi qui la traverse par diapédèse pour entrer dans le ganglion lymphatique. (Schéma repris et adapté de Nolz, et al. 2011)

Le ganglion offre un environnement propice aux interactions cellulaires. Les chimiokines CCL19 (autre ligand de CCR7) et CCL21 sont exprimées au niveau de la zone T favorisant la mobilité des LT (vélocité > 10 $\mu\text{m}/\text{min}$) qui peuvent rester jusqu'à 12 heures dans les ganglions lymphatiques (Miller et al. 2004; Tomura et al. 2008). De plus, les cellules dendritiques (DC) présentant les antigènes, bien que moins mobiles (2 à 3 $\mu\text{m}/\text{min}$), sont capables d'interagir avec jusqu'à 5000 LT par heure (Miller et al. 2004). Ainsi, la probabilité de reconnaissance d'un antigène par les cellules T est élevée du fait de leur mobilité et de leur localisation.

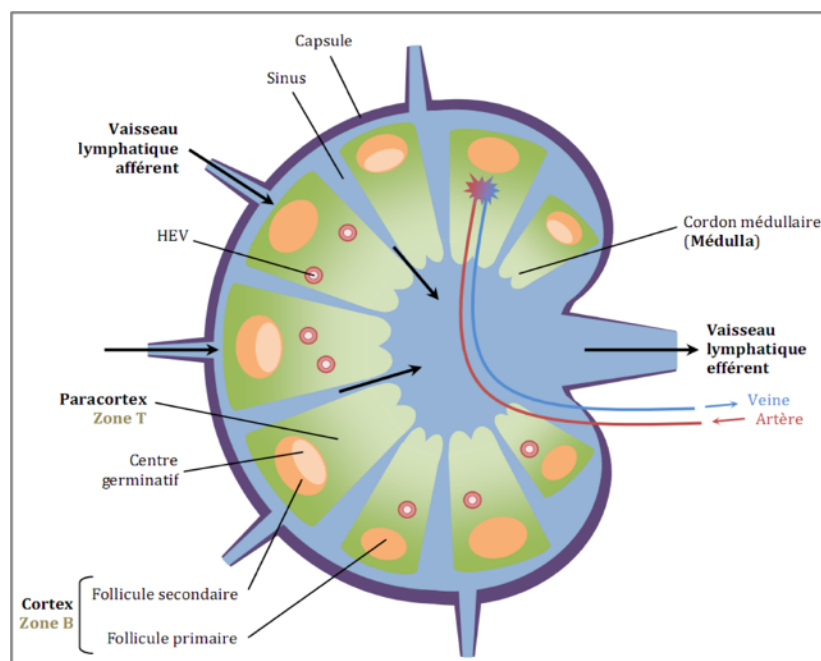


FIGURE 3 : STRUCTURE D'UN GANGLION LYMPHATIQUE

Le cortex correspond à la partie la plus externe du ganglion. Il est composé de follicules primaires et secondaires composés principalement de lymphocytes B (LB). Le paracortex est composé de veinules à endothélium épais (HVE) par lesquels entrent les LT et les LB. C'est le lieu d'interaction entre les LT et les LB ainsi qu'entre les LT et les DC. La médulla, partie la plus interne, contient principalement des macrophages, des plasmocytes (LB activés) et des LB mémoires. (Issu de *Physiologie Humaine Vander*, 6^e édition)

2. Dynamique de la réponse T CD8 primaire face à une infection virale

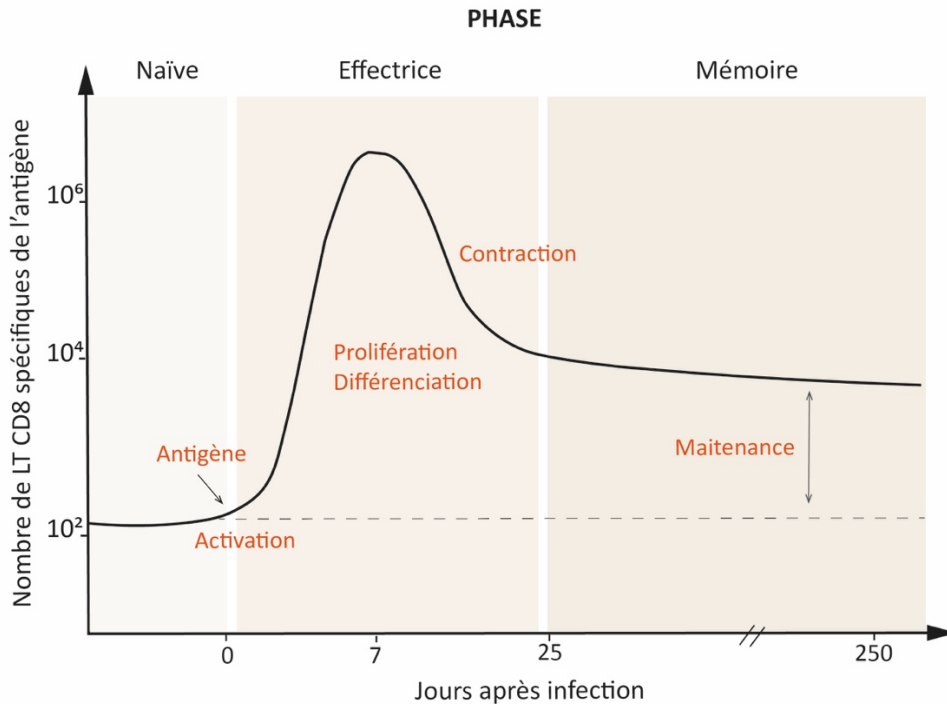


FIGURE 4 : DYNAMIQUE DE LA REPOSE T CD8 LORS D'UNE INFECTION VIRALE

Suite à une infection virale, les lymphocytes T CD8 naïfs s'activent en réponse à la reconnaissance de l'antigène, et prolifèrent et se différencient en cellules effectrices. Ces LT effecteurs acquièrent des fonctions effectrices leur permettant de tuer les cellules infectées. Ils sont ainsi dénommés LT cytotoxiques. En absence d'antigène, la majorité des cellules meurent par apoptose, seule une minorité de cellules survivent et deviennent des cellules à longue durée de vie, appelées mémoires.

2.1 Activation des lymphocytes T CD8 naïfs

2.1.1 Interaction avec la cellule présentatrice d'antigène

L'activation des LT CD8 naïfs requière la présentation d'un antigène par le CMH des Cellules Présentatrices d'Antigènes professionnelles (CPAp) qui regroupent les DC conventionnelles (cDC), les lymphocytes B et les monocytes/ macrophages.

Les DC sont particulièrement efficaces pour l'activation des LT naïfs. Plusieurs populations ont été mises en évidence dont les cDC de type 1 (cDC1) induisant l'activation des LT CD8 (Belz et al. 2004; Jung et al. 2002). Ces DC regroupent les cDC1 CD8⁺, présents dans les OLI, ainsi que des cDC1 103⁺, résidents dans les tissus périphériques et pouvant migrer dans les OLI, et

appartiennent à un sous-type de DC caractérisé par l'expression du récepteur XCR1 (Crozat et al. 2011). Ces DC XCR1⁺ sont particulièrement efficaces pour l'activation des LT CD8 via la présentation d'antigènes exogènes sur le CMH-I appelé présentation croisée qui est décrite ci-dessous (Vu Manh et al. 2015).

Il existe 2 voies de présentation d'antigènes par les cDC. La présentation directe permet de présenter aux LT CD8 des antigènes intra-cellulaires, et donc intervient lorsque la DC est elle-même infectée par le pathogène. Ainsi, les protéines du pathogène vont être dégradées via le protéasome et les peptides résultants seront chargés sur le CMH-I dans le réticulum endoplasmique puis exprimés à la surface cellulaire (Sigal 2016). La seconde voie dite de présentation croisée est une présentation d'antigènes exogènes. Les cDC ont la capacité de phagocyter les débris de cellules mortes comportant les protéines virales ou tumorales. De la même manière que la présentation directe, celles-ci seront dégradées par le protéasome et transférées dans le réticulum endoplasmique pour être associées au CMH-I. Cette voie est dite de chargement via le réticulum endoplasmique. Alternativement, il existe une voie de chargement via le phagosome. En effet, les peptides produits par le protéasome peuvent être directement chargés sur le CMH-I au niveau du phagosome avant transfert du complexe à la membrane plasmique (Joffre et al. 2012).

Les interactions entre les DC et les LT CD8 dans le ganglion lymphatique sont des processus complexes se déroulant en 3 phases (Mempel, Henrickson, and von Andrian 2004). La première phase se caractérise par de brèves interactions entre DC et LT mais suffit pour augmenter le marqueur d'activation CD44 sur les LT CD8. Lors de la deuxième phase, la vitesse des LT diminue fortement stabilisant ainsi les conjugués DC/LT pendant 1h ou plus. Enfin, les contacts deviennent de nouveau transitoires et les LT CD8 migrent et prolifèrent fortement.

La zone de contact entre le DC et le LT est nommée synapse immunologique. Elle est caractérisée par la polarisation du lymphocyte T permettant la relocalisation vers la zone de contact du TCR, de co-récepteurs activateurs ou inhibiteurs et de protéines d'adhésion. Cette zone est structurellement organisée en 3 régions constituées de complexes moléculaires dénommés SMACs (Supra Molecular Activation Clusters; Monks et al. 1998) (**Figure 5**). La zone centrale ou cSMAC concentre principalement le complexe TCR/ CD3 ainsi que les protéines de transduction du signal du TCR. La région périphérique (pSMAC) comporte des molécules d'adhésion telles que LFA-1 ainsi que des molécules associées au cytosquelette. Enfin, la zone distale (dSMAC) est composée des molécules CD44 et CD45 ou encore CD43. Ainsi, la synapse immunologique permet non seulement l'adhérence du LT à la DC mais également la régulation de la signalisation des LT CD8.

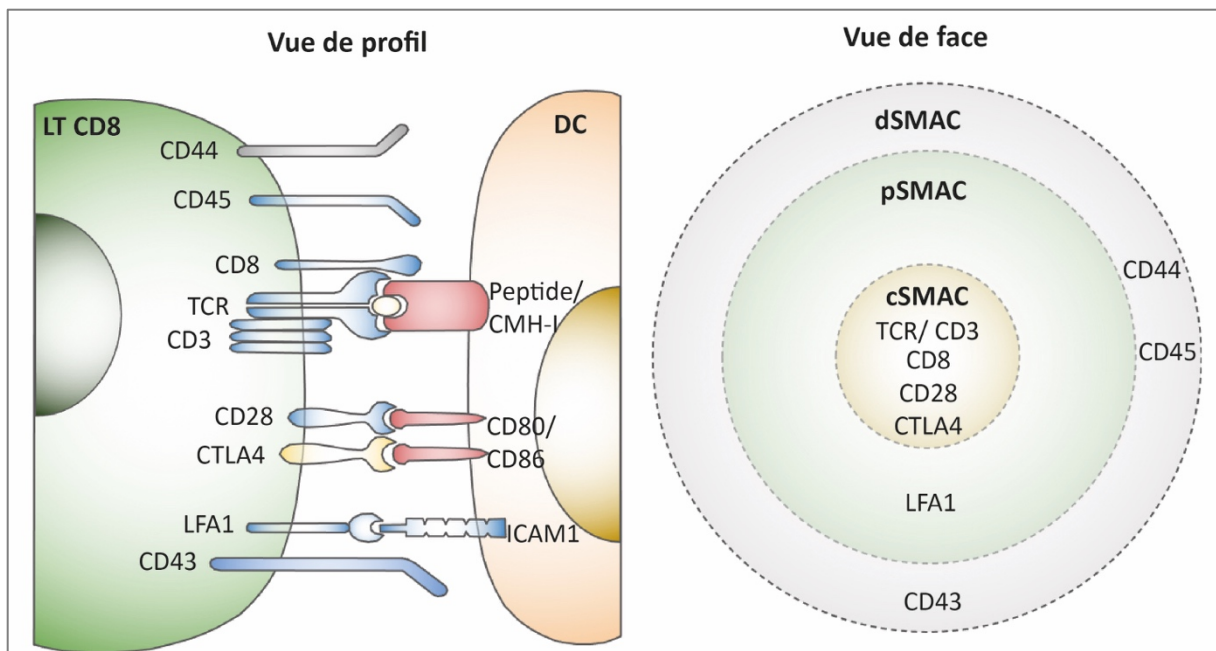


FIGURE 5 : STRUCTURE DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE LT CD8/ CELLULE DENDRITIQUE

Vue de profil : le LT CD8 interagit avec différentes molécules présentes sur la DC. Les molécules activatrices sont représentées en bleues et celles inhibitrices en jaune sur le LT CD8.

Vue de face : la synapse immunologique est organisée structurellement en 3 régions. La région centrale (cSMAC) regroupe le complexe TCR/ CD3 ainsi que les molécules de costimulation activatrice, CD28, et inhibitrice, CTLA4. La zone périphérique ou pSMAC comporte la molécule d'adhésion LFA1. Enfin, la zone distale (dSMAC) comprend les molécules CD44, CD45 et CD43. (Schéma repris et adapté de Huppa and Davis 2003).

2.1.2 Mise en place des 3 signaux

Comme évoqué précédemment, la synapse immunologique permet la transmission de signaux aux LT naïfs. Ces signaux comprennent le signal TCR (1), la costimulation (2) et un troisième signal, le signal cytokinique (3), s'ajoute aux deux premiers pour activer pleinement les LT CD8 naïfs.

(1) Le signal TCR

L'engagement du TCR par le complexe CMH-I/peptide antigénique est indispensable à l'activation des LT CD8 naïfs. Ce récepteur transmembranaire est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β , toutes deux comportant un domaine constant et un domaine variable de type immunoglobuline (Ig). Les parties variables sont formées de 3 boucles appelées régions déterminant la complémentarité (CDR) et ont pour fonction de reconnaître la molécule de CMH-I (CDR1 et CDR2) et le peptide en lui-même (CDR3) (Szeto et al. 2020). Toutefois, l'engagement seul du TCR ne suffit pas pour déclencher une signalisation. Celui-ci est donc associé au complexe CD3 constitué d'homo et d'hétérodimères (CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ et CD3 $\zeta\zeta$). Chaque chaîne comporte des motifs ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation

Motifs) qui subissent une phosphorylation par les tyrosines-kinases de la famille Src (ex Lck) induisant une cascade de signalisation menant à la prolifération et à la différenciation des LT CD8 (Mariuzza, Agnihotri, and Orban 2020) (**Figure 6**).

Plusieurs études suggèrent que la durée de stimulation du TCR ou encore l'affinité et la densité de ligands (peptides) peuvent influencer l'expansion des LT naïfs. Notamment, une courte durée de stimulation du TCR ou une interaction avec un ligand de faible affinité suffisent à induire l'activation des LT naïfs et leur prolifération (Prlic, Hernandez-Hoyos, and Bevan 2006; Zehn, Lee, and Bevan 2009). Toutefois, la capacité de prolifération des LT est fortement corrélée à la durée de stimulation, à l'abondance ainsi qu'à l'affinité du TCR pour son ligand (Prlic et al. 2006; Wherry et al. 1999; Zehn et al. 2009). De plus, Solouki, et al. ont mis en évidence plus récemment que la réduction de la force du signal (régulée par la tyrosine kinase ITK) ainsi que l'interaction avec un ligand de faible affinité accélèrent la différenciation des LT CD8 mémoires bien que ces deux paramètres jouent un rôle distinct dans la modulation du développement de la mémoire (Solouki et al. 2020).

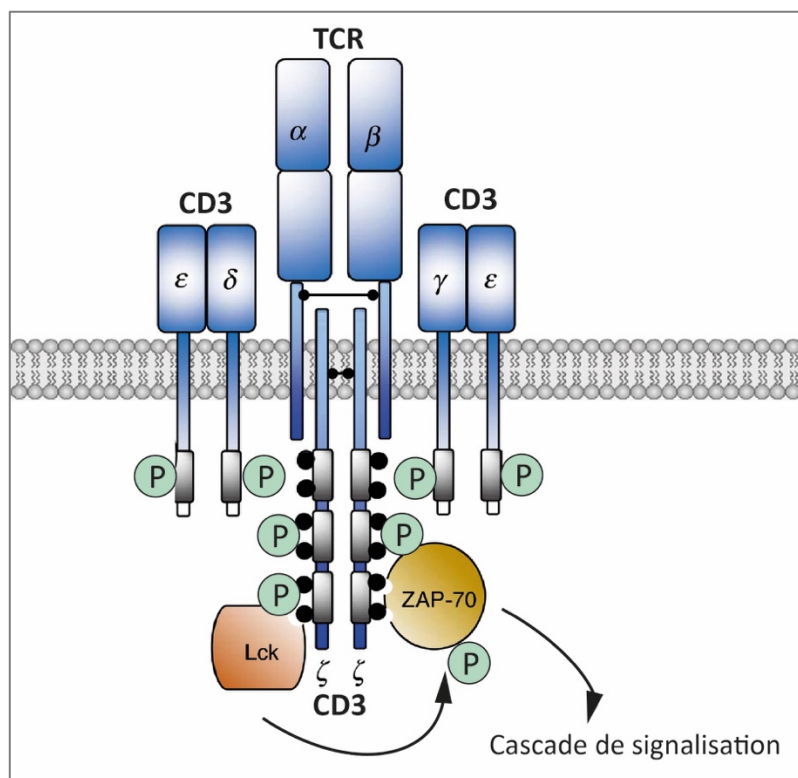


FIGURE 6 : COMPLEXE TCR/ CD3 ET TRANSDUCTION DU SIGNAL

Le TCR est associé au complexe CD3 composée de 4 chaînes polypeptidiques différentes. Après engagement du TCR dans la reconnaissance du complexe CMH-I/peptide, les motifs ITAMs présents sur les queues intracytoplasmiques de chaque chaîne du CD3 sont phosphorylés par la tyrosine-kinase Lck. Zap-70 reconnaît et se lie sur les motifs ITAMs phosphorylés et est elle-même phosphorylée par Lck. Ce processus entraîne une cascade de signalisation favorisant l'adhésion cellulaire, le réarrangement du cytosquelette d'actine ainsi que l'activation de voies impliquées dans l'induction de l'expression de gènes associés à la

prolifération et l'acquisition de fonctions effectrices. (Schéma repris et adapté de Ngoenkam, Schamel, and Pongcharoen 2018)

(2) Le signal de costimulation

Bien que crucial, le signal TCR n'est pas suffisant pour induire une réponse proliférative des LT et nécessite un signal de costimulation. En effet, l'absence de signal 2 conduit à l'anergie du lymphocyte définie comme une absence de réponse à la restimulation.

Il existe plusieurs molécules de costimulation pouvant être activatrices ou inhibitrices (**Figure 7**).

La voie prédominante d'activation est celle impliquant le récepteur CD28, constitutivement exprimé sur le LT, et ses ligands CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2), dont l'expression est induite ou constitutive respectivement. Ainsi, la maturation des DC via la reconnaissance de motifs associés aux pathogènes (PAMPs – Pathogen Associated Molecular Patterns) reconnu par les récepteurs PRR (Pattern Recognition receptors) permet l'induction de CD80 et l'augmentation de l'expression de CD86 (Hathcock et al. 1994; Sharpe and Freeman 2002). La famille des récepteurs au TNF (facteur de nécrose tumorale) est la 2^e plus grande famille de molécules de costimulation. Elle comprend notamment CD40 (exprimé par la DC) et son ligand CD40L (CD40L - présent sur le LT) induit par le signal CD28. L'interaction de CD40/CD40L conduit à la régulation à la hausse du ligand CD86 (Yang and Wilson 1996).

Différentes voies de signalisation sont activées en réponse à ces signaux de costimulation aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B, NFAT et AP1 favorisant la production de cytokines, la survie ou encore l'expression de gènes associés aux fonctions effectrices (Chen and Flies 2013). Ainsi, le signal de costimulation par CD28 conduit à la production d'ARNm de multiples lymphokines/ cytokines telles que l'interleukine 2 (IL-2), l'Interféron γ (IFN- γ) ou encore le TNF α (Thompson et al. 1989). Il promeut également la survie cellulaire par induction de l'expression du membre de la famille des protéines Bcl2, Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) (Boise et al. 1995).

Parallèlement à ces signaux activateurs, d'autres ont un effet inhibiteur sur l'activation du LT CD8 comme le récepteur CTLA4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4) ou encore PD1 (**Figure 7**). Le récepteur CTLA4 a la particularité d'interagir avec les mêmes ligands que CD28 à savoir CD80 et CD86 mais avec une affinité plus haute. En revanche, son expression est induite en réponse à la stimulation du LT (environ 48h après) (Krummel and Allison 1995). Le signal résultant de l'interaction de CTLA4 avec ses ligands conduit notamment à l'inhibition de la production de l'IL-2 et de la prolifération. L'inhibiteur PD1 est également exprimé sur des cellules activées de manière transitoire et interagit avec des ligands homologues de B7, PDL1 (B7H1) et PDL2 (B7DC). Son expression module l'activité des LT CD8 en inhibant le signal TCR. Toutefois, son expression est nécessaire afin d'équilibrer la réponse entre suractivation et inhibition. En effet, Pauken, et al. ont démontré que l'absence de signal PD1 lors d'une infection virale aigüe par le virus de la grippe menait à une suractivation des LT CD8 et une accélération de la clairance virale altérant le développement des cellules mémoires (Pauken et al. 2020).

Ainsi, l'ensemble de ces signaux de costimulation participe à déterminer le devenir des cellules T.

(3) Le signal cytokinique

Un 3^e signal médié par des cytokines est nécessaire pour une activation complète des LT. Il correspond à la liaison d'IL-12 ou d'IFN de type I (IFN- α/β) secrétés par les DC (**Figure 7**). Curtsinger, et al. ont mis en évidence l'implication de l'IFN-I dans l'augmentation de l'expansion clonale des LT CD8 après stimulation antigénique et en présence d'un signal de costimulation via CD80 (Curtsinger et al. 2005). Les niveaux d'expansion des cellules étaient comparables à celles stimulées par l'IL-12. Ainsi, les deux signaux agissent de manière similaire mais ne sont pas cumulatifs. Leur étude démontre également que l'IFN-I promeut les fonctions effectrices notamment par le développement de l'activité cytolytique et l'induction d'IFN γ dont la production est augmentée en combinaison avec l'IL-12. L'IFN-I et l'IL-12 régulent à la hausse un nombre important de gènes dont le granzyme B (GzmB) et la perforine (Prf1), essentiels au mécanisme de cytotoxicité. Kolumam, et al. ont étudié l'impact de la réponse à l'infection par la souche Armstrong du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV-A) générant une infection aiguë chez des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN-I, et ont montré que l'absence de signalisation par l'IFN-I réduisait drastiquement l'expansion clonale des LT CD8 et que le nombre de cellules mémoires générées était réduit d'un facteur 100 par rapport aux souris contrôles (Kolumam et al. 2005). Ce défaut d'expansion et de génération de mémoire n'est cependant pas le résultat d'une altération de la prolifération mais un défaut de survie cellulaire.

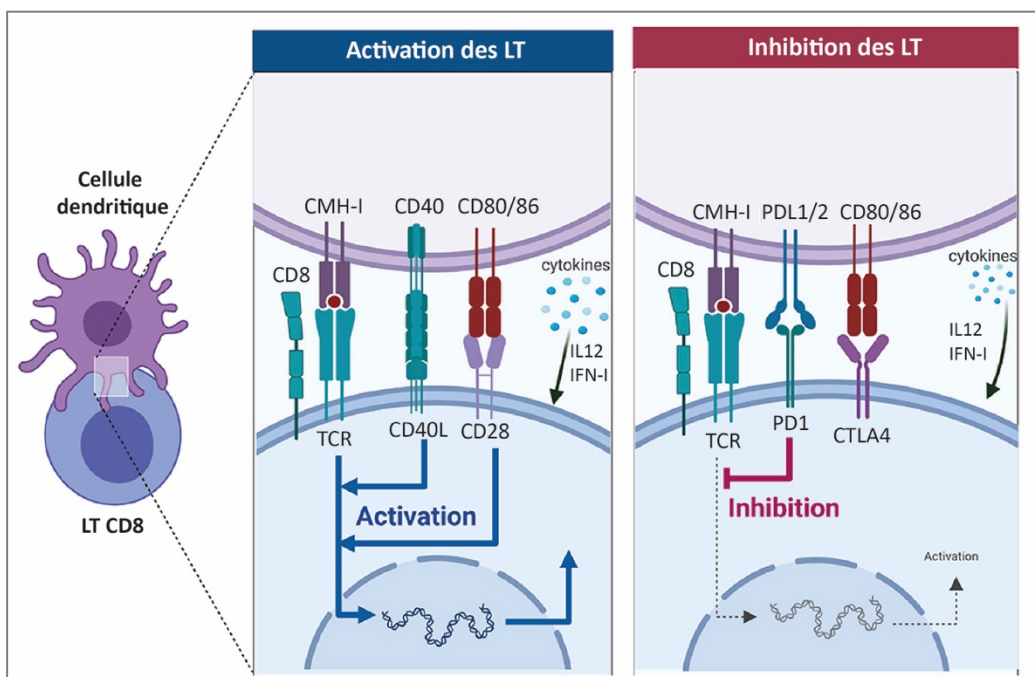


FIGURE 7 : ACTIVATION OU INHIBITION DES LT CD8 MEDIÉS PAR LES 3 SIGNAUX DELIVRES PAR LA CELLULE DENDRIQUE

Activation des LT : trois signaux sont nécessaires à l'activation optimale du LT CD8. Le 1^{er} correspond à la reconnaissance par le TCR du complexe CMH-I/peptide exprimé par la DC. Le second est un signal de costimulation passant par la reconnaissance des ligands CD80/86 par la molécule CD28 ainsi que par l'interaction entre CD40 et son ligand (CD40L). Enfin, la DC sécrète des cytokines telles que l'IL-12 et l'IFN- γ constituant ainsi le 3^e signal. L'ensemble de ces signaux aura pour effet d'induire la transcription de gènes associés à la prolifération, la survie et la différenciation des LT. Inhibition des LT : les signaux de costimulation peuvent être inhibiteurs et passent par les interactions de CD80/86 et CTLA4, et de PD1 avec ses ligands PDL1 et PDL2. Ceci a pour conséquence d'inhiber l'activation des LT et donc leur prolifération et le développement des fonctions effectrices. (Schéma repris et adapté de Osii et al., 2020).

2.1.3 L'aide des lymphocytes T CD4 pour une activation optimale

Outre les 3 signaux d'activation, le rôle des LT CD4 (LT CD4 « helper » ou T_H) pour aider à la génération d'une réponse LT CD8 efficace a été largement étudié. Ce processus d'aide engage des interactions avec différentes populations de DC et sont distinctes spatio-temporellement (Eickhoff et al. 2015; Hor et al. 2015). En effet, les cDC1 103⁺ migrent dans le ganglion lymphatique et activent les LT CD8 naïfs via les 3 signaux d'activation décrit précédemment. Parallèlement, les cDC de type 2 (cDC2) vont activer les LT CD4. Après activation des LT CD8, ceux-ci vont sécréter le ligand de chimiokine XCL1 permettant le recrutement des cDC1 XCR1⁺. Ces dernières vont présenter l'antigène à la fois sur le CMH-I et II dont les complexes seront respectivement reconnus par les LT CD8 et T CD4 activés. Ce complexe tri-cellulaire ainsi formé permet aux LT CD8 d'intégrer les signaux d'aide transmis par les LT CD4.

Ces signaux ont une importance notamment pour la génération de LT CD8 capables d'effectuer des réponses de rappel efficaces contre l'antigène. Ceci a été mis en évidence par plusieurs études effectuées dans différents contextes d'immunisation (infection par LCMV-A, virus de la vaccine (VV) ou encore *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)). Indépendant du type d'infection, les études ont démontré que l'aide des LT CD4 n'était pas requise pour l'expansion primaire des LT CD8. En effet, la déplétion en LT CD4 n'avait pas d'impact sur la capacité des LT CD8 à proliférer ou à devenir des cellules effectrices efficaces (Janssen et al. 2003; Shedlock and Shen 2003; Sun and Bevan 2003). En revanche, les LT CD8 activés en absence d'aide des LT CD4 ont montré des réponses de rappel défectueuses après un second challenge par l'antigène. Ainsi, l'aide des LT CD4 est nécessaire pendant la primo-infection pour la génération de LT CD8 mémoires fonctionnels.

Les LT CD4 sont capables d'envoyer des signaux cytokiniques aux LT CD8. En effet, ils sont les principaux producteurs d'IL-2, cytokine ayant la capacité d'agir par communication paracrine sur les LT CD8 en se liant à son récepteur CD25 (ou IL-2R). Nous allons voir dans la section suivante que l'IL-2 joue un rôle primordial dans la différenciation des LT CD8 en effecteurs ainsi que pour la génération de cellules mémoires.

2.1.4 Cytokine à chaîne γ : importance de l'interleukine 2 (IL-2)

L'IL-2 appartient à la famille de cytokines signalant via la chaîne γ (γc) des récepteurs. Elle joue un rôle majeur dans la différenciation, la survie et l'expansion des LT CD8 effecteurs et favorise également le développement de la mémoire à long terme (Kalia and Sarkar 2018). Son récepteur, exprimé notamment à la surface des LT CD8, est composé de 3 chaînes à savoir la chaîne α (CD25 ou IL-2R α), la chaîne β (CD122 ou IL-2R β) et la chaîne commune γ (IL-2R γ ou γc). C'est l'association en complexe avec ces 3 chaînes qui présente la plus forte affinité pour l'IL-2. Lorsque l'IL-2 se lie sur son récepteur, les protéines Jak1 et Jak3 sont recrutées au niveau des chaînes CD122 et γc provoquant une signalisation en aval. Ainsi, 3 voies vont être activées : les voies des MAP kinases (MAPK) et PI3-kinases (PI3K) induisant la transcription de gènes liés à la prolifération et à la survie, et la voie JAK-STAT permettant entre-autre, la transcription et la surexpression à la surface de la sous-unité CD25 du récepteur (**Figure 8**).

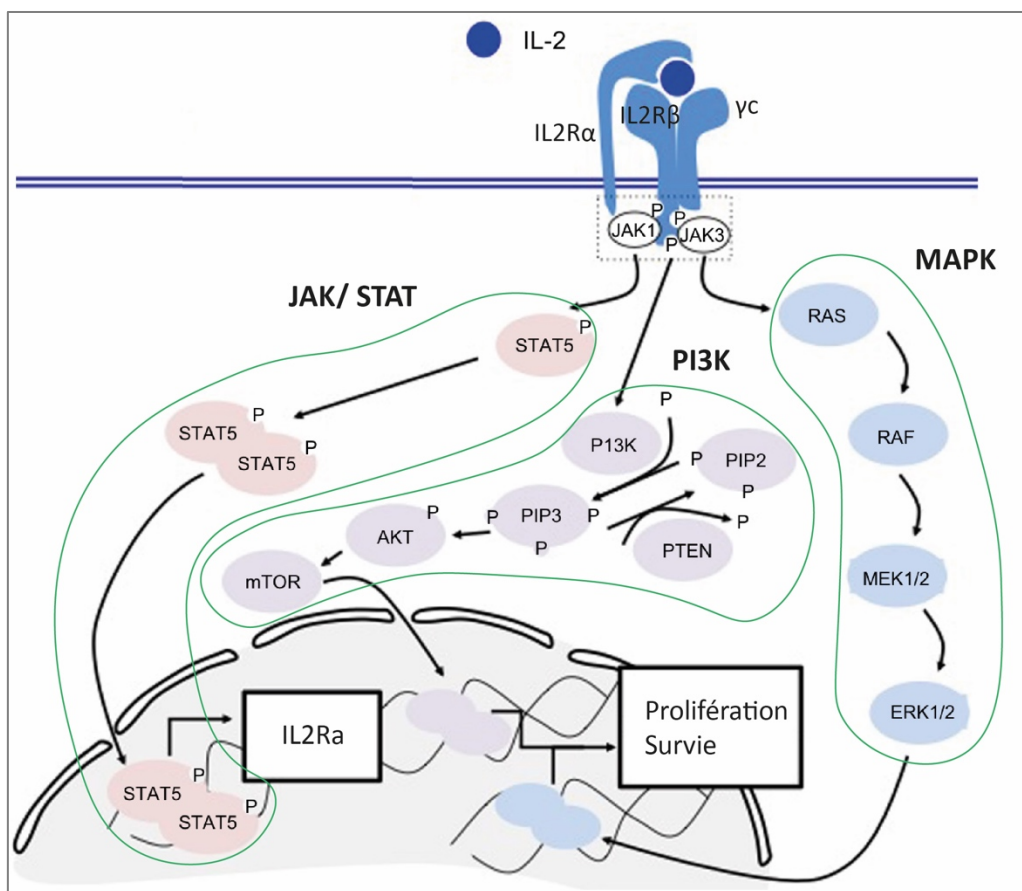


FIGURE 8 : SIGNALISATION VIA LE RECEPTEUR A L'IL-2

Le récepteur à l'IL-2 est un complexe formé de 3 chaînes (IL-2R α , IL-2R β et γc). L'activation du récepteur via la liaison de l'IL-2 induit le recrutement des protéines JAK1 et 3 et déclenche 3 voies de signalisation distinctes : la voie MAP kinase (MAPK) et PI3 kinase (PI3K) induisant la transcription de gènes associés à la prolifération et à la survie ; la voie JAK/ STAT via STAT5 permettant la transcription du gène IL-2R α . (Schéma repris et adapté de Amaria et al., 2015).

Lors d'une réponse immunitaire, les LT CD4 activés produisent une quantité importante d'IL-2 pouvant agir alors en paracrine sur les LT CD8. Cependant, l'IL-2 est également produite par

les LT CD8 activés, elle peut donc aussi agir de manière autocrine (Kalia and Sarkar 2018). Williams, et al. ont montré que le signal IL-2 reçu pendant la primo-infection était crucial pour induire une réponse proliférative secondaire robuste et que la signalisation paracrine était suffisante pour la génération de LT CD8 mémoires capables de produire de l'IFN γ après restimulation (Williams, Tyznik, and Bevan 2006). Plusieurs études s'accordent à dire que c'est la sécrétion autocrine d'IL-2 par les LT CD8 qui est requise par les cellules effectrices pendant l'expansion primaire pour une expansion secondaire optimale des LT CD8 mémoires (Feau et al. 2011; Redeker et al. 2015; Toumi et al. 2022). De plus, Toumi, et al. ont également étudié le rôle de l'IL-2 paracrine sur la réponse T. Ils ont conclu que l'IL-2 paracrine est responsable de la différenciation et de l'expansion des LT effecteurs et suffit à la formation du pool de mémoires (différenciation en LT mémoires centraux, maintien homéostatique et poly-fonctionnalité des cellules mémoires) (Toumi et al. 2022). Seule une fraction des cellules CD8 produit de l'IL-2. Kahan, et al. le démontre via à un système de souris rapportrices à double cytokine IFN γ .Thy1.1 / IL-2.GFP identifiant les cellules productrices d'IFN γ et d'IL-2 par l'expression de Thy1.1 (CD90) et de la protéine fluorescente verte (GFP) respectivement (Kahan et al. 2022). Ils ont mis en évidence que les LT CD8 non producteurs d'IL-2 répondent au signal IL-2 via STAT5 et gagnent des traits de cellules effectrices. A l'inverse, les cellules productrices d'IL-2 reçoivent un signal plus faible via la voie STAT5 et atteignent plus rapidement un phénotype mémoire ce qui est en accord avec les études de Pipkin, et al. et de Kalia, et al. (Kalia et al. 2010; Pipkin et al. 2010). En effet, les LT CD8 activés exprimant à un plus fort niveau la chaîne α du récepteur (CD25) perçoivent un signal IL-2 prolongé engendrant une prolifération plus rapide mais sont plus sujets à l'apoptose (Kalia et al. 2010). Ces cellules expriment davantage le marqueur KLRG1 associé au phénotype effecteur terminal ainsi que les gènes GzmB (granzyme B) et Prf1 (perforine) associés à la cytotoxicité. A l'inverse, les LT CD8 CD25^{lo} sont moins sensibles à l'IL-2 et présentent une augmentation de l'expression de CD127 et CD62L, marqueurs associés à la mémoire. Pour tester leur programme de différenciation, les auteurs ont transféré les LT effecteurs CD25^{hi} et CD25^{lo} dans des souris receveuses préalablement infectées par LCMV-A. Cette expérience a démontré que les cellules CD25^{hi} se différenciaient en effecteurs terminaux alors que les mémoires à longue durée de vie proviennent des LT effecteurs CD25^{lo}. En accord avec cette étude, Pipkin, et al. ont démontré par des expériences in vitro, qu'une forte stimulation IL-2 induisait la transcription du gène Prf1 et conduisait à la différenciation des cellules en effecteurs cytotoxiques (Pipkin et al. 2010). Au contraire, les LT CD8 ayant reçu un faible signal IL-2 présentent des traits de cellules mémoires avec l'expression des marqueurs CD122, CD127 et CD62L. Ainsi, la force du signal oriente la différenciation des cellules en effecteurs ou mémoires. De plus, Redeker et al. ont utilisé le modèle d'infection par le Cytomégalovirus murin (MCMV) dans lequel les populations de LT mémoires antigènes-spécifiques, en fonction de leur liaison aux différents tétramères du CMH-I, disposent de différentes capacités à produire de l'IL-2 (pourcentage élevé, modéré ou faible production d'IL-2) (Redeker et al. 2015). Grâce à ce système, ils ont démontré une corrélation entre le pourcentage de cellules

mémoires CD8 antigènes-spécifiques productrices d'IL-2 au sein de la population totale et leur capacité d'expansion secondaire (Redeker et al. 2015).

Ainsi, les signaux d'IL-2 paracrine et autocrine semblent complémentaires pour une réponse T optimale. L'IL-2 est un acteur essentiel de la différenciation effecteurs/ mémoires. Cependant, il joue un rôle bivalent : un fort signal induit la différenciation en effecteurs alors que l'établissement de cellules mémoires à long terme nécessite un plus faible signal IL-2 (Figure 9).

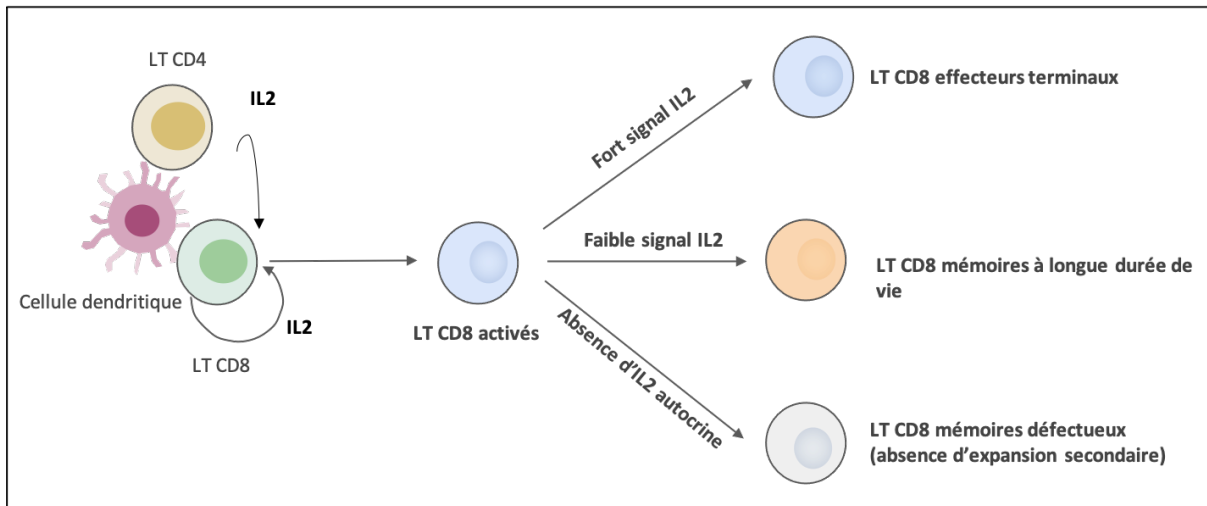


FIGURE 9 : ROLE DE L'IL-2 SUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES

Après activation via les DC, les LT CD8 reçoivent un signal IL-2 paracrine par les LT CD4 activés et également autocrine via leur propre production. Ce signal IL-2 est crucial pour la différenciation en LT effecteurs / mémoires. L'absence de signal IL-2 autocrine conduit à un défaut d'expansion des LT CD8 mémoires lors d'une réinfection par le même pathogène. Les LT CD8 recevant un faible signal IL-2 acquièrent un phénotype mémoire alors que celles ayant reçu un fort signal se différencient en cellules effectrices terminales. (Schéma repris et adapté de la thèse de Wang 2022).

2.2 Prolifération et différenciation en cellules effectrices

2.2.1 Expansion clonale

Après activation via l'ensemble des signaux vu précédemment, les LT CD8 s'expandent drastiquement au niveau des OLII. Le faible nombre de cellules T naïves génèrent alors jusqu'à plus de 10 millions de cellules effectrices au pic de la phase d'expansion clonale qui est atteint entre 7 et 12 jours selon les modèles d'infection. Les LT CD8, stimulés pendant une période variant entre 2 et 24 heures, sont capables de réaliser au minimum 7 divisions sans qu'ils aient besoin d'une stimulation supplémentaire par les CPA (Badovinac and Harty 2006; Kaech, Wherry, and Ahmed 2002). On parle ainsi d'activation autopilote (Bevan and Fink 2001). Dans le cas d'infection par LCMV-A par exemple, les LT CD8 peuvent réaliser au moins 15 divisions par cellules naïves sur une période de 8 jours d'infection (Badovinac and Harty 2006; Butz and Bevan 1998). En parallèle de cette expansion, une importante reprogrammation métabolique,

communément nommé « switch métabolique », se met en place. En effet, ce processus permet non seulement de palier à la demande énergétique coûteuse pendant la phase de prolifération, et fournit également l'ensemble des intermédiaires métaboliques dont ils ont besoin pour synthétiser les composants cellulaires des cellules filles générées (Gupta, Wang, and Chen 2020). Les cellules naïves sont dépendantes de la phosphorylation oxydative alors que les LT activés régulent à la hausse la glycolyse aérobie. Ainsi, les cellules passent d'un métabolisme catabolique à anabolique. Toutefois, ce switch métabolique est transitoire puisque le métabolisme des cellules mémoires est ramené à la phosphorylation oxydative.

2.2.2 *Circulation et recrutement au site de l'infection*

L'activation des LT CD8 s'accompagne de changements dynamiques dans l'expression des molécules d'adhésion et des récepteurs aux chimiokines. En effet, les LT, une fois activés dans les ganglions lymphatiques, vont migrer pour rejoindre le site enflammé afin d'éliminer l'infection et protéger l'hôte (**Figure 10**). Pour ce faire, les cellules perdent l'expression de CD62L et CCR7 qui leur permettaient de rester dans les OLI (Nolz et al. 2011). Ils réexpriment le gène codant pour le récepteur S1PR1, inhibé par les LT naïfs. L'expression de CXCR3 est fortement augmentée ce qui permet aux LT activés d'être recrutés au site de l'infection via un gradient de chimiokines CXCL9 et CXCL10 induites par l'IFN γ . De plus, l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) régulée à la hausse sur les LT, interagit avec son ligand VCAM-1 (CD106) exprimé sur l'endothélium enflammé (Alon et al. 1995). Ainsi, les LT activés vont sortir du ganglion et rejoindre la circulation sanguine pour ensuite rentrer dans les tissus infectés. L'expression de certaines intégrines joue un rôle dans la migration des LT au niveau de tissus spécifiques. En particulier, l'expression de VLA-1 ($\alpha_1\beta_1$) permet une localisation des LT CD8 au niveau du poumon après une infection par le virus de la grippe (Ray et al. 2004). De plus, les LT activés exprimant l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ vont les amener à se diriger vers l'épithélium intestinal (Masopust et al. 2010).

Ainsi, cette dynamique d'expression d'intégrines et de récepteurs aux chimiokines permet aux LT CD8 activés de migrer aux sites infectés. En effet, les cellules vont acquérir des fonctions effectrices leur permettant d'éliminer les cellules infectées.

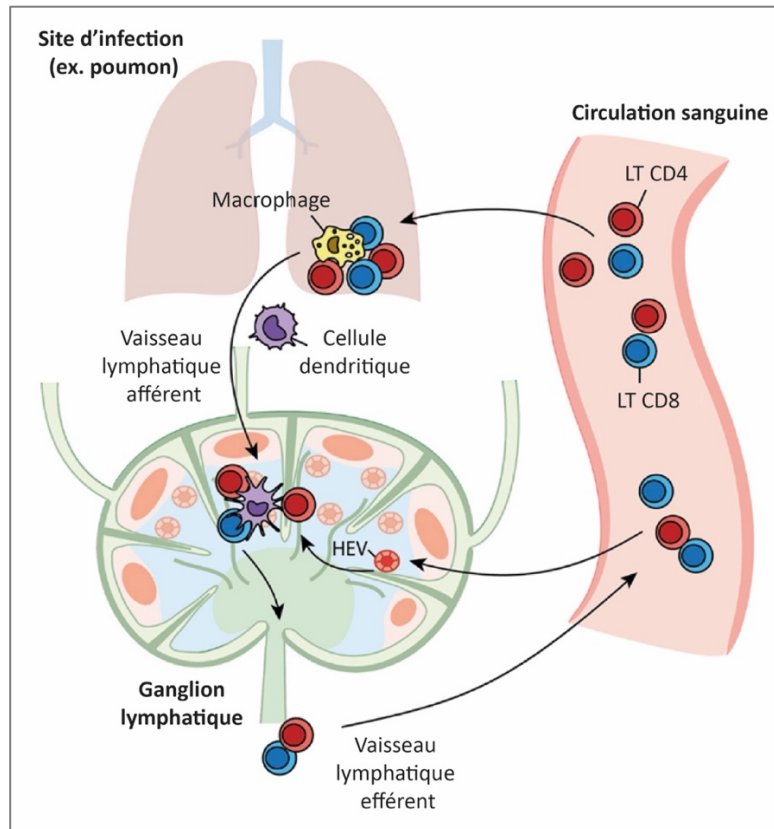


FIGURE 10 : CIRCULATION DES LT CD8 ENTRE LE GANGLION ET LE SITE D'INFECTION

Les LT CD8 naïfs arrivent dans le ganglion lymphatique via les HEV et interagissent avec les DC provenant du site infecté (ici le poumon). Les LT CD8 reconnaissent le complexe CMH-I/peptide présenté par les DC et reçoivent les signaux nécessaires à leur activation (signal 2, 3, aide des CD4, IL-2). Les LT activés prolifèrent, se différencient en cellules effectrices et migrent à travers la circulation sanguine jusqu'au site infecté dans le but d'éliminer le pathogène. (Schéma repris et adapté de Gong, Linderman, and Kirschner 2014).

2.2.3 Acquisition des fonctions effectrices et cytolyse

Comme mentionné précédemment, les LT CD8 activés vont acquérir des fonctions effectrices dont la production de molécules cytotoxiques (1) ainsi que la sécrétion de cytokines (2), indispensable pour le contrôle de l'infection.

(1) Les fonctions cytotoxiques

L'un des principaux systèmes permettant aux LT CD8 de tuer les cellules infectées est la dégranulation libérant des molécules cytotoxiques telles que les granzymes et la perforine. Ces dernières sont synthétisées à la suite de l'activation des LT et de leur différenciation en cellules effectrices, et sont ensuite stockées dans des granules, appelées granules cytotoxiques, présentes dans le cytoplasme des cellules. Il suffit de quelques minutes dans le tissu pour que le LT effecteur reconnaisse le complexe CMH-I/peptide à la surface d'une cellule infectée via son TCR. Il s'ensuit alors une série de modifications afin de former une synapse cytotoxique ou synapse sécrétoire entre le LT et la cellule cible. De la même manière que la

synapse immunologique, la synapse sécrétoire est structurellement organisée avec une zone centrale (cSMAC) comportant le TCR puis une zone périphérique (pSMAC) où se concentrent les molécules d'adhésion telles que LFA-1 (Ritter et al., 2015 ; de Saint Basile, Ménasché, and Fischer 2010 ; Stinchcombe et al., 2006). Le cytosquelette d'actine va subir des réarrangements, se concentrant au niveau de la zone de contact puis migrant aux extrémités de la synapse laissant une zone centrale libre d'actine. En parallèle, le centre organisateur des microtubules (MTOC) se polarise vers la cellule cible et s'arrime à la membrane plasmique entraînant avec lui les granules cytotoxiques (**Figure 11**). Ceux-ci fusionnent alors avec la membrane et le contenu est libéré dans l'espace synaptique.

La perforine est une protéine monomérique dont l'activité est dépendante du pH (active à un pH neutre) et du calcium (Voskoboinik, Whisstock, and Trapani 2015). Au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible, celle-ci forme des pores permettant le passage des granzymes dans le cytosol de la cellule cible (Law et al. 2010). Cependant, des études ont montré que seuls de petits solutés étaient capables de passer via ces pores. Ainsi, les granzymes seraient internalisés avec les pores de perforines dans des endosomes puis les pores s'assemblent dans la vésicule permettant la sortie des granzymes dans le cytosol (Thiery et al. 2010).

Le granzyme B (GzmB), une protéase, est le granzyme pro-apoptotique le plus puissant alors que le GzmA génère une forme plus lente de mort (Voskoboinik et al. 2015). Le GzmB induit l'apoptose de la cellule via plusieurs voies telles que la voie mitochondriale ou cytosolique en initiant directement l'activation des caspases ou en clivant les substrats des caspases (Boivin et al. 2009).

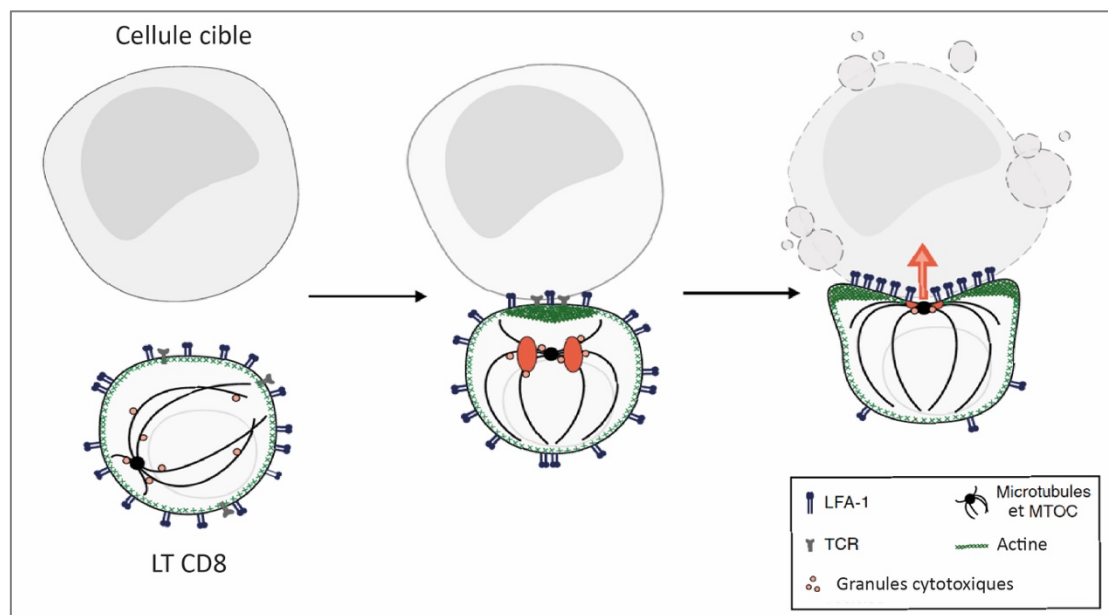


FIGURE 11 : MISE EN PLACE DE LA SYNAPSE SECRETOIRE ENTRE LA LT CD8 ET LA CELLULE CIBLE

Afin d'éliminer les cellules infectées, les LT CD8 effecteurs forment une synapse sécrétoire avec leur cellule cible. Le LT CD8 reconnaît ainsi le complexe CMH-I/peptide sur la cellule cible et engage son TCR induisant le recrutement de molécule d'adhésion telle que LFA-1. Il s'ensuit un réarrangement du cytosquelette

d'actine qui s'enrichit d'abord au niveau de la zone centrale de la synapse puis migre à la périphérie. Dans le même temps, le centre organisateur des microtubules (MTOC) se polarise vers le centre et s'arrime à la membrane avec les granules cytotoxiques qui seront libérés dans l'espace synaptique. (Schéma repris et adapté de Petit et al., 2016).

En parallèle de la voie perforine/granzyme, les LT effecteurs expriment les ligands Fas (FASL) et TRAIL pouvant interagir avec les récepteurs FAS et TRAIL (TRAILR) conduisant à la mort de la cellule cible par apoptose via l'activation de la caspase 8 (Brincks et al., 2009 ; Kägi et al., 1994).

(2) Les cytokines

Les LT CD8 effecteurs produisent un certain nombre de cytokines dont l'IFN γ , le TNF α et l'IL-2 (le rôle de l'IL-2 a été décrit dans la partie I- 2.1.4). L'IFN γ est une cytokine soluble, seul membre de la famille des IFN de type II. Il joue un rôle primordial dans l'immunité innée et adaptative. En effet, il permet de contrôler des infections notamment bactériennes puisqu'une déficience en IFN γ chez l'Homme et la souris a montré une susceptibilité à deux bactéries intracellulaires, *Mycobacterium* et *Salmonella* (Jouanguy, et al. 1999). L'IFN γ un également un activateur des macrophages permettant d'augmenter la phagocytose de ces cellules. De plus, il induit l'augmentation des molécules de CMH-I à la surface des cellules favorisant la présentation d'antigènes et donc améliorant la réponse immunitaire médié par les LT CD8 (Zhou 2009). A l'inverse, le rôle du TNF α est controversé. Certains le classent comme un facteur de l'inflammation, protecteur de l'hôte en induisant l'apoptose des cellules (Smyth and Johnstone 2000). A l'inverse, des études ont montré que le TNF α altère la maturation des CPA et leur survie et qu'il n'est pas requis pour une réponse antivirale mais aurait plutôt une fonction antitumorale (Brehm, Daniels, and Welsh 2005; Calzascia et al. 2007).

Les LT CD8 effecteurs sécrètent également plusieurs chimiokines. Eberlein, et al. ont mis en évidence la signature de chimiokines secrétés par les LT CD8 effecteurs en réponse à différents pathogènes (LCMV-A, VV, *Listeria*, ...) qui comprend CCL1, CCL3, CCL4, CCL5, CCL9/10 et XCL1 (Eberlein et al. 2020).

Ainsi, l'ensemble de ces fonctions effectrices acquises par les LT CD8 effecteurs permettront d'éliminer le pathogène. Ensuite, la majorité des cellules subissent un processus de mort cellulaire, c'est la phase de contraction.

2.3 Contraction clonale

Lors de la phase de contraction, entre 90 et 95% des LT CD8 effecteurs meurent par apoptose. Afin d'étudier la phase de contraction, Garrod, et al. ont évalué l'activité de la caspase 3 grâce à un système de rapporteur *in vivo*, afin d'identifier les cellules entrant en apoptose (Garrod et al. 2012). Ils ont d'abord démontré que la contraction était un processus systémique étant donné que le taux d'apoptose était similaire aux différentes localisations

évaluées (rate, ganglion, foie, poumon, ...) indépendamment du type d'infection (local ou systémique). Toutefois, en nombre absolu, la rate est le site préférentiel de contraction. Ensuite, ils ont mis en évidence que le processus de contraction dépendait de la disponibilité en antigène dans l'environnement. En effet, une immunisation par le peptide OVA avec un l'adjuvant LPS (lipopolysaccharide) puis une seconde injection de peptides après 4 jours conduit à une diminution de la susceptibilité des LT à l'apoptose.

Toutefois, ce modèle de contraction dépendant de la quantité en antigène est controversé et d'autres études estiment que la contraction est programmée très tôt après l'infection. En effet, Badovinac, et al. ont montré que le traitement antibiotique permettant de réduire le nombre de bactéries chez des souris infectées avec une souche atténuée de *Listeria monocytogenes* n'affectait pas la cinétique de contraction en comparaison aux souris non traitées (Badovinac, Porter, and Harty 2002). En outre, ils ont obtenu des résultats similaires après infection des souris avec différentes doses de *L. monocytogenes*.

Quelques années après, ils ont démontré que le prétraitement antibiotique avant infection par *L. monocytogenes* (1×10^7) de souris abrogeait la phase de contraction, ce qui n'avait pas d'impact sur la génération de cellules mémoires fonctionnelles (Badovinac, Porter, and Harty 2004). De plus, le prétraitement accélérant la clairance bactérienne, réduit la production d'IFN γ très tôt après l'infection et accélère la génération de cellules résistantes à l'apoptose (augmentation du marqueur anti-apoptotique Bcl2) ayant un phénotype mémoire (LT CD8 IL7R $^+$). Ainsi, les signaux inflammatoires et spécifiquement la production d'IFN γ régulent le programme de contraction. En effet, l'injection de CpG, induisant notamment la production d'IFN γ , chez des souris prétraitées avec un antibiotique et infectées par *L. monocytogenes* restaure la phase de contraction.

L'apoptose peut être déclenchée par 2 voies différentes : la voie extrinsèque faisant appel aux récepteurs de mort tel que FAS à la surface des cellules ; la voie intrinsèque via les mitochondries. Cette dernière est notamment régulée par la famille Bcl2 comprenant des protéines pro et anti-apoptotiques. Des expériences chez des souris déficientes en protéine pro-apoptotique Bim ont montré qu'elle était nécessaire pour certaines réponses apoptotique (Bouillet et al. 1999). Ainsi, Pellegrini, et al. ont investigué ces deux voies via l'utilisation de souris déficientes en récepteur FAS ou en protéine Bim infectées par le virus Herpès simplex (HSV) (Pellegrini et al. 2003). Leur résultat ont mis en évidence une accumulation et une persistance des cellules CD8 antigène-spécifiques en absence de Bim comparé aux souris contrôles et déficientes pour Fas, démontrant ainsi que le processus de contraction est médié par la voie intrinsèque via Bim.

Ainsi, la majorité des cellules meurent par apoptose mais une minorité se maintient et laisse place à une population de cellules mémoires dont nous allons détailler leurs caractéristiques par la suite.

2.4 Génération des cellules mémoires

La mémoire cellulaire est une caractéristique des lymphocytes T. Stephen Jameson définit la LT mémoire comme étant « une cellule [...] dérivée d'une cellule T naïve proliférante, qui perd de nombreuses caractéristiques naïves, persiste au-delà de la phase effectrice immédiate (si elle est présente) et présente des propriétés fonctionnelles modifiées par rapport aux cellules T naïves telles que des modèles de trafic non naïfs ou le potentiel de réponses effectrices rapides (telles que la production de cytokines ou la cytolyse). » (traduit de l'anglais » (Jameson 2021). En effet, l'établissement de la mémoire fait suite à la réponse primaire, c'est-à-dire après la phase de contraction. Cette population de LT CD8 mémoires est composée de cellules spécifiques des différents antigènes appartenant au pathogène ayant infecté l'hôte. Ainsi, lors d'une seconde infection par le même pathogène, les cellules sont capables de générer une RI secondaire plus rapidement et plus efficacement que la primo-infection, conférant une protection à l'hôte. Dans les parties suivantes, nous allons voir comment ces cellules se maintiennent et quelles sont leurs caractéristiques.

2.4.1 *Persistence de la mémoire : des cellules à longue durée de vie*

Le maintien à long terme des mémoires est essentiel pour conférer une protection durable à l'hôte. Homann, et al. ont montré que le niveau des mémoires T CD8 se stabilisait 25 jours après infection par LCMV-A et reste stable plusieurs années après (jusqu'au temps évalué par les auteurs qui est d'environ 2 ans et demi) (Homann, Teyton, and Oldstone 2001). Dans le cas de la vaccination contre la variole, les mémoires T CD8 décroissent lentement mais présentent tout de même un temps de demi-vie estimé entre 8 et 15 ans (Hammarlund et al. 2003).

Cette maintenance au long terme des LT mémoires est dépendante d'interactions TCR/CMH-I ainsi que de signaux cytokinique (Tanchot et al. 1997). En effet, plusieurs études ont montré que des souris déficientes en IL15 (IL15^{-/-}) ou en récepteur à l'IL15 (IL15R^{-/-}) présentaient un déclin du nombre de mémoires au cours du temps (Becker et al. 2002; Goldrath et al. 2002). Ainsi, ces études ont mis en évidence le rôle crucial de l'IL15 dans la prolifération homéostatique des LT CD8 mémoires pour maintenir la stabilité du compartiment mémoire sur de longue période de temps. Au niveau transcriptionnel, Zhou et al. ont mis en évidence que le facteur de transcription (FT) TCF1 était requis pour maintenir la réactivité à l'IL15 dans les mémoires T CD8 induisant ainsi la persistance des mémoires (Zhou et al. 2010). En effet, ils ont montré que TCF1 était capable de se fixer au niveau du locus d'EOMES induisant sa transcription. Ce dernier régule positivement la transcription du gène à l'IL-2R β , la sous-unité partagée entre les récepteurs à l'IL-2 et l'IL15, ce qui donc induit la réactivité à l'IL15.

En plus de l'IL15, l'IL7 joue un rôle dans la survie des mémoires CD8. Schluns, et al. ont mis en évidence *in vivo* que des cellules déficientes pour le récepteur à l'IL7 (IL7R^{-/-}) et spécifiques au virus de la stomatite vésiculaire (VSV) sont moins prône à survivre et à se différencier en cellules mémoires (Schluns et al. 2000). Ils démontrent que cette survie des mémoires est dépendante de la réexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl2, qui est induite par l'IL7.

2.4.2 Des cellules en nombre élevé et dans un état « hyper-répondeur »

Une des caractéristiques des LT mémoires est leur fréquence largement augmentée en comparaison aux cellules T naïves. En effet, Blattman, et al. ont estimé la fréquence de précurseurs naïfs et de cellules mémoires générées en réponse à l'antigène GP₃₃₋₄₁ de LCMV-A (Blattman et al. 2002). Ils ont montré qu'il existait entre 100 et 200 LT CD8 naïfs spécifiques de l'antigène GP₃₃₋₄₁ et que 5×10^5 LT antigène-spécifiques survivaient pour constituer le pool de mémoire, revenant à 1000 fois plus de cellules mémoires que de naïves. Cette fréquence accrue améliore ainsi la probabilité de rencontre avec l'antigène lors d'une seconde infection.

Lors d'une seconde rencontre avec l'antigène, les LT CD8 mémoires engagent leur TCR et sont capables de proliférer et réacquérir très rapidement les fonctions effectrices, constituant la caractéristique principale des cellules mémoires. Cet état, qualifié d'hyper-répondeur, est la résultante de modifications épigénétiques influençant le programme transcriptionnel de différenciation des LT CD8. Ainsi, ces modifications épigénétiques incluent (1) la modification des histones et (2) la modification de l'ADN principalement par la méthylation.

(1) Modification des histones

La modification des histones est un processus post-traductionnel au niveau des queues N-terminales incluant principalement la méthylation et l'acétylation ce qui permet de réguler la compaction de la chromatine et donc l'accessibilité à l'ADN. De manière générale, l'acétylation des histones a un effet activateur sur la transcription alors que la méthylation peut avoir un effet activateur ou répressif.

Ainsi, la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 (H3K4me) est associée à l'activation de la transcription alors que les marques de tri méthylation de la lysine 27 sur H3 (H3K27me3) conduit à la répression des gènes. L'organisation de l'état transcriptionnel des gènes est ainsi segmentée en 3 catégories dans les LT mémoires : les gènes actifs, exprimés et associés avec des marques d'H3K4me ; les gènes réprimés, non exprimés et enrichis en marques H3K27me3 et les gènes « poised » ou prêts à être transcrits à la prochaine activation, qui ne sont pas ou peu exprimés et qui contiennent à la fois des marques H3K4me et H3K27me3 (**Figure 12**) (Araki et al. 2009; Youngblood, Hale, and Ahmed 2015). De plus, les cellules mémoires présentent de fortes marques d'acétylation sur la lysine 9 d'H3 (H3K9ac) notamment sur les promoteurs des gènes des fonctions effectrices tels que l'IFN γ et le GzmA (Fann et al. 2006). Ceci permet de faciliter la réexpression de ces gènes et donc la réponse rapide des LT mémoires en cas de réinfection.

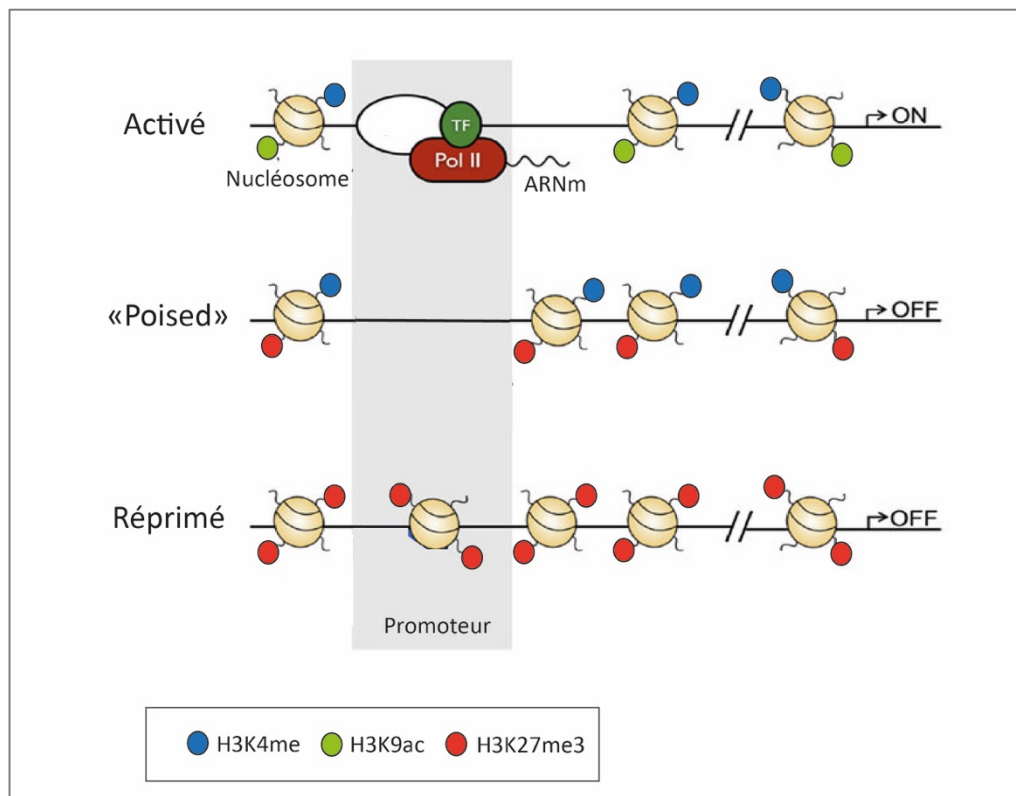


FIGURE 12 : MODIFICATIONS EPIGENETIQUES VIA LA MODIFICATION DES HISTONES

Il existe 3 états transcriptionnels en fonction des marques épigénétiques sur les histones : activé, « poised » (prêt à être transcrit), et réprimé. Ainsi, les gènes activés possèdent une densité plus faible en nucléosomes qui comportent des marques d'acétylation (H3K9ac) et de méthylation (H3K4me) sur leurs queues N-terminales conduisant à l'activation du promoteur du gène. Les gènes « poised » sont plus denses en nucléosomes et comprennent à la fois des marques activatrices (H3K4me) et inhibitrice (H3K27me3) réprimant de ce fait la transcription du gène. Enfin, les gènes réprimés présentent une forte densité en nucléosomes qui présentent uniquement des marques inhibitrices (H3K27me3). De ce fait, l'accessibilité au promoteur est restreinte et la transcription du gène est inhibée. (Schéma repris et adapté de Nguyen et al., 2015).

(2) Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un deuxième mécanisme épigénétique, la plupart du temps se produisant sur les cytosines (C) précédant une guanine (G) (CpG). Les promoteurs sont enrichis en CpG que l'on appelle des îlots CpG et sont un site préférentiel de méthylation. En règle générale, une forte méthylation de l'ADN est associée à une répression des gènes alors qu'une faible méthylation conduit à la transcription des gènes. Kersh, et al. ont montré que le locus de l'IFN γ chez les LT naïfs était fortement méthylé au site CpG alors qu'il est complètement déméthylé chez les LT effecteurs leur permettant de sécréter de l'IFN γ (Kersh et al. 2006). En revanche, le locus des LT mémoires était hypo-méthylé, c'est-à-dire partiellement méthylé, permettant aux cellules mémoires de rapidement transcrire et sécréter de l'IFN γ après stimulation de leur TCR. De plus, Youngblood, et al. ont montré que les cellules effectrices présentaient une augmentation de méthylation *de novo* au niveau des

locus des gènes associés aux LT naïfs tels que Sell codant pour CD62L réprimant de ce fait ce gène (Youngblood et al. 2017). A l'inverse, les LT mémoires réexpriment ces gènes corrélant avec une déméthylation du promoteur Sell.

Ainsi, l'ensemble de ces modifications épigénétiques participe à l'état hyper-répondeur des cellules mémoires et contribue à la réactivation rapide et efficace de ces cellules lors d'une seconde infection.

3. Hétérogénéité fonctionnelle de la mémoire

3.1 Qualité des mémoires

Les LT mémoires peuvent être distingués des cellules naïves par l'expression du marqueur d'activation CD44 chez la souris ou CD45RO chez l'Homme. Plusieurs autres marqueurs phénotypiques ont fait l'objet d'études et ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité du pool de cellules mémoires. En effet, ce pool est constitué de différentes sous-populations ayant des propriétés fonctionnelles distinctes. Sallusto, et al. ont mis en évidence 2 sous-populations de cellules mémoires basés sur le marqueur d'adhésion CD62L et le récepteur à chimiokine CCR7 (Sallusto, Lenig, and Lanzavecchia 1999). Ainsi, ils ont défini d'un côté les cellules T à mémoire centrale ou TCM, caractérisés par l'expression de CD62L et CCR7, et de l'autre les TEM pour mémoire T effecteur, négatifs pour les 2 marqueurs (**Table 1**). Ces marqueurs définissent la localisation anatomique des 2 sous-populations, les TCM se situant dans les OLII et les TEM étant capable d'entrer et de circuler entre les tissus. Ainsi, les TCM et les TEM sont définis comme les mémoires circulantes. En outre, ces populations présentent des différences fonctionnelles. Les TEM, après restimulation, produisent rapidement de l'IFN γ et les molécules cytotoxiques (perforine notamment), leurs permettant de rapidement contenir l'infection (Sallusto et al. 1999). A l'inverse, les TCM ne disposent pas de fonctions effectrices mais produisent de l'IL-2 et sont donc capables générer une nouvelle vague de cellules effectrices. Une 3^e catégorie de mémoires résidents dans les tissus (TRM) après infection, a été plus récemment décrit et mis en évidence chez l'Homme et la souris dans différents tissus tels que la peau, le foie ou encore les poumons (**Table 1**) (Szabo, Miron, and Farber 2019). Les TRM se distinguent des mémoires circulantes par l'expression de la protéine CD69, également marqueur d'activation précoce, ainsi que de la molécule d'adhésion CD103 (ITGAE) bien que son expression soit plus variable (Bergsbaken and Bevan 2015; Kumar et al. 2017). Ils ont la particularité de sécréter de grande quantité d'IFN γ , constituant ainsi la première la ligne de défense lors d'une réinfection (Schenkel et al. 2014). De plus, ils produisent également de l'IL-2 et du TNF α leur permettant de recruter des composants de l'immunité innée et adaptative (activation des NK, maturation des DC, recrutement des TEM, ...).

TABLE 1 : CARACTERISTIQUES DES PRINCIPALES POPULATIONS DE LT CD8 MEMOIRES CHEZ LA SOURIS

Sous-population	Phénotype	Fonction	Localisation anatomique
TCM	CD44 ⁺ CD62L ⁺ CCR7 ⁺ CD69 ⁻ CD103 ⁻	Cytotoxicité +- Prolifération ++	Circulation entre les OLI
TEM	CD44 ⁺ CD62L ⁻ CCR7 ⁻ CD69 ⁻ CD103 ⁻	Cytotoxicité ++ Prolifération +-	Circulation entre les tissus périphériques
TRM	CD44 ⁺ CD62L ⁻ CCR7 ⁻ CD69 ⁺ CD103 ⁺	Cytotoxicité ++ Prolifération +	Résidents dans les tissus périphériques

L'hétérogénéité des cellules mémoires ne se limitent pas à ces 3 sous-populations mais est en réalité bien plus large. Böttcher, et al. ont mis en évidence des populations de mémoires basés sur l'expression du récepteur CX3CR1. Ce marqueur subdivise les mémoires en population non redondantes avec la classification TCM/TEM puisque CX3CR1 est exprimé par 30 et 75% de TCM et TEM respectivement (Böttcher et al. 2015). Ainsi, les mémoires CX3CR1⁺ ont la capacité de produire instantanément les fonctions effectrices (GzmB par exemple) et ainsi contrôler rapidement l'infection. Au contraire, les mémoires négatives pour CX3CR1 n'ont pas ce potentiel mais peuvent produire de grandes quantités d'IL-2 après restimulation, leur conférant une capacité de prolifération accrue. Hikono, et al. sur la base des marqueurs CD27 et CD43, ont défini 3 sous-populations de LT mémoires chez la souris : CD27⁺/ CD43⁺, CD27⁺/ CD43⁻, CD27⁻/ CD43⁻ (Hikono et al. 2007). Leur étude a montré une différence de capacité des 3 populations à produire une réponse secondaire efficace notamment en termes de prolifération et donc de recrutement/accumulation au niveau du poumon. Sur cette base, ils ont ainsi défini une hiérarchie des populations de telle sorte que CD27⁺ CD43⁻ > CD27⁺ CD43⁺ > CD27⁻ CD43⁻. A l'inverse, Olson, et al. ont démontré que la population double négative (CD27⁻/ CD43⁻) était plus efficace pour éliminer le pathogène (Olson et al. 2013). En effet, ils ont transféré les 3 populations de mémoires LCMV-A-spécifiques dans des souris naïves qui ont ensuite été infectées soit par *L. monocytogenes* ou VV. Pour ces deux types d'infection, sur la base de la mesure du nombre de colonies bactériennes ou particules virales, les LT mémoires CD27⁻/ CD43⁻ ont montré une meilleure capacité d'élimination de Listéria et de VV et ainsi une capacité de protection supérieure comparés aux autres populations.

Il est à noter qu'il existe, en plus des mémoires induites par l'antigène décrites ci-dessus, une population de mémoires dites innées générées à partir des LT naïfs via des voies alternatives notamment par des cytokines. Leurs propriétés sont similaires à celles induites par l'antigène : elles prolifèrent et sécrètent de grande quantité d'IFN γ suite à la stimulation de leur TCR afin de monter une réponse efficace contre l'infection (Haluszczak et al. 2009). Cependant, les mémoires induites par l'antigène peuvent être distinguées des mémoires

innées par leur expression de NKG2D ainsi que des intégrines telles que CD29, CD49a et CD49d, leur conférant des capacités de migration au site infecté dont ne disposent pas les mémoires innées (Grau et al. 2018).

En conclusion, les cellules mémoires sont caractérisées par leur quiescence et leur potentiel d'auto-renouvellement tout comme les LT naïfs. Cependant, elles diffèrent de leur ancêtre naïf par une réactivité accrue suite à une stimulation antigénique résultant d'un programme transcriptionnel modifié et de modifications épigénétiques induites lors de la réponse primaire et maintenues par la suite. Ainsi, les nombreuses caractéristiques des LT CD8 sont mémorisés et sont associés à une protection accrue. Elles incluent des propriétés à la fois quantitatives et qualitatives. En effet, les LT mémoires sont présentes à une fréquence beaucoup plus élevée que les LT naïfs et disposent d'une capacité proliférative accrue en réponse secondaire. La qualité des cellules mémoires est notamment définie sur des modèles de trafic et de « homing » non naïfs puisqu'elles peuvent migrer dans les tissus. De plus, suite à leur stimulation, elles acquièrent plus rapidement leurs fonctions effectrices (cytotoxicité, production de cytokines). Le degré de modification des fonctions effectrices des cellules mémoires ainsi que l'acquisition de différents récepteurs de homing contribuent à l'hétérogénéité du pool de LT mémoires.

3.2 Dysfonctionnement des cellules mémoires par épuisement

Dans un contexte spécifique tel qu'une infection chronique ou un environnement tumoral, la persistance de l'exposition à l'antigène ou de l'inflammation entraîne les LT CD8 vers un état de différenciation dit épuisé (« exhausted » en anglais). L'épuisement des cellules a été initialement montré chez la souris dans des modèles d'infection virale chronique par LCMV avec la souche Clone 13 (LCMV-C) (Zajac et al. 1998). Chez l'Homme, il a été également mis en évidence lors d'une infection par HIV (Virus de l'immunodéficience humaine) ou par le virus de l'hépatite C (HCV) ou encore dans le cancer (Wherry and Kurachi 2015). L'épuisement est caractérisé par une perte progressive des fonctions effectrices (diminution de la production d'IL-2, d'IFN γ , de TNF et de l'activité cytotoxique), une incapacité des cellules à devenir quiescentes ainsi qu'une maintenance de la coexpression de récepteurs inhibiteurs (**Table 2**). En effet, PD1 est l'un des premiers marqueurs à avoir été mis en évidence dans le phénomène d'épuisement. Or, comme déjà évoqué précédemment, ce récepteur est rapidement surexprimé sur les LT CD8 activés et peut également persister à des niveaux modérés chez des adultes sains (Duraiswamy et al. 2011). Ainsi, l'expression d'une seule molécule inhibitrice n'est pas suffisante pour définir l'épuisement mais nécessite l'expression de plusieurs récepteurs inhibiteurs. Blackburn, et al. ont montré que les récepteurs inhibiteurs PD1, Lag3, 2B4 (CD244) et CD160 sont coexprimés lors d'une infection chronique par LCMV-C et que la sévérité de l'infection est déterminée par l'étendue de la coexpression de ces récepteurs (Blackburn et al. 2009). Il existe également d'autres récepteurs inhibiteurs retrouvés dans les modèles d'infection chronique tels que TIM3, CTLA4 ou encore TIGIT.

Dans le but de lever l'inhibition, plusieurs essais de blocages des récepteurs inhibiteurs seules ou en combinaison ont été testés. Blackburn, et al. ont démontré qu'un traitement combiné avec les anticorps anti-Lag3 et anti-PDL1 conduisait à une forte proportion de cellules CD8 produisant de l'IFN γ en comparaison aux traitements anti-PDL1 ou anti-Lag3 seuls, améliorant ainsi le contrôle viral (Blackburn et al. 2009). Chez la souris, la combinaison des traitements anti-TIM3 et anti-PDL1 permet de réduire drastiquement la croissance des tumeurs ou encore le blocage de CTLA4 et PD1 a montré des résultats encourageants pour la régression des tumeurs de patients atteints de mélanome à un stade avancé (Sakuishi et al. 2010; Wolchok et al. 2013).

Les LT CD8 épuisés (Tex) disposent de signatures transcriptionnelles uniques incluant des voies de signalisation cytokiniques dérégulées ou encore l'altération de l'expression de facteurs de transcription (Wherry et al. 2007). Par exemple, les Tex expriment faiblement la protéine CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2 et IL15) ainsi que CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL7). Ainsi, ces cellules sont incapables de s'auto-renouveler et répondent difficilement aux cytokines homéostatiques IL7 et IL15. De plus, les LT épuisés surexpriment des intégrines telles que CD49d ou CD29 et régulent à la baisse CD103, modifiant possiblement leur propriété migratoire. Enfin, certains facteurs de transcription jouent également un rôle dans l'établissement de l'épuisement tels que T-BET et EOMES qui délimitent des sous-ensembles de LT épuisés avec des capacités prolifératives distinctes permettant le maintien des populations épuisées (Wherry and Kurachi 2015). Bien d'autres facteurs de transcription ont permis d'élucider l'hétérogénéité des LT CD8 épuisés mais nous y reviendrons dans la partie II. 3.2.2.

TABLE 2 : COMPARAISON DES PROPRIETES ENTRE DES LT CD8 MEMOIRES FONCTIONNELLES ET DES LT CD8 MEMOIRES EPUISEES

Fonctions	Mémoires fonctionnelles	Mémoires épuisées
Potentiel de prolifération	+++	+/-
Production de cytokines	+++	+/-
Expression de récepteurs inhibiteurs	-	++
Auto-renouvellement médié par l'IL7 et l'IL15	++	-
Dépendance à l'antigène	-	+

Dans cette première partie d'introduction, nous avons vu que les LT CD8 naïfs sont activés et déclenchent une réponse immunitaire primaire. Les cellules, en réponse à la reconnaissance de l'antigène couplée à des signaux de costimulation et d'inflammation, prolifèrent et se différencient en cellules effectrices dotées de propriétés cytotoxiques indispensables pour la résolution de l'infection. Cette réponse laisse place ensuite à la génération de cellules mémoires pouvant persister plusieurs années. Nous avons pu voir que

le pool de mémoires est très hétérogène notamment en termes de qualité fonctionnelle pouvant avoir un impact sur la protection de l'hôte.

Dans la seconde partie d'introduction, nous verrons qu'il existe plusieurs modèles de différenciation des LT CD8 et que des populations de précurseurs de cellules à la mémoire peuvent être générées très tôt après l'infection.

II. A QUEL(S) STADE(S) LES CELLULES MEMOIRES DIVERGENT DES CELLULES EFFECTRICES ?

Afin d'étudier la généalogie des LT CD8 mémoires, il est indispensable de pouvoir suivre les cellules au cours du temps. Dans un contexte physiologique, les LT CD8 sont polyclonaux et comme mentionné dans la partie précédente, il existe entre 80 et 1200 LT par souris qui disposent d'un TCR spécifique d'un antigène donné. Ainsi, cette faible fréquence rend difficile le suivi des réponses immunitaires CD8 spécifiques d'un antigène. Pour pallier ce problème, les scientifiques ont généré des modèles de souris transgéniques pour le TCR. Ainsi, la population de LT CD8 est monoclonale avec un TCR d'une seule spécificité antigénique connue. Ces souris transgéniques pour le TCR sont ensuite croisées avec un fond congénique CD45.1 par exemple (parfois CD90.1) générant ainsi des populations de cellules T transgéniques identifiable via un anticorps anti-CD45.1 (ou anti-CD90.1). Ces cellules sont alors utilisées pour des transferts adoptifs dans des souris syngéniques sauvages, ayant un répertoire T polyclonal, exprimant l'allèle CD45.2 (ou CD90.2) du système CD45.1/2. De cette manière, les cellules transgéniques transférées sont facilement distinguables des cellules endogènes de l'hôte et peuvent être isolées et caractérisées par cytométrie en flux. Cette approche est ainsi amplement employée pour l'investigation de l'hétérogénéité des LT CD8 et de leurs liens de parenté au cours d'une infection.

1. Les modèles de différenciation des lymphocytes T CD8 proposés

Différents modèles de différenciation ont été proposés afin de tenir compte de la prédominance des LT CD8 effecteurs au pic de l'expansion de la phase d'infection primaire puis des cellules mémoires à des moments ultérieurs. Ainsi, classiquement, la différenciation des LT CD8 est décrite via un modèle linéaire dans lequel les LT CD8 mémoires sont dérivés des cellules effectrices cytotoxiques à la suite de l'activation des LT CD8 naïfs par la reconnaissance d'un antigène (Opferman, Ober, and Ashton-Rickardt 1999). Cependant, ce modèle est largement débattu et des modèles alternatifs ont été proposés afin d'expliquer l'hétérogénéité des populations de cellules effectrices et mémoires.

1.1 Modèles linéaires

1.1.1 *Modèle de la force des signaux*

Un des modèles linéaires proposés est le modèle de la force des signaux (**Figure 13A**). Dans ce modèle, la différenciation est déterminée par la force des 3 signaux reçus par le LT CD8 naïf au moment de son activation (Lanzavecchia and Sallusto 2002). Ainsi, elle dépend de l'antigène et plus précisément de la concentration en complexe CMH-I/peptide (signal 1), des molécules de costimulation (signal 2) et des cytokines pro-inflammatoires (signal 3). La quantité de signal perçue détermine le programme transcriptionnel des cellules et donc leur destin. Un faible signal ou intermédiaire favorise la formation des cellules mémoires alors qu'un fort signal entraîne une forte expansion clonale et l'acquisition de gènes associés aux fonctions effectrices conduisant à la formation de cellules cytotoxiques. Cependant, si le signal est délivré en excès, les cellules effectrices sont dans un état dit de différenciation terminale (LT effecteurs terminaux) conduisant à leur mort.

1.1.2 *Modèle du potentiel décroissant*

Le modèle linéaire progressif aussi appelé modèle du potentiel décroissant, propose que la stimulation répétée du TCR et du signal cytokinique induisent la perte progressive du potentiel de mémoire et permettent l'acquisition des fonctions effectrices et des capacités de cytolyse. C'est ainsi la somme des 3 signaux reçus (CMH-I/peptide/TCR, costimulation et cytokines pro-inflammatoires) qui déterminent les différentes étapes de différenciation des cellules naïves. En conséquence, une cellule naïve se différencie en TCM, cellule au potentiel mémoire à longue durée de vie et douée d'auto-renouvellement, puis transite par un état transitionnel (TTM) jusqu'à devenir une TEM et enfin termine sa différenciation en LT effecteur terminal (**Figure 13B**) (Kaech and Cui 2012). Ce modèle diffère du modèle de la force des signaux par le fait que les différents destins cellulaires sont définis de manière linéaire et progressive nécessitant plusieurs cycles successifs de stimulation plutôt qu'en fonction de l'intensité des signaux qui déterminent très tôt le devenir des cellules.

Plusieurs études soutiennent l'hypothèse du potentiel décroissant. En effet, Sarkar, et al. ont montré que la réduction de la stimulation, par transfert de LT CD8 transgénique pour le TCR (c'est-à-dire capable de reconnaître un antigène donné) 3 ou 5 jours après infection par LCMV-A dans des souris à 8 jours qui ont contrôlé l'infection, induit la génération de cellules mémoires à longue durée de vie (Sarkar et al. 2008). Des résultats similaires ont révélé que les cellules T CD8 tardives (c'est-à-dire des cellules antigène-spécifiques transférées dans des souris après infection) sont moins stimulées mais se différencient en LT mémoires et acquièrent principalement un phénotype TCM (D'Souza and Hedrick 2006). De plus, comme évoqué dans le 1.2.3, le prétraitement antibiotique de souris infectée par *L. monocytogenes* réduit l'inflammation et la production d'IFN γ accélérant la formation de cellules mémoires (Badovinac et al. 2004).

1.1.3 *Modèle de l'épuisement progressif*

Plus récemment dans un contexte d'infection chronique, plusieurs études ont démontré que les cellules transitaient par des états intermédiaires avant de terminer leur différenciation en cellules épuisées (**Figure 13C**).

Hudson, et al. ont défini 3 sous-populations sur la base des marqueurs TIM3, un récepteur inhibiteur, et CD101, une glycoprotéine transmembranaire (Hudson et al. 2019). Ainsi, ils ont mis en évidence que des cellules progénitrices (Tpex) aussi appelées « *stem-like* » (TIM3⁻ CD101⁻) se différenciaient en cellules dans un état transitoire (Texint) (TIM3⁺ CD101⁻) avant une progression dans un état terminal épuisés TIM3⁺ CD101⁺ (Tex). Les cellules transitoires ont la particularité de retenir leur potentiel de prolifération et disposent de capacités effectrices leur permettant de contrôler l'infection virale avant une conversion irréversible en cellules Tex aux capacités de division limitée. Cette étude montre également que le blocage de la voie PD1 favorise la prolifération et la différenciation des progéniteurs Tpex en cellules Texint augmentant la population de cellules fonctionnelles. Tsui, et al. ont mis en évidence une hétérogénéité de la population de Tpex sur la base du marqueur CD62L (Tsui et al. 2022). Ils ont ainsi montré que la sous-population Tpex CD62L⁺ possédait des capacités d'auto-renouvellement, de multipotence et de prolifération à long terme supérieures à leur descendant Tpex CD62L⁻.

Beltra, et al. ont démontré l'existence de 4 sous-populations basées sur l'expression de Ly108, un marqueur dont l'expression corrèle à celle de TCF1, et CD69 (Beltra et al. 2020). Ainsi, les auteurs ont identifié 2 populations de progéniteurs : Texprog1 Ly108⁺ CD69⁺ et Texprog2 Ly108⁺ CD69⁻. Les cellules Texprog1 sont des cellules quiescentes qui forment ensuite les cellules Texprog2 possédant des capacités de prolifération. Ces seconds progéniteurs se convertissent ensuite en cellules intermédiaires Textint doubles négatives pour Ly108 et CD69. Ces intermédiaires réacquièrent un profil transcriptionnel semblable aux cellules effectrices avant de terminer leur différenciation dans un état Tex terminal (Ly108⁻ CD69⁺). Le blocage de la voie PD1 a montré une prolifération sélective des progéniteurs 2 Texprog2 et des cellules Texint.

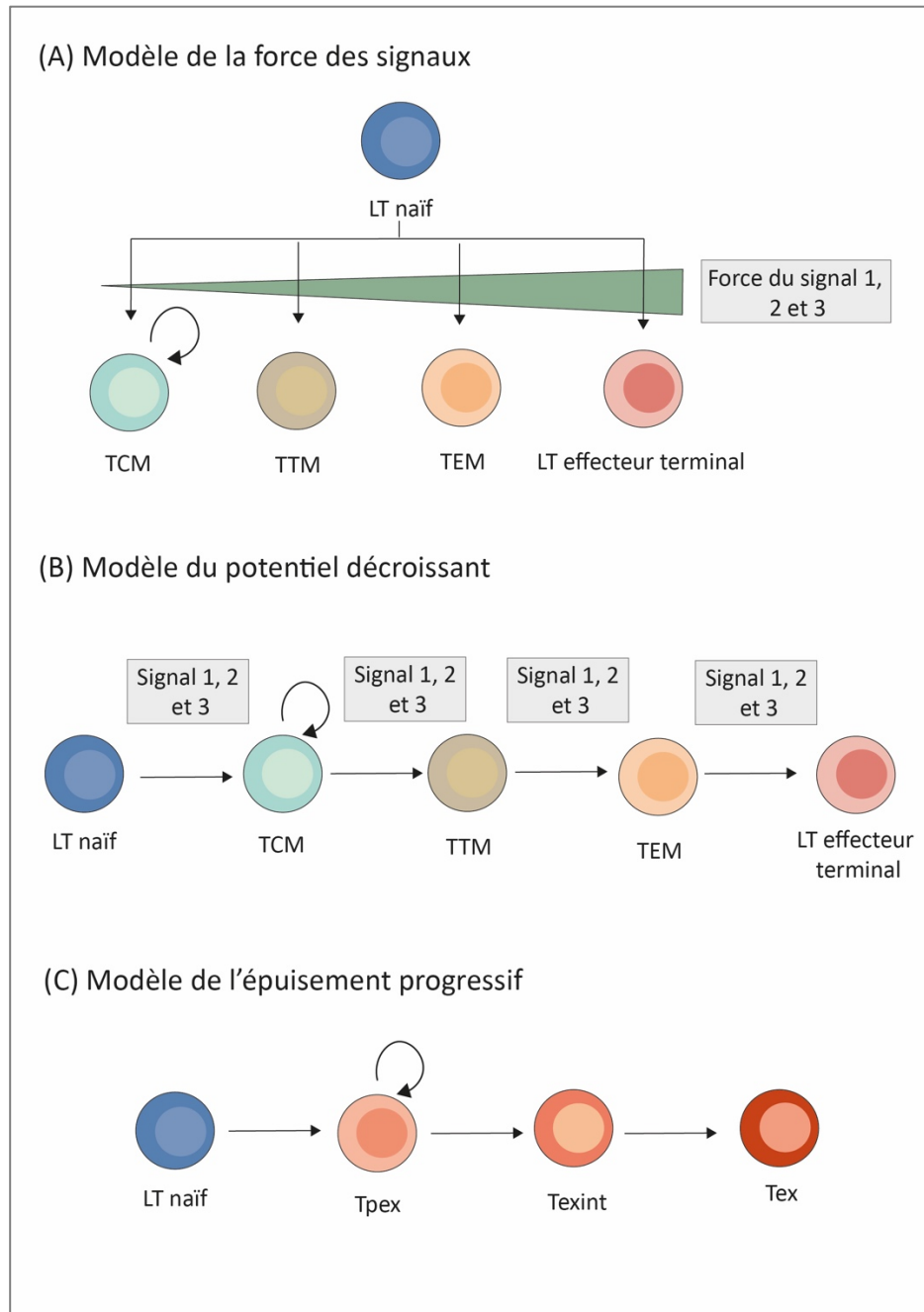


FIGURE 13 : MODELES DE DIFFERENCIATION LINEAIRE

(A) **Modèle de la force des signaux** : le destin des cellules dépend de la quantité des signaux 1, 2 et 3 (CMH-I/antigène, costimulation et cytokines inflammatoires respectivement) perçus par le LT CD8 naïf lors de son activation par la CPA. Ainsi, un faible signal induit la différenciation en cellules mémoires (TCM puis TTM puis TEM) alors qu'un fort signal génère des LT effecteurs. (B) **Modèle du potentiel décroissant** : les cycles successifs de stimulation via les 3 signaux d'activation induisent la perte progressive du potentiel de mémoire et permettent la différenciation en LT effecteurs terminaux cytotoxiques. (C) **Modèle de l'épuisement progressif** : lors d'une infection chronique, la persistance de l'antigène conduit à l'épuisement des LT CD8. Dans ce modèle, les cellules transitent par différents états : les progéniteurs de LT épuisés (Tpex) se différencient en LT intermédiaires épuisés (Texint) avant une progression irréversible en cellules épuisés (Tex) dépourvus de fonctions effectrices. TCM : LT mémoire centrale ; TEM : LT mémoire effecteur ; TTM : LT mémoire transitoire ; Tpex : progéniteur de LT épuisés ; Texint : LT épuisé transitoire ; Tex : LT épuisé.

1.2 Modèles branchés

1.2.1 *Modèle de la division asymétrique*

Le modèle branché fait référence au fait qu'un seul LT précurseur pourrait donner naissance à la fois à des cellules effectrices et à des cellules mémoires par division asymétrique se produisant lorsque les LT naïfs sont activés par la CPA (**Figure 14**) (Chang et al. 2007). Ainsi, le destin de la cellule fille en contact avec la synapse immunitaire, c'est-à-dire la cellule fille proximale, serait orienté vers la différenciation effectrice alors que la cellule distale acquerrait un phénotype mémoire (Arsenio et al. 2014; Chang et al. 2007). Le destin des cellules est donc influencé par la synapse immunitaire qui oriente la répartition des protéines entre les cellules filles après division de la cellule T précurseur. Chang et al. ont montré que le facteur de transcription T-Bet subissait une dégradation inégale entre les 2 cellules filles résultant en une répartition différente entre les cellules (Chang et al. 2011). Ceci semble s'expliquer par une localisation asymétrique du protéasome à l'origine de la dégradation du facteur. De même, Pollizzi, et al. ont rapporté une division asymétrique de la protéine mTORC1 conduisant à une activité accrue de mTORC1 dans l'une des cellules filles ainsi qu'à une hausse de l'activité glycolytique et des molécules effectrices (Pollizzi et al. 2016). Au contraire, la seconde cellule présentait une activité réduite de mTORC1, un métabolisme lipidique et une expression de molécules anti-apoptotique affichant ainsi un phénotype mémoire à longue durée de vie. De plus, Arsenio, et al. ont mis en évidence une distribution asymétrique de CD25 ainsi que de CD62L dans les LT préparant leur première division, pouvant influencer le profil transcriptionnel des cellules (Arsenio et al. 2014). Ainsi, celles présentant une forte expression de CD25 expriment moins CD62L et produisent davantage d'IFN γ et de GzmB, reflétant un phénotype effecteur.

1.2.2 *Modèle SLEC/ MPEC*

Le modèle SLEC/ MPEC met en évidence l'hétérogénéité du pool de cellules effectrices possédant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes. Kaesh, et al., ont été les premiers à montrer la présence de 2 populations d'effecteurs 8 jours après infection par LCMV-A sur la base de l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL7 (IL7R α ou CD127) (Kaech et al. 2003). Ainsi, environ 5 à 15% des cellules effectrices expriment fortement l'IL7R α (IL7R α^{hi}) au pic de l'expansion (jours 8 post-infection). Le transfert des populations IL7R α^{hi} et IL7R α^{lo} dans des souris naïves a montré que seules les cellules IL7R α^{hi} exprimant davantage de marqueurs de survie tels que Bcl2 et BclXL, donnaient naissance à des cellules mémoires fonctionnelles à longue durée de vie. L'étude de Joshi, et al. a permis de raffiner ces populations de cellules effectrices en démontrant que KLRG1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1) permettait une discrimination précoce (jours 4-5 après infection par LCMV-A) des deux populations (Joshi et al. 2007).

Ainsi, la population d'effecteurs est composée de cellules KLRG1^{hi} IL7R α ^{lo} dénommées SLEC (*Short Live Effector Cell*) qui sont progressivement éliminés après contraction, et de cellules MPEC (KLRG1^{lo} IL7R α ^{hi} – *Memory Precursor effector cell*) ayant la capacité de se différencier en cellules mémoires (**Figure 14**). Cependant, bien que les MPEC soient des précurseurs à la mémoire, ces cellules expriment des niveaux de GzmB et d'IFN γ et disposent de capacité cytotoxiques similaires aux SLEC (Joshi et al. 2007; Sarkar et al. 2008). Ceci démontre que les MPEC sont composés d'effecteurs participant à la réponse immunitaire.

Plus tard, Plumlee, et al. ont montré qu'une population d'effecteurs précoces (EEC - KLRG1^{lo} IL7R α ^{lo}) était présente avant le pic d'expansion soit entre 2 et 5 jours après infection et donnait naissance à la fois aux SLEC et aux MPEC (Plumlee et al. 2015) (**Figure 14**).

Il est à noter que l'expression du marqueur KLRG1 par les LT CD8 est associée à certains pathogènes telles que les infections à LCMV ou encore *L. monocytogenes*.

1.2.3 Modèle NELM linéaire progressif branché

Le modèle quantitatif établi dans l'équipe, est basé sur une approche mathématique permettant de décrire la dynamique d'évolution de la taille des populations afin de tester et établir de potentiels liens de descendance (Crauste et al. 2017). Les auteurs ont premièrement réalisé une analyse transcriptomique à partir d'un jeu de données contenant des LT CD8 transgéniques du stade naïf à mémoire après des infections à *Listeria* et au VSV. Cette analyse a mis en évidence d'une part, que la phase effectrice est divisée en 2 stades avec une phase précoce suivie d'une phase tardive à partir du 8^e jours après infection. D'autre part, ils ont identifié 2 marqueurs, Mki67 (marqueur de prolifération) et Bcl2 (marqueur de survie), définissant 2 populations d'effecteurs et une population de mémoire au cours d'une infection par VV. Ainsi, les populations ont été définies comme suit : LT CD8 naïfs (CD44⁻ Bcl2⁺ Mki67⁻), effecteur précoce (CD44⁺ Bcl2⁻ Mki67⁺), effecteur tardif (CD44⁺ Bcl2⁻ Mki67⁻) et LT mémoires (CD44⁺ Bcl2⁺ Mki67⁻). Une modélisation mathématique a ensuite permis de comparer les différents modèles de différenciation existants et d'évaluer leur capacité à reproduire la cinétique quantitative des nombres de cellules de chaque sous-populations. Les résultats ont indiqué que la majorité des LT CD8 mémoires suivent une voie de différenciation linéaire depuis les LT CD8 naïfs (N) en passant par un stade effecteur précoce (E - *early*) puis tardif (L - *late*). Cependant, ce modèle NELM (*Naive – Early – Late – Memory*) n'exclut pas qu'une petite minorité de cellules mémoires puisse être générée à partir des LT naïfs ou effecteurs précoces réconciliant ainsi les modèles linéaires et branchés (**Figure 14**).

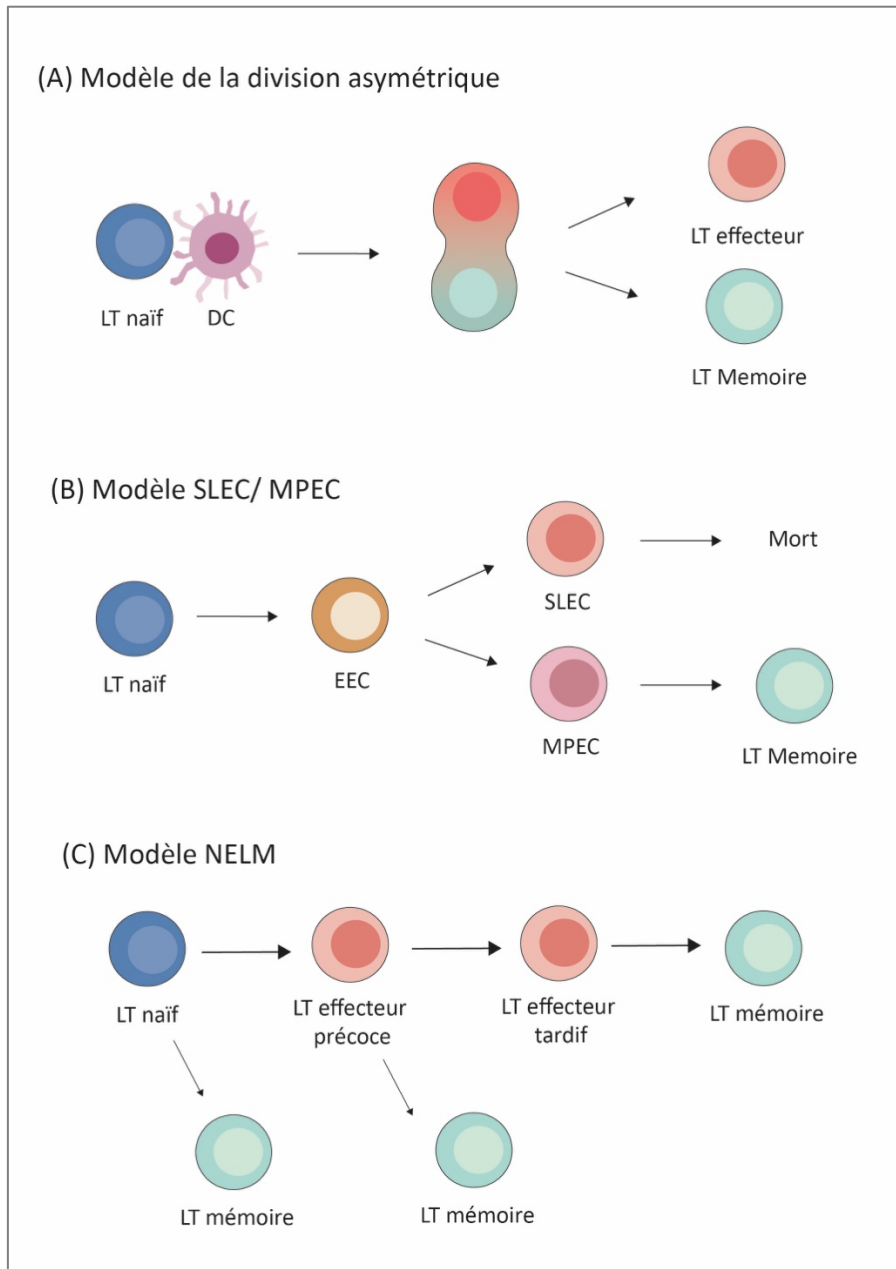


FIGURE 14 : MODELES DE DIFFERENCIATION BRANCHEE

(A) **Modèle de la division asymétrique** : le modèle de la division asymétrique suggère qu'un précurseur LT naïf est capable de générer une cellule effectrice et une cellule mémoire par le biais de la division asymétrique aussitôt que la cellule CD8 est activée par la CPA (ici la cellule dendritique - DC). La cellule proximale, étant la cellule la plus proche de la CPA, acquiert un phénotype effecteur alors que la cellule distale (la plus éloignée de la CPA) se différencie en cellule mémoire. (B) **Modèle SLEC/ MPEC** : ce modèle met en évidence une hétérogénéité du pool de cellules effectrices. Après activation, les LT naïfs se différencient en LT effecteurs précoces (EEC) pouvant générer à la fois des cellules effectrices à courte durée de vie (SLEC) et cellules effectrices précurseurs de la mémoire (MPEC). Ces dernières ont la capacité de se différencier en LT mémoires contrairement aux SLEC qui meurent par apoptose après contraction. (C) **Modèle NELM** : ce modèle est basé sur une modélisation mathématique démontrant que lors d'une infection aiguë, les LT CD8 naïfs suivent une différenciation linéaire jusqu'au stade mémoire transitant par un état effecteur précoce puis tardif. Le modèle n'exclut pas la possibilité de branchements mineurs de différenciation mémoire à partir des LT CD8 naïfs ou des LT effecteurs précoces.

1.2.4 Autre modèle super-branché

Le modèle SLEC/ MPEC a été largement étayé et enrichi par de nombreuses études mettant en évidence de nouvelles populations de cellules effectrices et mémoires. Notamment, l'étude de Renkema, et al. a montré qu'une population KLRG1^{hi} CD127^{lo} était capable de persister dans le pool de mémoire (Renkema et al. 2020). Ces cellules qu'ils ont dénommées LLEC (*long-lived effector cell*) sont négatives pour CD27 et CD43 ainsi que pour CD62L (**Figure 15**). Ainsi, la fraction de mémoires CD62L⁻ est hétérogène et comprend les TEM (CD62L⁻ CD27⁺) et les LLEC (CD62L⁻ CD27⁻). Ces LLEC ont la capacité de persister au moins environ 3 mois (maximum évalué par l'étude) et présentent une forte capacité de protection contre une infection à *L. monocytogenes*. Leur profil phénotypique et transcriptomique est à la fois caractéristique des cellules mémoires et des cellules effectrices puisqu'elles surexpriment des gènes associés aux fonctions cytotoxiques (*Gzma*, *GzmB*) et à la différenciation terminale effectrice (*Zeb2*). Enfin, ils ont démontré que les LLEC sont dérivés des SLEC (**Figure 15**). En effet, ils ont isolé les MPEC, les SLEC et les LLEC 12 jours après infection par LCMV-A, puis les ont transférés dans des hôtes naïfs et analysés 30 jours après. Les résultats ont mis en évidence que les MPEC produisaient uniquement des TCM et TEM alors que les SLEC génèrent les LLEC. Ainsi le destin des LLEC est programmé 12 jours après l'infection.

Milner, et al. ont confirmé une hétérogénéité de la population mémoire CD62L⁻ et ont défini une population TEM terminal (t-TEM) n'exprimant pas CD127 contrairement aux TEM (**Figure 15**) (Milner et al. 2020). Cette population exprime des gènes des fonctions cytotoxiques (*Gzma*, *GzmB*) ainsi que des molécules associées à la migration et présentent une capacité de protection équivalente au TEM bien que leur durabilité soit limitée à 5 mois après infection par LCMV-A. Ils ont également démontré que les t-TEM proviennent des cellules KLRG1^{hi} lorsqu'elles sont isolées au jour 7 après infection (**Figure 15**).

Ainsi, sur la base des études de Renkema, et al. et Milner, et al., les t-TEM et les LLEC pourraient être la même population puisqu'elles présentent un phénotype identique (KLRG1^{hi} CX3CR1^{hi} CD62L^{lo} CD127^{lo} CD27^{lo} CD43^{lo}) (Milner et al. 2020; Renkema et al. 2020).

Grâce à un système de reporter KLRG1^{cre}, Herndler-Brandstetter, et al. ont démontré que les cellules effectrices KLRG1^{hi} pouvaient réguler à la baisse le marqueur KLRG1 pendant la phase de contraction conduisant à la génération de TCM, TEM et TRM (**Figure 15**) (Herndler-Brandstetter et al. 2018). Cette population nommée ex-KLRG1 dispose de capacités cytotoxique et proliférative élevées et contribue à une immunité antivirale grippale et antitumorale efficace. Afin d'évaluer les ascendants des cellules exKLRG1, les auteurs ont réalisé des transferts de cellules effectrices démontrant que la population KLRG1^{hi} IL7R α ^{hi} (cellules effectrices doubles positives – Tdpe) génèrent préférentiellement les cellules ex-KLRG1 (**Figure 15**).

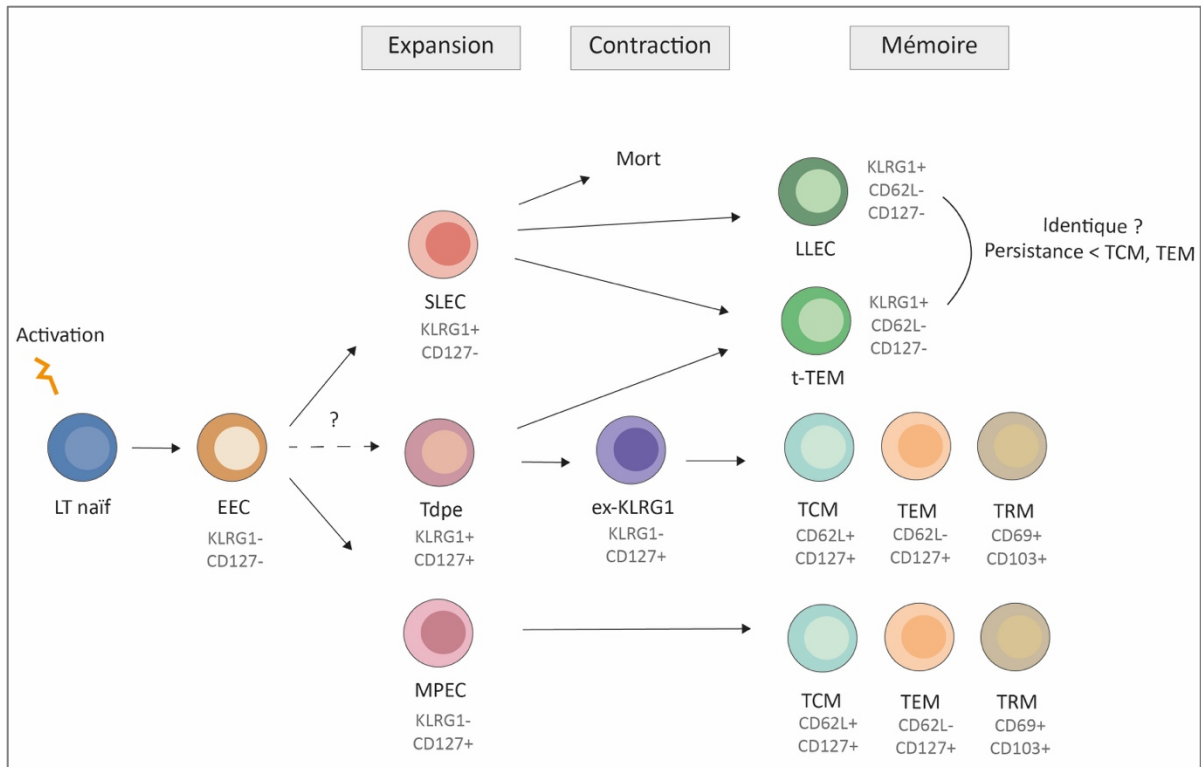


FIGURE 15 : MODELE SUPER-BRANCHE

Lors d'une infection aiguë, les LT naïfs activés se différencient en effecteurs précoces (EEC) qui donnent naissance aux SLEC (cellules effectrices à courte durée de vie) et MPEC (cellules effectrices précurseurs à la mémoire). Les premières études ont initialement montré une décroissance de la population de SLEC pendant la phase de contraction (mort cellulaire). Plus récemment, d'autres études ont mis en évidence qu'une partie de ces cellules étaient capables de donner naissance à des mémoires effectrices (LLEC ou t-TEM) bien que leur durée de vie soit inférieure à celles des TCM et TEM. A noter que ce sont les cellules effectrices KLRG1^{hi} qui donnent naissance aux mémoires t-TEM, englobant de ce fait les SLEC et Tdpe. La population de MPEC persiste et constitue les progéniteurs de la majorité des cellules mémoires regroupant les TCM, TEM et TRM. Enfin, les cellules effectrices doubles positives pour KLRG1 et CD127 (Tdpe) perdent l'expression de KLRG1 au moment de la contraction donnant lieu à une population dénommée ex-KLRG1 pouvant générer les TCM, TEM et TRM. Aucun lien direct de parenté n'a été montré entre les EEC et les Tdpe.

En conclusion, plusieurs modèles ont été proposés mettant en évidence une diversité des populations T effectrices et mémoires. Cette diversité a notamment été mise en avant par l'étude de Stemberger, et al., qui a montré que le transfert adoptif d'une seule cellule T CD8 naïve peut générer une diversité de cellules effectrices et mémoires (Stemberger et al. 2007). Cependant, l'ensemble de ces modèles sont tous imparfaits puisqu'ils sont incapables de résumer l'ensemble des données de la littérature. Toutefois, les modèles les plus récents sont plutôt en faveur d'un ou plusieurs branchements vers la mémoire pendant la phase effectrice.

2. Facteurs de transcription et régulateurs épigénétiques : des acteurs moléculaires de la différenciation effecteur/ mémoire

La différenciation des populations de LT CD8 est influencée par des FT ainsi que des modificateurs de la chromatine déterminant le destin des cellules vers les effecteurs ou la mémoire. Plusieurs études ont mis en évidence ceux pouvant renforcer le phénotype effecteur ou, à l'inverse le phénotype mémoire, via des systèmes de surexpression ou knockout (KO) de ces acteurs moléculaires. Nous verrons dans les deux prochaines sous-parties les principaux d'entre eux régulant la différenciation effecteur/ mémoire.

2.1 Acteurs moléculaires renforçant la différenciation vers le phénotype effecteur

Le FT T-BET, reconnaissant des motifs T-box sur l'ADN, joue un rôle essentiel dans la différenciation des LT CD8 (**Figure 16**). En effet, Joshi, et al. ont montré qu'un KO ou une surexpression de T-BET induisait une diminution ou une augmentation de la formation des SLEC respectivement après infection par LCMV-A (Joshi et al. 2007). Le niveau d'expression de T-BET est notamment régulé par les signaux inflammatoires et en particulier l'IL-12. Ainsi, plus la quantité ou la durée de l'inflammation est importante, plus T-BET sera exprimé favorisant de ce fait la différenciation en SLEC. De plus, comme mentionné précédemment, le FT T-BET est divisé de manière asymétrique entre les cellules filles où il est préférentiellement enrichi dans la cellule fille proximale à la synapse corrélant avec une différenciation en SLEC (Chang et al. 2011).

Le FT ID2, un inhibiteur de l'activité de liaison à l'ADN des FT basiques hélice-boucle-hélice, est également important pour la régulation des LT CD8 effecteurs (**Figure 16**). En effet, Cannarile, et al. ont remarqué que le gène codant pour ID2 était surexprimé dans les cellules effectrices tardives, soit vers le 5^e jours avec une expression maximale à 8 jours après infection par *L. monocytogenes*, et qu'il était maintenu dans les cellules mémoires (Cannarile et al. 2006). Une investigation approfondie du rôle d'ID2 a montré que 7 fois moins de LT CD8 KO pour ID2 sont générées au pic de l'infection du fait qu'elles soient davantage sujettes à l'apoptose en comparaison aux LT CD8 contrôle. Ainsi, le FT ID2 est essentiel pour la régulation de la survie des cellules effectrices T CD8.

Un 3^e FT impliqué dans la différenciation des effecteurs est Zeb2, un répresseur transcriptionnel de liaison à l'ADN interagissant avec les SMAD activés. L'expression du gène codant pour le FT ZEB2 est ainsi régulée à la hausse dans les LT CD8 effecteurs et notamment les cellules KLRG1^{hi} (**Figure 16**) (Omilusik et al. 2015). Son expression est d'ailleurs diminuée dans des LT déficientes pour ID2. La déficience en ZEB2 conduit à un plus faible nombre des LT CD8 effecteurs KLRG1^{hi} et augmente la proportion de MPEC. De plus, les gènes associés à la mémoire sont davantage exprimés dans les cellules en absence de ZEB2. Ainsi, ces résultats suggèrent que ZEB2 pourrait réprimer le programme mémoire dans les cellules effectrices et ainsi favoriser la différenciation en effecteur. De plus, l'étude d'Omilusik, et al. montre des sites T-box au niveau du gène ZEB2 et que T-BET et ZEB2 régulent l'expression de gènes similaires dans les LT effecteurs. Ils proposent ainsi un rôle pour T-BET dans la régulation positive de l'expression de ZEB2.

Ces 3 exemples de FT ne constituent pas une liste exhaustive et bien d'autres ont été décrits comme étant impliqués dans la différenciation vers le phénotype effecteur tels que IRF4, STAT4 ou encore BLIMP1 (**Figure 16**) (Chang, Wherry, and Goldrath 2014; Kaech and Cui 2012).

La régulation de l'état épigénétique et chromatinien des cellules T influence également leur destin. Ezh2, appartenant au complexe PRC2 (Polycomb repressive complex 2), est une enzyme induisant la méthylation des histones au site H3K27 et donc la répression transcriptionnelle. Cette enzyme est notamment exprimée dans les LT CD8 activés et sa délétion conduit à une réduction de la proportion de SLEC suite à une infection par LCMV-A ainsi qu'à une altération des réponses secondaires lors d'une réinfection (Gray et al. 2017). La caractérisation de la modification des histones via l'acétylation (H3K27ac) ou la méthylation (H3K27me3) des LT CD8 effecteurs après infection par LCMV-A a mis en évidence des dépôts préférentiels d'H3K27me3 au niveau de gènes pro-mémoires réprimant de ce fait ces gènes dans les effecteurs. Ils ont également investigué à quel moment le destin des cellules était déterminé et ont montré une augmentation des marques H3K27me3 dans les SLEC 10 jours après l'infection suggérant une détermination tardive du destin effecteurs. Ainsi, Ezh2 est requis pour l'expansion des LT CD8 effecteurs et leur différenciation terminale (Gray et al. 2017; Kakaradov et al. 2017).

L'enzyme Suv39h1, a un rôle similaire à Ezh2 en induisant un transfert de méthylation au site H3K9 et donc la répression transcriptionnelle. En effet, Pace, et al. ont montré qu'un KO de Suv39h1 conduisait à un défaut de réponse à *L. monocytogenes* puisque le nombre de LT CD8 7 jours après infection est diminué et les mémoires présentent un défaut de protection lors d'un second challenge (Pace et al. 2018). De plus, ils ont mis en évidence une augmentation des marques H3K9me3 dans les cellules effectrices isolées 8 jours après infection par *L. monocytogenes* alors qu'elles sont réduites en absence de Suv39h1. La déficience en Suv39h1 conduit au défaut de répression de gènes associés à la mémoire et aux pré-mémoires corrélant ainsi avec la diminution en marque répressive H3K9me3. En conséquence, Suv39h1 permet le développement des LT CD8 effecteurs terminaux en réprimant les gènes associés aux précurseurs de la mémoire.

2.2 Acteurs moléculaires renforçant la différenciation vers le phénotype mémoire

De la même manière que des FT influencent la différenciation en effecteurs, d'autres favorisent le phénotype mémoire. D'ailleurs, nous ne l'avons pas mentionné précédemment, mais certains FT fonctionnent par paire de manière antagoniste. C'est le cas de T-BET et EOMES (Eomésodermine), ID2 et ID3, ou encore BLIMP1 et BCL6 (Kaech and Cui 2012).

Le FT EOMES, reconnaissant comme T-bet des motifs T-box sur l'ADN, joue un rôle opposé à T-BET (**Figure 16**). En effet, des expériences de KO de T-BET ont montré une augmentation des mémoires TCM dans des souris naïves âgées de 6-12 mois alors que cette

population est diminuée en absence d'EOMES (Banerjee et al. 2010). Le niveau d'inflammation influe non seulement sur le niveau d'expression de T-BET (comme précédemment évoqué) mais diminue également le niveau d'EOMES (Takemoto et al. 2006).

Après résolution de l'infection, la quantité d'IL-12 est négligeable et EOMES voit son expression augmenter dans les LT CD8 mémoires alors que celle de T-BET est diminuée. Rao, et al. ont montré que l'IL-12 permettait l'activation de la protéine kinase mTORC1 conduisant à l'inhibition du FT FOXO1 et donc à l'expression de T-bet. Ainsi, un traitement à la rapamycine, permettant l'inhibition de mTORC, des LT CD8 activés en présence d'IL-12, induit l'activation de FOXO1 qui favorise alors l'expression d'EOMES. Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre le rôle du FT EOMES dans la persistance des LT CD8 mémoires.

Yang et al. ont généré des souris rapportrices avec un knock-in de la séquence codant pour la GFP dans le locus du FT ID3 leur permettant de distinguer les cellules avec une forte (ID3-GFP^{hi}) ou faible (ID3-GFP^{lo}) expression d'ID3 (Yang et al. 2011). Ils ont ainsi montré une corrélation entre l'expression du FT ID3 et la fréquence des MPEC (KLRG1^{lo} CD127^{hi}) 7 jours après une infection par VSV. Les cellules effectrices exprimant fortement ID3 (ID3-GFP^{hi}) se différencient préférentiellement en mémoire à longue durée de vie alors que les cellules ID3-GFP^{lo} génèrent majoritairement des SLEC (**Figure 16**).

Le FT TCF1 est un composant clé pour la différenciation vers les mémoires T CD8 (**Figure 16**). TCF1 est exprimé dans les LT naïfs puis décroît dans les cellules effectrices bien qu'il soit maintenu dans une population effectrice de phénotype MPEC (Danilo et al. 2018). Son expression ré-augmente ensuite dans les cellules mémoires suggérant un rôle dans la différenciation des LT mémoires. L'analyse des LT CD8 mémoires KO pour le gène *Tcf7* (codant pour TCF1) générées en réponse à une infection par *L. monocytogenes* a mis en évidence une diminution des TCM en faveur des TEM ainsi qu'une perte des cellules mémoires au cours du temps (Zhou et al. 2010). En effet, la perte de TCF1 chez les LT mémoires induit une diminution de la prolifération homéostatique médiée par l'IL15. En absence de TCF1, l'expression d'EOMES diminue réduisant de ce fait la réactivité à l'IL15 puisqu'EOMES est capable d'induire l'expression du gène codant pour la chaîne β du récepteur à l'IL-2. En résumé, TCF1 est requis pour la différenciation des mémoires TCM ainsi que pour maintenir la réactivité à l'IL15. Danilo, et al. ont montré que l'inflammation médiée par l'IL-12 conduit à la régulation à la baisse de l'expression du gène *Tcf7* 48h après activation des LT CD8 (Danilo et al. 2018). L'inhibition de *Tcf7* se fait par l'intermédiaire de la voie de signalisation IL-12R β 2/STAT4 et conduit à la différenciation en effecteur. Les auteurs ont investigué si la régulation négative de TCF1 médiée par l'IL-12 dépendait du cycle cellulaire. Ils ont stimulé *in vitro* des LT CD8 transgéniques avec un peptide puis bloqué le cycle cellulaire 48h après activation avec de l'aphidicoline (arrêt en phase G1/S) prévenant la diminution de TCF1. Ainsi, la perte de TCF1 induite par l'inflammation requière que les cellules se divisent.

Une nouvelle fois, d'autres FT sont impliqués dans l'établissement de la mémoire T CD8 et nous pouvons énumérer FOXO1, BACH2, STAT3, BCL6, ZEB1 ou encore RUNX3 (**Figure 16**) (Kaech and Cui 2012; Pipkin 2021).

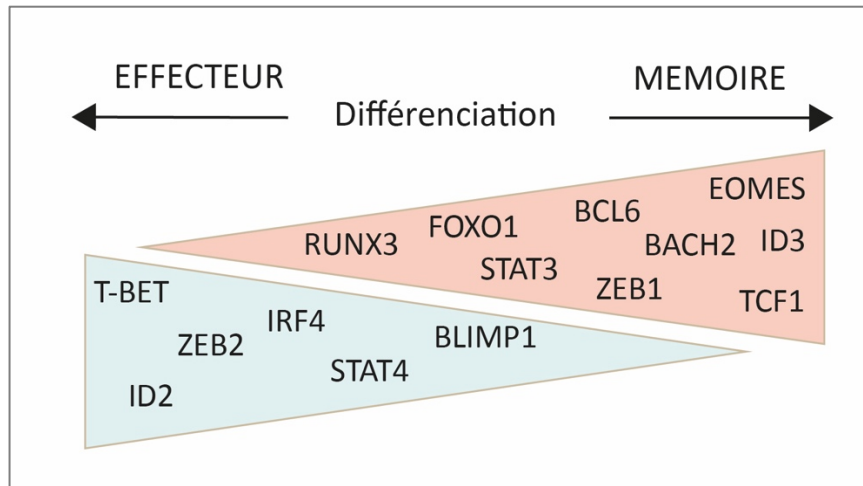


FIGURE 16 : FACTEURS DE TRANSCRIPTION REGULANT LA DIFFERENCIATION EFFECTEUR OU MEMOIRE

Les programmes transcriptionnels régulant la différenciation des cellules effectrices et mémoires sont basés sur une expression graduelle de FT dont certains ont des rôles antagonistes. Les FT contrôlant la différenciation des cellules effectrices sont répertoriés dans le triangle bleu alors que ceux favorisant la différenciation des mémoires sont représentés dans le triangle rouge. Leur position dans chaque triangle n'a pas de signification, c'est-à-dire que T-BET n'est pas plus important que BLIMP1 pour la différenciation en LT effecteur.

3. Existence de cellules souches mémoires

Nous avons pu voir qu'il existe une grande diversité des populations de LT CD8 après leur activation et particulièrement des cellules mémoires dont certaines sous-populations ont récemment été décrites. Nous avons déjà abordé la notion de précurseurs de la mémoire (MP) ou cellules souches mémoires notamment avec la mise en évidence des MPEC qui sont générées pendant la phase d'expansion des LT CD8 (Joshi et al. 2007). Le concept de cellules souches englobe à la fois la capacité des cellules à s'auto-renouveler, la persistance à long terme ainsi que la génération du spectre de cellules plus différenciées. Nous allons ainsi voir dans les sous-parties suivantes que plusieurs sous-types de cellules souches précurseurs de cellules mémoires ont été identifiés dans différents contextes.

3.1 Les lymphocytes T mémoires souches (TSCM)

Zhang, et al. ont identifié une nouvelle population de mémoires dans des modèles murins de la maladie humaine du greffon contre l'hôte (GVHD – Graft-Versus-host disease) dénommée cellules souches à mémoires T (TSCM) (Zhang et al. 2005). En effet, ces cellules ont la capacité de s'autorenouveler via la stimulation par des DC et de l'IL15, de proliférer et se différencier en cellules mémoires TCM et TEM. Ces TSCM sont caractérisées par un phénotype naïf (CD44^{lo} CD62L^{hi}) mais différent des LT naïfs par l'expression de fort niveau de Sca-1, CD122 (IL-2R β) ainsi qu'une forte expression des gènes Cxcr3 et Ccr5. Gattinoni, et al.

ont montré qu'un blocage *in vitro* de la voie Wnt via un inhibiteur de glycogène synthase kinase-3b (Gsk-3 β) conduisait non seulement à l'arrêt de la différenciation en effecteur mais permettait également la génération de TSCM murines (Gattinoni et al. 2009).

Chez l'Homme, les TSCM représentent 2 à 3% des LT circulants (Gattinoni et al. 2011). Ils sont identifiés sur la base du phénotype naïf CD45RO⁻, CCR7⁺, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺ et IL7R α ⁺ et expriment également des marqueurs mémoires tels que CD95, IL-2R β , CXCR3, et LFA1 (**Table 3**). Gattinoni, et al. ont montré que ces TSCM disposaient de propriétés de LT mémoires conventionnelles (TCM, TEM) (Gattinoni et al. 2011). En effet, après 4H d'exposition à *Staphylococcus enterotoxin B* (SEB), les TSCM sont capables de produire de l'IFN γ , du TNF α et de l'IL-2 acquérant ainsi les fonctions effectrices après stimulation du TCR. De plus, elles peuvent proliférer extensivement en réponse à une stimulation du TCR et présentent une dépendance à l'IL15 pour le renouvellement homéostatique. Bien qu'elles aient des caractéristiques de cellules mémoires, la comparaison de leur transcriptome avec les mémoires conventionnelles a montré qu'elles représentaient une sous-population de mémoires les moins différenciées. En effet, elles expriment plus faiblement la signature de gènes associés aux fonctions effectrices par rapport aux TCM et TEM et expriment davantage les gènes associés aux LT naïves bien qu'elles soient transcriptionnellement différentes de celles-ci. Cieri, et al. ont étudié la différenciation des LT en utilisant un modèle de greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) de donneurs haplo identiques et ont montré que les TSCM humains étaient générés très tôt et se différenciaient directement à partir des cellules naïves (Cieri et al. 2015). Ils montrent également grâce au séquençage du TCR des LT naïves, TSCM, TCM et TEM que seuls les LT naïves et TSCM sont capables de reconstituer l'ensemble du pool de mémoires. Lugli, et al. ont investigué la durée de vie des différentes sous-populations de mémoires T spécifiques de peptides dérivés du virus de l'immunodéficiência simienne (Lugli et al. 2013). Ils ont montré qu'après une perte de l'antigène, les TCM et TEM ont subi une forte contraction (10 et 100 fois respectivement) alors que les TSCM sont capables de persister à des niveaux équivalents jusqu'à 70 jours après l'infection.

Les TSCM humains ont été identifiés dans des contextes de vaccinations ou d'infections chroniques par diverses pathogènes incluant les virus (HIV), les bactéries (*Mycobacterium tuberculosis*) ou encore les parasites (*Trypanosoma cruzi*). Il n'est pas évident de distinguer entre l'effet protecteur et pathogènes de ces TSCM. En effet, plusieurs études ont montré leur implication dans des pathologies humaines telles que l'auto-immunité ou encore HIV (Gattinoni et al. 2017).

TABLE 3 : COMPARAISON DU PHENOTYPE DES TSCM AUX LT NAÏFS, EFFECTEURS ET MEMOIRES CHEZ L'HOMME

Marqueur	LT naïf	TSCM	TCM	TEM	LT effecteur
CD45RA	+	+	-	-	+
CD45RO	-	-	+	+	-
CCR7	+	+	+	-	-
CD62L	+	+	+	-	-
CD27	+	+	+	+/-	-
CD28	+	+	+	+/-	-
IL7R α	+	+	+	+/-	-
IL-2R β	-	+	+	+	+
CD95	-	+	+	+	+
CXCR3	-	+	+	-	-

3.2 Les précurseurs de la mémoire (MP)

3.2.1 Dans un contexte d'infection aiguë

Lors d'une infection aiguë, les cellules effectrices précurseurs de la mémoire (MPEC) ont été mise en évidence dès 4 jours après infection sur la base de l'expression de KLRG1 et CD127 (Joshi et al. 2007; Kaech et al. 2003). Ces cellules ont été caractérisées par Sarkar, et al. qui ont montré qu'après 4,5 jours d'infection par LCMV-A, les MPEC (KLRG1^{lo} CD127^{hi}) ont une capacité de cytotoxicité équivalente et expriment autant de GzmB, d'IFN γ et de TNF α que les SLEC (KLRG1^{hi} CD127^{lo}) (Sarkar et al. 2008). En revanche, les MPEC produisent davantage d'IL-2 ce qui est une propriété des LT mémoires. L'analyse transcriptomique par puce à ADN a mis en évidence seulement 79 gènes différentiellement exprimés entre les 2 populations comprenant des gènes associés aux fonctions effectrices, à l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire qui sont davantage exprimés par les SLEC. Ainsi, les MPEC passent à travers un état effecteur mais sont moins différenciées et peuvent persister sur le long terme et générer l'ensemble des sous-populations de mémoires (TCM, TEM, TRM).

Johnnidis, et al. ont raffiné cette population de MPEC en mettant en évidence pendant la phase d'expansion, une sous-population exprimant CD62L qui représente 5-10% des MPEC et qui est présente après une infection par LCMV-A mais aussi par *L. monocytogenes* et VSV (Johnnidis et al. 2021). Les analyses phénotypiques et transcriptomiques de ces cellules MP CD62L^{hi} ont révélé une expression de marqueurs d'activations, une quiescence relative, un auto-renouvellement ainsi que des traits de différenciation effecteur limités. Elles ont la particularité de disposer d'un système de surveillance et de maintenance de l'intégrité de leur génome renforcé. En effet, Johnnidis, et al. ont réalisé des essais de perturbation du génome avec de la doxorubicine induisant des dommages à l'ADN, 6 jours après infection par LCMV-A. Ils ont montré que seuls les cellules précurseurs CD62L^{hi} étaient résistantes au traitement. Ces MP centrales expriment également un plus fort niveau de récepteurs inhibiteurs tels que PD1,

LAG3, CTLA4 pendant la phase effectrice. Un KO de PD1 ou double KO PD1/LAG3 conduisent à un défaut de génération de ces MP CD62L^{hi} et compromettent leur durabilité dans le pool de mémoires. Enfin, ils ont mis en évidence que cette population constituait un sous-ensemble de la population TCF1⁺, FT essentielle pour le développement des MP et des mémoires T CD8 comme évoqué dans la partie II.2.2.2.

Étant donné l'implication de TCF1 dans le développement des TCM, des études se sont focalisées sur l'expression de ce FT pendant la phase effectrice et ont mis en évidence une petite population de MP centrale (Lin et al. 2016; Pais Ferreira et al. 2020). En effet, après 8 jours d'infection par LCMV-A, 3% des cellules restent TCF1⁺ et bien que 80% de ces cellules soient des MPEC, seulement 10% des MPEC sont TCF1⁺ (Pais Ferreira et al. 2020). Lin, et al. ont montré que les cellules filles générées pendant les 3 premières divisions après activation des LT naïfs captaient des signaux prolifératifs inégaux mais maintenaient l'expression de TCF1 (Lin et al. 2016). Ainsi, la cellule fille la plus quiescente présente un phénotype mémoire centrale alors que celle plus activée présente des traits effecteurs. Après 3 ou 4 divisions, les LT TCF1⁺ (identifiée grâce à un knock-in de la séquence codant pour la GFP dans le locus Tcf7) peuvent donner naissance à des cellules TCF1⁻ acquérant un phénotype effecteur (KLR1⁺ GzmB⁺) ainsi que des cellules TCF1⁺. Ces dernières, en comparaison des TCF1⁺ des divisions initiales (3 premières divisions), ont des propriétés bipotentes de cellules T mémoires et effectrices confirmé par l'étude de Pais-Ferreira, et al. (Lin et al. 2016; Pais Ferreira et al. 2020). Elles sont capables d'auto-renouvellement, métaboliquement plus actives et davantage effectrice (T-bet⁺, IFN γ ⁺, TNF α ⁺) bien qu'elles ne disposent pas d'activité cytolytique. Elles peuvent à la fois générer des LT effecteurs terminaux TCF1⁻, et contribuer au pool de mémoire TCM. Ainsi, ces MP TCF1⁺ ne passent pas à travers un état effecteur contrairement aux MPEC mais disposent très tôt des fonctions de mémoire centrale leur permettant d'entrer dans le pool de mémoire après infection.

Ces études abordent l'idée que les MP centrales sont caractérisées par un état de quiescence. Des auteurs ont ainsi étudié l'histoire répliquative des cellules T CD8 au cours d'une infection ou d'un challenge vaccinal (Kinjyo et al. 2015; Kretschmer et al. 2020). Kinjyo, et al. ont mis en évidence une population présentant des niveaux intermédiaires de CD62L entre 4 et 6 jours après infection proliférant activement et retenant un état bipotentiel pour devenir effecteur ou mémoire (Kinjyo et al. 2015). En effet, elles sont ensuite capables de générer au pic de l'infection (jours 7-8), des LT effecteurs (CD62L⁻) se divisant rapidement ainsi que des cellules aux phénotypes MP centrale (CD62L⁺) à cycle lent. Ce résultat est confirmé par Kretschmer, et al. qui ont évalué la rapidité du cycle cellulaire des MP centrale (CD62L⁺ CD127⁺) versus des MP effecteurs (CD62L⁻ CD127⁺) et LT effecteurs terminaux (CD62L⁻ CD127⁻) (Kretschmer et al. 2020). En effet, ils ont constaté que les MP centrales progressaient plus lentement dans le cycle cellulaire puisqu'elles présentaient une élongation de la phase G1.

3.2.2 Dans un contexte d'infection chronique

Comme évoqué dans la partie II.1.1.3 (modèle de l'épuisement progressif), dans un contexte d'infection chronique, les cellules transitent par des états intermédiaires dont certaines présentent des caractéristiques de cellules souches avant de terminer leur différenciation en cellules épuisées.

En effet, nous avons vu que Hudson, et al. ont défini 3 sous-populations : des cellules progénitrices (Tpex) (TIM3⁻ CD101⁻), présentant un phénotype de cellules souches, qui donnent naissance à des cellules dans un état transitoire (Texint) (TIM3⁺ CD101⁻) avant une progression dans un état terminal épuisé TIM3⁺ CD101⁺ (Tex) (Hudson et al. 2019). Cette population de cellules souches a été initialement mise en évidence par Im, et al. sur la base de l'expression des marqueurs PD1 et CXCR5 (PD1⁺ CXCR5⁺) (Im et al. 2016). L'analyse transcriptomique de cette sous-population a révélé une expression de gènes associés aux MP tels que Id3, Sell (CD62L) et Il7r (CD127) ainsi que des gènes de la voie Wnt impliqué dans l'auto-renouvellement et la persistance des cellules souches. Ils ont ensuite démontré que cette population PD1⁺ CXCR5⁺ étaient capables de proliférer et ainsi se renouveler, mais également de générer des cellules dans un état terminal épuisé (PD1⁺ CXCR5⁻), les classant de ce fait comme une population aux propriétés de cellules souches. Enfin, ils ont mis en évidence l'expression de TCF1 par ces cellules souches qui semble jouer un rôle primordial pour la génération de cette sous-population.

Ce FT a été largement étudié dans un contexte d'infection aiguë et a été récemment mis en évidence dans plusieurs études (Beltra et al. 2020; Chen et al. 2019; Im et al. 2016). Chen, et al. ont investigué son implication dans la différenciation précoce et la génération initiale des Tex (Chen et al. 2019). En effet, via des analyses de transcriptomique en cellule unique (single-cell RNA-seq), ils ont identifié une population TCF1⁺ PD1⁺ qu'ils ont nommés précurseurs des Tex, rappelant les cellules types souches de Im, et al. (Im et al. 2016). Ces cellules sont présentes très précocement dans la voie de l'épuisement soit dès 8 jours après infection par LCMV-C, responsable de l'infection chronique. TFC1 permet de favoriser la différenciation des précurseurs des Tex et PD1 stabilise ce pool puisque son absence conduit à la réduction de cette population. De plus, le FT TCF1 augmente l'expression d'Eomes ainsi que Bcl2 via c-Myb, favorisant la survie de cette sous-population. Le rôle de c-Myb (ou MYB) a récemment été mis en évidence dans une sous-population de Tpex exprimant CD62L (Tsui et al. 2022). Cette sous-population possède un potentiel prolifératif à long terme ainsi qu'une multipotence permettant de générer et repeupler les Tpex CD62L⁻ et les Tex. Le facteur de transcription c-Myb est essentiel au développement de cette sous-population Tpex CD62L⁺ et induit également l'épuisement fonctionnel des LT CD8 prévenant l'immunopathologie létale.

D'autres FT ont un rôle dans l'établissement de ces populations souches lors d'une infection chronique. En effet, Yao, et al. ont montré que la persistance des cellules progénitrices des Tex (TCF1⁺ TIM3⁻) était dépendante du FT TOX (Yao et al. 2019). Dans une seconde étude, ils ont investigué le rôle de Bach2, un répresseur transcriptionnelle renforçant la différenciation des LT CD8 mémoire, mais dont le rôle dans l'infection chronique n'était pas élucidé (Yao et al. 2021). Ils ont montré que la surexpression de Bach2 conduisait à la différenciation des LT CD8 de type souche ainsi que leur persistance à long terme.

Ainsi, les cellules précurseurs des LT CD8 épuisées présentent des caractéristiques de cellules souches tels que l'auto-renouvellement, la persistance au long terme ainsi que la différenciation vers des cellules davantage différenciées (Texint, Tex) et sont régulées par différents FT (TCF1, PD1, TOX, BACH2).

III. ANALYSE DU TRANSCRIPTOME A L'ECHELLE DE LA CELLULE UNIQUE POUR L'ETUDE DE LA DIVERSITE DES LYMPHOCYTES T CD8

L'essor des technologies de séquençage de ces dernières années a permis de grandes avancées dans l'exploration de l'hétérogénéité du système immunitaire (Papalexi and Satija 2018). En effet, le séquençage d'ARN en cellule unique (*single-cell*-RNA-seq ou scRNA-seq) s'est imposé comme un outil puissant pour permettre l'accès au transcriptome de chaque cellule unique, là où les analyses en populations moyennaient l'expression des gènes et donc masquaient l'hétérogénéité cellulaire et par conséquent, les transitions entre les populations. Nous verrons ainsi dans cette partie quelques méthodes disponibles pour le scRNA-seq ainsi que les étapes permettant l'exploitation des données générées.

1. Technologies de single-cell RNA-seq

Il existe une multitude de protocoles permettant de réaliser du scRNA-seq. Pour plus de clarté, nous verrons 3 méthodes qui sont à la fois les plus utilisées par la communauté et celles que nous avons employées pour nos travaux de recherche à savoir : le MARS-seq, le Smart-seq2 et le 10X (**Figure 17**) (Jaitin et al. 2014; Picelli et al. 2014; Stoeckius et al. 2017). Une version plus évoluée du Smart-seq2, le Smart-seq3, a été mise au point et est également mentionnée (Hagemann-Jensen et al. 2020). Ces méthodes reposent sur la capture des ARN messagers (ARNm) de chaque cellule par leur queue polyA puis sur l'insertion d'un code-barre unique (barcoding) qui permettra, après séquençage, d'attribuer chaque ARNm à la cellule dont il est issu. Nous pouvons découper les protocoles en 4 étapes : l'isolement des cellules (1), la rétrotranscription et le barcoding (2), l'amplification (3) et le séquençage (4).

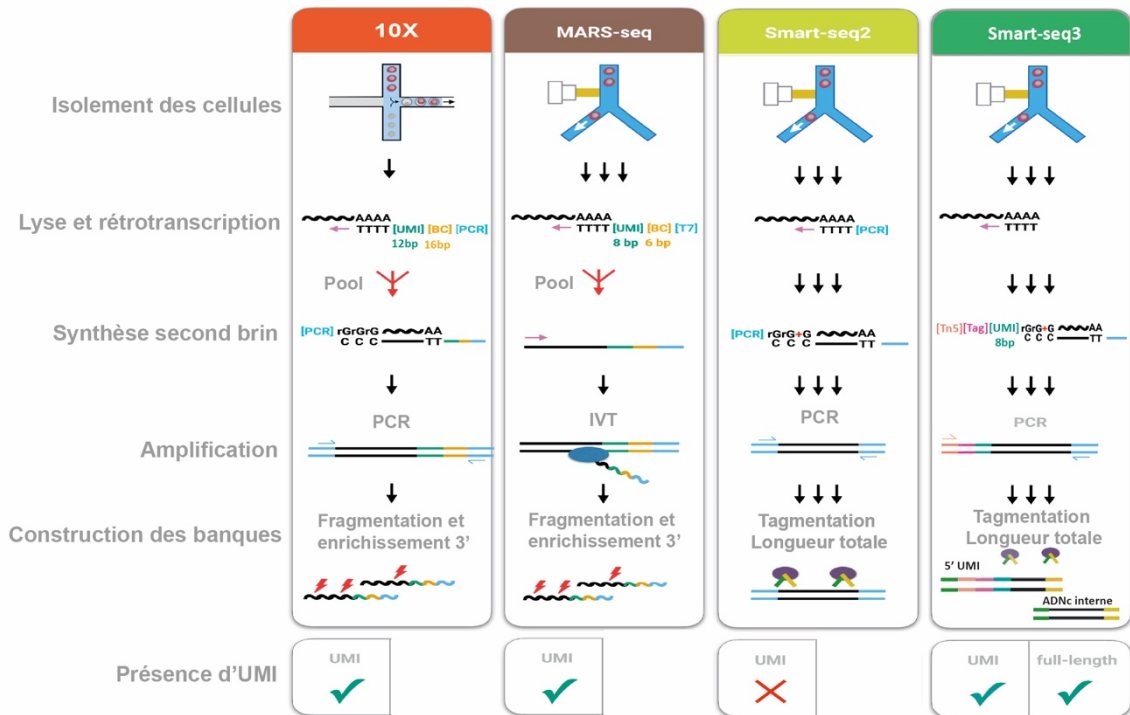


FIGURE 17 : SCHEMA DES ETAPES DE PREPARATION DES BANQUES DES DIFFERENTES METHODES DE SCRNA-SEQ

Les cellules sont d'abord isolées par microfluidique ou FACS puis sont lysées. Chaque ARNm est rétrotranscrits et associés à des code-barres (cellulaire – BC et UMI). Les cellules sont regroupées ou non puis le second brin d'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé. Ils sont ensuite amplifiés par PCR ou IVT (in vitro transcription) puis fragmentés et enfin les amorces de séquençages sont ajoutées. (Schéma repris et adapté de Ziegenhain et al. 2017).

(1) L'isolement des cellules

L'isolement des cellules peut se faire de 2 manières selon la méthode utilisée à savoir via un trieur de cellules (FACS - fluorescence activated cell sorting) ou par microfluidique (10X) (Figure 17).

L'isolement par FACS est réalisé en plaque 96 ou 384 puits contenant chacun des amorces comprenant soit un code-barre unique à la cellule (code-barre cellulaire), des UMI (Unique Molecular Identifier) ainsi qu'une séquence polyT permettant la capture des ARNm dans le cas du MARS-seq ou uniquement une séquence polyT pour le protocole Smart-seq2/3. Les UMI sont de courtes séquences aléatoires (4 à 12 paires de bases) unique à chaque ARNm permettant leur comptage et ainsi pallier le biais d'amplification. En effet, un ARNm qui sera amplifié aura le même UMI alors que plusieurs ARNm d'un même gène auront des UMIs différents.

Un des avantages du FACS est de pouvoir sélectionner une population de cellules d'intérêt ou analyser le phénotype de chaque cellule triée sur la base de marqueurs de surface. Il est

d'ailleurs tout à fait possible de l'utiliser en amont de l'isolation par microfluidique afin de réaliser une sélection d'une population d'intérêt.

La microfluidique, comme son nom l'indique, est une technique de manipulation des fluides dans des microcanaux. Ainsi, une suspension cellulaire est injectée dans un microcanal puis chaque cellule va être encapsulée indépendamment dans des gouttelettes d'huile (ou microréacteur) contenant des réactifs (tampon de lyse, rétrotranscriptase, oligonucléotides) et une bille nommée GEM (Gel bead in EMulsion) (**Figure 18**). Chaque bille est recouverte de séquences nucléotidiques comprenant entre autres, le code-barre cellulaire, des UMI et une séquence polyT. Le phénotype des cellules peut également être évalué grâce au marquage des cellules en amont de l'isolement avec des anticorps conjugués à des oligonucléotides comportant le code-barre cellulaire, une séquence spécifique de chaque protéine et une amorce polyT. Ces anticorps permettent ainsi la mesure de l'expression des protéines à la surface de chaque cellule. Lors de la lyse des cellules, la séquence d'oligonucléotides est traitée de la même manière que les ARNm.

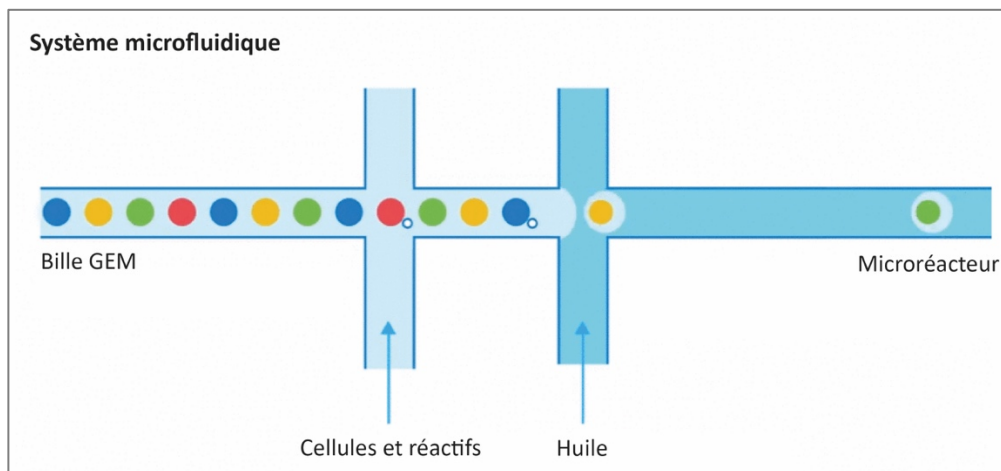


FIGURE 18 : ISOLEMENT DES CELLULES PAR MICROFLUIDIQUE

Chaque cellule va être encapsulée dans une gouttelette d'huile contenant des réactifs et une bille GEM comportant le code-barre cellulaire, les UMIs et l'amorce polyT, formant ainsi un microréacteur. (Schéma repris et adapté de 10X genomics).

(2) La rétro-transcription et le barcoding

Les cellules sont ensuite lysées et les ARNm sont rétro-transcrits à partir de leur queue polyA grâce aux amorces polyT (**Figure 17**). Comme évoqué précédemment, ces amorces comprennent, pour les méthodes de 10X et de MARS-seq, un code-barre cellulaire ainsi que des UMIs. Ainsi, après la rétro-transcription, chaque cellule et molécule d'ADN complémentaire (ADNc) étant identifiées par leur code-barre, les cellules peuvent être regroupées pour la suite de la construction des banques. En revanche, la méthode de Smart-seq2 n'inclut pas de codes-barres à cette étape, le protocole se poursuit donc en plaque. Le protocole de Smart-seq3 permet l'incorporation d'UMIs au moment de la rétro-transcription mais n'inclut pas de code-barre cellulaire ne permettant pas de regrouper les cellules.

(3) L'amplification

Le second brin est synthétisé et les ADNc sont amplifiés afin d'augmenter la quantité d'ADN pouvant être détecté et analysé. L'amplification est réalisée soit par PCR (10X et Smart-seq2) ou bien par transcription *in vitro* (IVT – MARS-seq) (**Figure 17**). L'avantage de l'IVT en comparaison de la PCR est son amplification linéaire et non exponentielle permettant de mieux contrôler les biais d'amplification. Les ADNc sont ensuite fragmentés par réaction enzymatique (10X et MARS-seq) ou par tagmentation (Smart-seq2/3). Ainsi, les protocoles de MARS-seq et 10X permettent un enrichissement en 3' des ADNc, c'est-à-dire que les codes-barres en 3' sont conservés ainsi qu'une partie du transcrit proche de sa queue polyA. A l'inverse, la tagmentation réalisée dans le Smart-seq2 et 3, génère des coupures des ADNc tout en les marquant avec de courtes séquences nucléotidiques qui permettront d'ajouter les amorces de séquençage incluant des codes-barres cellulaires. Cette technique permet de conserver la totalité de la séquence des transcrits ce qui est intéressant pour l'étude des variants d'épissage par exemple. A la différence de la version 2, le Smart-seq3 comprend des fragments enrichis en 5' comprenant les UMIs ainsi que des fragments internes. Ainsi, cette méthode permet le comptage des molécules d'ARN tout en conservant la totalité de la séquence des transcrits.

(4) Le séquençage

Des amorces de séquençage type Illumina sont ajoutées à chaque extrémité des ADNc par PCR. Ces amorces sont des séquences spécifiques permettant leur ancrage sur une lame de séquençage (flowCell) via des sondes complémentaires présentes sur cette lame. Cette flowCell est composée de plusieurs lignes dont chacune comporte des millions de sondes. Ainsi, chaque brin d'ADNc de la banque s'apparie à une sonde et est amplifié par PCR dite en « pont » (le brin s'apparie par une extrémité sur une des sondes puis par son autre extrémité à une autre sonde complémentaire présente à proximité) formant ainsi des clusters d'ADNc identiques sur une petite zone de la flowCell. L'amplification permet d'augmenter la quantité et la qualité du signal au moment du séquençage. Un des brins de chaque cluster est ensuite dénaturé pour permettre le démarrage de la lecture de la séquence qui est réalisée via l'ajout de nucléotides couplés à des fluorochromes. Lorsque le nucléotide s'apparie, il y a émission et lecture optique de la fluorescence émise pour chaque cluster (**Figure 19**).

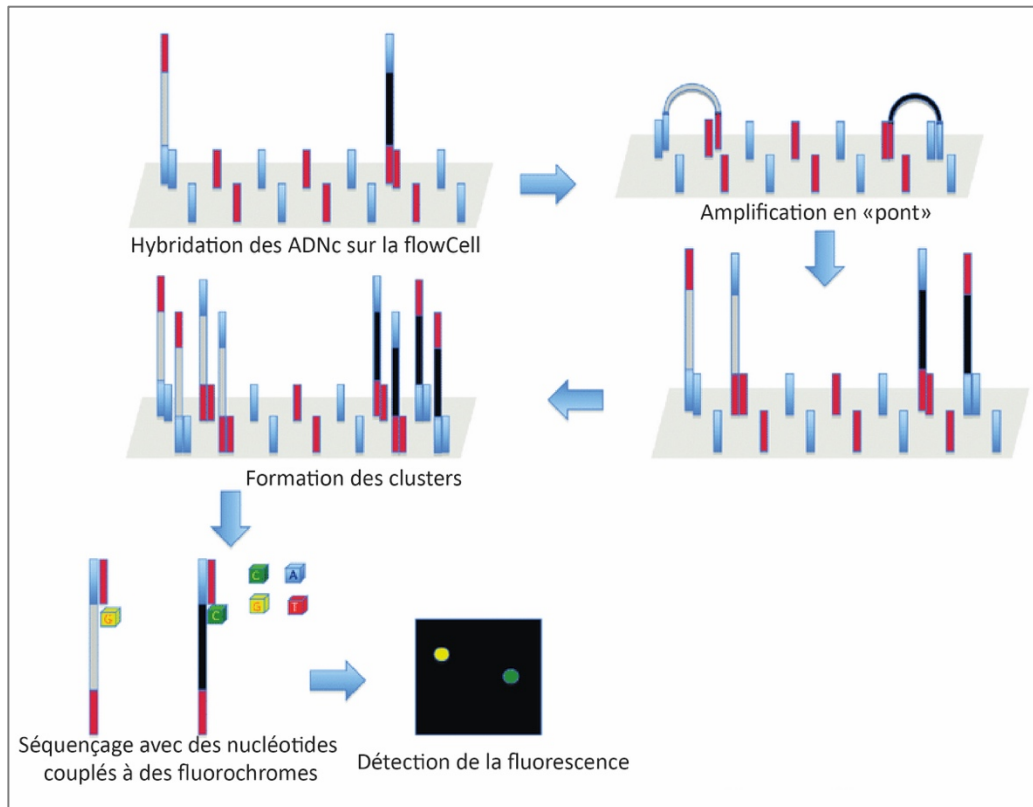


FIGURE 19 : PRINCIPE DU SEQUENCAGE ILLUMINA

La banque d'ADNc est chargée sur la flowCell et les brins vont s'hybrider sur les sondes complémentaires présentes sur la lame. Chaque brin est ensuite amplifié par PCR en « pont » formant ainsi des regroupements (clusters) d'ADNc identiques sur une petite zone de la flowCell. Afin de lire la séquence, des nucléotides marqués sont ajoutés au fur et à mesure de la synthèse du brin et émettent une fluorescence lorsqu'il s'apparie à celui-ci permettant une lecture optique de la fluorescence par cluster. (Schéma repris et adapté de Bonnin, Naas, and Dortet 2017).

Plusieurs paramètres lors du séquençage sont à définir en fonction de la structure des banques. En effet, les séquences d'ADNc peuvent être lues unilatéralement (single-end) ou bilatéralement (paired-end) ce qui est le cas pour ces méthodes de scRNA-seq. En effet, les codes-barres sont lus d'un côté puis le transcrite est lu de l'autre. La taille des séquences d'ADNc est en moyennes de 400 pb. La longueur des lectures (reads en anglais) soit le nombre de bases lues, est en général de 150 bases à chaque extrémité des séquences (2x150 pb). Enfin, le nombre de lectures qui seront obtenues correspond à la profondeur de séquençage. Cette profondeur dépend du type et de l'état cellulaire (une cellule quiescente n'exprime pas le même nombre de gènes qu'une cellule active), le nombre de cellules ainsi que de l'abondance des transcrits recherchés. L'étude de Ziegenhain, et al. suggère que la saturation est atteinte à une profondeur de 1 million de lectures par cellule mais la grande majorité des gènes sont détectés avec 0,5 million de lectures par cellule (Ziegenhain et al. 2017). La société 10X recommande une profondeur de séquençage de 50 000 reads par cellule, ce qui est suffisant pour regrouper les populations d'intérêt lors de l'analyse. En revanche, si l'objectif

est d'identifier le plus de gènes possibles, il est nécessaire alors d'augmenter la profondeur de séquençage.

Selon les méthodes, la sensibilité correspondant aux nombres de gènes différents et d'UMIs détectés par cellules, diffère. Les méthodes basées sur la longueur totale des transcrits (Smart-Seq2/3) sont plus sensibles que celles enrichies en 3' (10X, MARS-seq) (Ding et al. 2020; Hagemann-Jensen et al. 2020; Ziegenhain et al. 2017). A l'inverse, la précision soit la reproductibilité de l'estimation du niveau d'expression est meilleure pour les méthodes basées sur les UMIs puisqu'elles limitent les biais liés à l'amplification. Quoi qu'il en soit, le choix d'une méthode repose sur la ou les questions biologiques notamment le nombre de cellules disponibles, la rareté d'une population recherchée, la recherche de variants ou non mais aussi le coût en temps et financier et les équipements nécessaires (**Table 4**).

TABLE 4 : COMPARATIF DES METHODES DE SCRNA-SEQ SELON LES CARACTERISTIQUES MENTIONNEES

Caractéristiques		10X	MARS-seq	Smart-seq2	Smart-seq3
Nombre de cellules par banque		Environ 10 000	96 ou 384 (possibilité de réaliser plusieurs plaques)	96 ou 384 (possibilité de réaliser plusieurs plaques)	96 ou 384 (possibilité de réaliser plusieurs plaques)
Séquence totale				X	X
UMI		X	X		X
Nombre de cellules disponibles pour l'expérience	Peu		X	X	X
	Beaucoup	X			
Rareté de la population recherchée		X			
Recherche de variants d'épissage				X	X
Coût	En temps	+	++	+++	+++
	Financier	++	+	++	++
Équipements spécifiques		X			

2. Méthodes computationnelles pour l'analyse de données de single-cell RNA-seq

Après séquençage, les données brutes sont stockées dans un fichier texte au format Fastq. Il contient toutes les séquences d'ADNc qu'on appelle lectures (reads) dont chaque base est associée à un score de qualité. Pour lire ce type de fichier, des pipelines bio-informatiques sont utilisés afin d'obtenir une matrice de comptage (pré-traitement) regroupant les cellules (en colonne) et les gènes (en ligne) identifiés et quantifiés pour chacune de ces cellules. Cette matrice est ensuite filtrée (contrôle qualité) puis normalisée avant de pouvoir extraire l'information biologique de ces données (**Figure 20**).

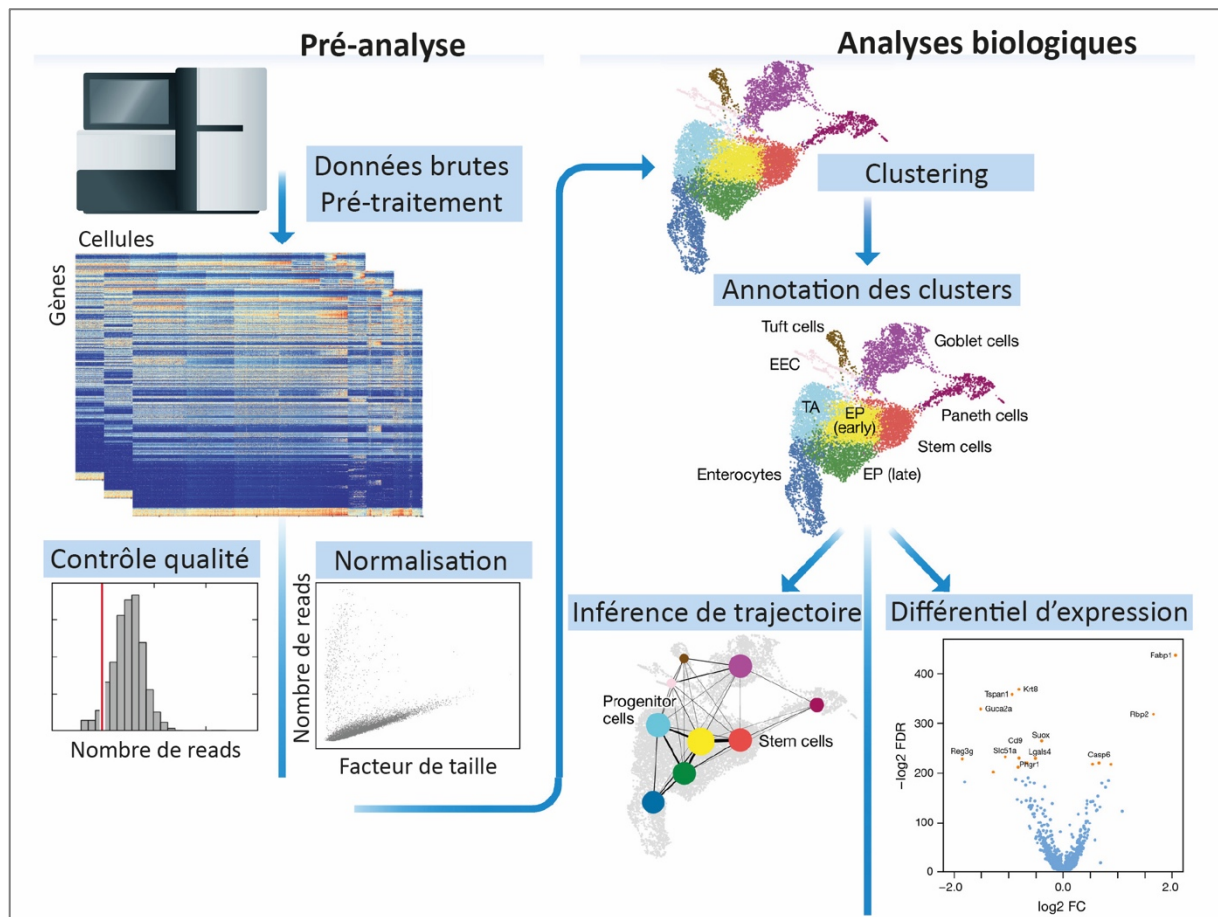


FIGURE 20 : FLUX DE TRAVAIL D'ANALYSE DE DONNÉES DE SINGLE-CELL RNA-SEQ

Les données brutes au format Fastq sont traitées et alignées sur le génome de référence afin d'obtenir une matrice de comptage gènes (en ligne) par cellules (en colonne). Les données sont ensuite filtrées (contrôle qualité) puis normalisées avant de réaliser l'analyse biologique en tant que telle. Les analyses en aval comprennent en outre le clustering et la visualisation en 2 dimensions (2D), l'annotation des clusters, le différentiel d'expression et de l'inférence de trajectoire dans le cadre d'étude de la différenciation cellulaire par exemple. (Schéma repris et adapté de Luecken and Theis 2019).

2.1 Pré-traitement des données

L'obtention de la matrice de comptage issue du pré-traitement des données brutes nécessite la mise en place d'un pipeline bio-informatique. Celui-ci correspond à un groupe de logiciels exécuté en série et informatisé de telle manière que la sortie d'un logiciel sert

d'entrée au suivant. Globalement, les pipelines sont similaires entre les méthodes de single-cell RNA-seq utilisées. Les logiciels peuvent néanmoins différer ainsi que certains paramètres en fonction de la construction des banques (présence ou non d'UMI, localisation des codes-barres cellulaires et UMIs, ...).

La première étape consiste à filtrer les reads de mauvaises de qualité. Les reads sont ensuite alignés sur un génome ou transcriptome de référence grâce à un logiciel nommé mappeur (on parle d'étape de mapping). Cette étape permet d'attribuer chaque read à un gène ou transcrit. Un démultiplexage par code-barre cellulaire est ensuite réalisé afin d'attribuer chaque read à la cellule auquel il appartient. Il est possible que certains reads n'appartiennent à aucune cellule et sont alors éliminés. Enfin, le nombre de reads par gènes est compté et attribué à sa cellule permettant d'obtenir la matrice de comptage. Dans le cas de protocoles avec UMI, les reads sont comptés et les doublons d'UMIs correspondant à une amplification par PCR sont éliminés permettant une quantification plus juste du nombre de molécules d'ARN. Les analyses se poursuivent la plupart du temps via Rstudio, un environnement de développement basé sur un langage de programmation R.

2.2 Contrôle qualité

Le contrôle qualité est une étape primordiale pour obtenir des résultats de qualité. Il s'effectue à 2 niveaux : au niveau des cellules et au niveau des gènes. Le filtrage des cellules est crucial pour s'assurer notamment qu'elles soient bien initialement viables. De plus, une mauvaise qualité peut s'expliquer par une lyse non optimale, une transcription inverse qui aurait mal fonctionné ou une faible efficacité de capture. Ainsi, plusieurs paramètres peuvent être évalués dont le nombre de reads par cellules et le pourcentage de reads alignés sur le génome. Toutefois, les 3 paramètres les plus employés sont :

- le nombre d'UMIs par cellule
- le nombre de gènes exprimés par cellule
- le pourcentage de gènes mitochondriaux par cellule

Ainsi, une cellule avec un faible nombre d'UMI et de gènes exprimés et un fort pourcentage de gènes mitochondriaux peut correspondre à une cellule mourante (Luecken and Theis 2019). Toutefois, ces paramètres dépendent du type cellulaire puisque des cellules quiescentes peuvent présenter un faible nombre d'UMI et de gènes exprimés. De plus, le seuil du pourcentage de gènes mitochondriaux est classiquement fixé entre 5 et 10% mais là encore, cela dépend du type cellulaire. Par exemple, les cardiomyocytes peuvent exprimer jusqu'à 30% de gènes mitochondriaux (Mercer et al. 2011). Il est ainsi nécessaire de fixer les seuils de filtrage des cellules avec précaution et de le faire par type cellulaire dans la mesure du possible.

Un autre contrôle qualité pouvant être utilisé sont les ARN synthétiques (ou ERCC - External RNA Control Consortium). Il s'agit d'ARN, ajoutés avant la rétrotranscription, disposant d'une queue polyA pouvant être capturés de la même manière que les ARNm et servant de contrôle d'efficacité de capture bien qu'une étude a démontré que les ARNm endogènes sont mieux

capturés (Svensson et al. 2017). La méthode consiste à mesurer la corrélation entre la concentration attendue d'ERCC et l'expression retrouvée dans les données. La corrélation doit être supérieure ou égale à 60% (Svensson et al. 2017). De plus, une forte proportion d'ERCC est le témoin de cellules présentant une perte d'ARNm endogènes, il est donc intéressant de les éliminer.

Pour terminer, un filtrage des gènes exprimés dans seulement quelques cellules est utile afin d'éliminer ceux non informatif de l'hétérogénéité cellulaire.

2.3 Normalisation des données

Comme évoqué précédemment, les comptages d'une matrice représentent la capture des ARNm, l'efficacité de la transcription inverse ainsi que la qualité du séquençage. Ainsi, pour des cellules identiques, la profondeur des comptages (nombre d'UMI par cellule) peut être différent du fait de la variabilité à chacune des étapes du protocole. La normalisation permet alors de pallier ce problème en éliminant les biais techniques et faire en sorte que les données soient comparables entre les cellules tout en préservant la variabilité biologique.

Il existe plusieurs méthodes de normalisation dont le choix va dépendre du protocole de scRNA-seq (Cole et al. 2017). L'une des méthodes les plus utilisée est l'algorithme *sctransform* implémenté dans le package Seurat (Hafemeister and Satija 2019). Cette méthode modélise le nombre d'UMI (à l'aide d'un modèle binomial négatif régularisé) afin de supprimer la variation due à la profondeur de séquençage (nombre totaux d'UMIs par cellule) et ajuste la variance entre les gènes regroupés par abondances similaires. Les comptages sont ensuite log-transformés permettant de réduire l'asymétrie entre l'expression des gènes dont certains sont peu exprimés et, à l'inverse, d'autres le sont fortement.

Il existe également des effets techniques que l'on nomme effet de lot tel que l'effet plaque. En effet, les méthodes de scRNA-seq basé sur un tri des cellules en plaque génèrent en général un effet plaque plus ou moins important et doit être corrigé pour permettre une visualisation et un clustering optimum des données (Luecken and Theis 2019). De plus, des effets de lot peuvent survenir lorsque les données viennent de plusieurs expériences. Pour cela, un des algorithmes pouvant être utilisé, est intégré dans le package Seurat et est basé sur une corrélation entre gènes qui sont partagés dans les jeux de données (Butler et al. 2018).

2.4 Visualisation des données et clustering

Une fois les données filtrées et normalisées, il est courant de sélectionner les gènes informatifs de la variabilité. Pour cela, les gènes hypervariables (HVG – highly variable genes), c'est-à-dire ceux qui sont fortement exprimés dans certaines cellules et, à l'inverse, faiblement exprimés dans d'autres, sont sélectionnés. Une méthode de sélection est implémentée dans Seurat et est basée sur le regroupement des gènes par leur expression moyenne et les gènes avec le rapport variance-moyenne le plus élevé sont sélectionnés comme HVG (Stuart et al.

2019). En règle générale, 1000 à 3000 gènes hypervariables sont conservés pour la suite des analyses.

Classiquement, les données sont ensuite visualisées en 2 dimensions (2D) pour avoir un aperçu de leur structure. Par définition, les données de scRNA-seq sont multidimensionnelles. En effet, une cellule aura autant de dimensions qu'elle n'exprime de gènes. L'Humain n'est donc pas en capacité de conceptualiser ce genre d'image. Pour cela, des outils de réduction de dimensions ont été développés.

Dans un premier temps, il est coutume de réaliser une analyse en composante principale (ACP). L'ACP est une technique de réduction de dimensionnalité linéaire qui cherche les axes ou composantes principales expliquant la plus grande quantité de variance dans les données. Ces composantes principales sont ordonnées selon leur proportion de la variance totale qu'elles expliquent. En général, les analyses se limitent aux 3 premières composantes principales. Elle peut ainsi permettre d'identifier les sources restantes de biais techniques (effet de lot par exemple) qui aurait dû être éliminé lors du contrôle qualité ou de la normalisation.

Ensuite, il est d'usage d'utiliser des méthodes de réduction de dimension non linéaires telles que tSNE ou encore UMAP (McInnes, Healy, and Melville 2020; Van der Maaten and Hinton 2008). L'approche tSNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) permet de garder les instances similaires (les cellules) proches les unes des autres dans l'espace alors que les objets différents sont éloignés par des distances non préservées. Il permet ainsi de préserver les similitudes locales entre les cellules. De même que la méthode tSNE, la visualisation UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) vise à préserver les distances locales entre les cellules lorsqu'elle les intègre dans un espace à faibles dimensions. En revanche, à l'inverse de tSNE, UMAP préserve mieux les distances globales entre les cellules ce qui en fait une bonne méthode pour la visualisation des clusters résultant des méthodes de clustering.

Le clustering est une méthode permettant de découvrir des groupes (clusters) dans les données en regroupant les cellules sur la base de la similarité de leurs profils d'expression génique. Là encore, plusieurs algorithmes existent dont l'un des plus utilisés pour les données de scRNA-seq est la détection de communauté implémenté dans Seurat. Cet algorithme construit un graphe des plus proches voisins (k nearest neighbours – KNN) où les cellules sont représentées sous forme de nœuds. Chaque cellule est connectée à son k plus proche voisin (c'est-à-dire une cellule similaire), qui sont obtenues à l'aide des distances euclidiennes dans l'espace d'ACP. Puis, l'algorithme de détection de communauté partitionne ce graphe en régions densément connectées ou communautés hautement interconnectées ce qui définit les clusters de cellules. Le résultat du clustering est souvent projeté sur une visualisation 2D par UMAP.

2.5 Analyse de l'information biologiques des données

2.5.1 *Différentiel d'expression*

L'analyse de différentiel d'expression (DE) permet d'identifier des gènes dont l'expression varie quantitativement entre différents groupes de cellules ou clusters. Cette analyse peut ainsi permettre de caractériser de nouvelles populations ou états cellulaires ou trouver les gènes marqueurs dans le but d'annoter les clusters. Il existe un grand nombre d'algorithmes dont certains ont été initialement développés pour les analyses en population (bulk RNA-seq) puis de nouveaux ont été développés spécifiquement pour les analyses de scRNA-seq. Ces dernières méthodes prennent en compte les artéfacts de bruits techniques ou biologiques tels que la forte proportion de gènes ayant un niveau d'expression à 0 (drop-out ou zéro technique, et zéro biologique lié à l'aspect bursty de l'expression génique) ainsi que la forte variabilité cellule-cellule (Hicks et al. 2018). Pourtant, une étude comparant 36 approches de DE a montré que les méthodes de DE populationnelles fonctionnent aussi bien que celles développées pour le scRNA-seq (Soneson and Robinson 2018). Plus récemment, une autre étude démontre qu'effectivement, les méthodes de DE population fonctionnent de manière similaire à celle développée pour les données en cellules uniques mais uniquement pour les gènes fortement exprimés (Mou et al. 2020). En revanche, pour les gènes faiblement exprimés, la performance des outils en population varie considérablement. De manière générale, les analyses de DE sont basées sur des tests statistiques comparant la distribution des gènes entre de deux groupes de cellules. La distribution n'étant pas connue, il est préférable d'utiliser des tests non paramétriques (test de somme des rangs de Wilcoxon par exemple). Les données étant constituées de milliers de gènes, le nombre de faux positifs peut être important nécessitant alors une correction pour tests multiples (correction de Bonferroni par exemple).

2.5.2 *Inférence de trajectoire et réseaux de gènes*

Les processus biologiques à l'origine de l'hétérogénéité cellulaire sont des processus continus. Les systèmes statiques tel que le clustering ne suffisent pas à décrire cette diversité cellulaire. Ainsi, afin de capturer les transitions entre les cellules, il est possible d'utiliser des méthodes connues sous le nom d'inférence de trajectoires. Globalement, les algorithmes d'inférence de trajectoires reconstruisent une trajectoire à travers l'espace cellulaire en minimisant les changements transcriptionnels entre les cellules voisines. Plusieurs méthodes existent et diffèrent par la complexité des trajectoires modélisées. Certains algorithmes se limitent à des topologies linéaires alors que d'autres peuvent inférer des trajectoires linéaires et branchées ou davantage plus complexe tels que des arbres ou des chemins multi-branchés. Une récente étude comparant 70 outils d'inférence de trajectoires a mis en évidence qu'aucune des méthodes était optimale, le choix de celle-ci dépendant plutôt de la dimension des données et de la complexité de la trajectoire attendue (Saelens et al. 2019). Toutefois, la comparaison a montré que Slingshot surpassait les autres modèles pour des trajectoires linéaires, bi- ou multi-branchées (Street et al. 2018).

Les trajectoires obtenues sont en général statiques, c'est-à-dire qu'elles n'indiquent pas la directionnalité que suivent les cellules au cours d'un processus de différenciation. Des

méthodes d'analyses de vélocités des ARN tel que scVelo ont été développées (Bergen et al. 2020). La vélocité des ARN permet de prédire l'état futur d'une cellule en appliquant un modèle capable d'estimer les taux de réactions de transcription, d'épissage et de dégradation par distinction des ARN épissés et non épissés (La Manno et al. 2018). Ainsi, ces méthodes permettent d'étudier la dynamique de différenciation cellulaire et peuvent être superposées sur la trajectoire pour ajouter de la directionnalité.

La trajectoire peut également être analysée au niveau des gènes. En effet, il est intéressant de trouver les gènes dont l'expression change le long de la trajectoire afin d'identifier le processus biologique sous-jacent (par exemple les gènes impliqués dans les processus de différenciation). La détermination de ces groupes de gènes peut permettre d'identifier de nouveaux acteurs impliqués dans le processus étudié.

Les gènes ne fonctionnent pas indépendamment, au contraire la régulation d'un gène passe par la régulation d'interactions avec d'autres gènes. Ces interactions régulatrices contrôlant un processus cellulaire spécifique peuvent être mises en évidence par les réseaux de régulation de gènes (GRN). Plusieurs approches d'inférence de GRN à partir de données temporelles transcriptionnelles ont été développées. Ainsi, les réseaux inférés peuvent être statiques par mesure de corrélation (coexpression génique) ou encore dynamiques tels que les modèles d'équations différentielles, les réseaux booléens ou encore sur des modèles mécanistes particuliers où les gènes sont décrits par des modèles à deux-états en interaction (Fiers et al. 2018; Ventre et al. 2022). Les méthodes d'inférence de GRN peuvent ainsi offrir des informations précieuses pour identifier les régulateurs des processus de différenciation cellulaire.

Objectifs du projet de recherche

Les lymphocytes T CD8 sont des acteurs cruciaux des réponses immunitaires adaptatives. Leur hétérogénéité et leur plasticité sont des éléments clés pour une protection efficace et durable à l'hôte. Ainsi, de nombreuses études ont mis en avant la diversité phénotypique et fonctionnelle des LT CD8 au cours d'une infection aiguë (Böttcher et al. 2015 ; Hikono et al. 2007 ; Johnnidis et al. 2021 ; Joshi et al. 2007 ; Milner et al. 2020 ; Plumlee et al. 2015 ; Renkema et al. 2020 ; Sallusto et al. 1999 ; Sarkar et al. 2008). Les acteurs moléculaires tels que les facteurs de transcription ou de reprogrammation épigénétique impliqués dans le développement de différents types de cellules effectrices/ mémoires, ont aussi été beaucoup étudiés (Gray et al. 2017; Kaech and Cui 2012; Omilusik et al. 2015; Pace et al. 2018; Yang et al. 2011; Zhou et al. 2010).

Les liens existants entre les différentes populations décrites et notamment le stade auquel les LT CD8 activés s'engagent dans le destin effecteur et mémoire a été largement étudié. Notamment, la communauté cherche à savoir à quel moment de la réponse immunitaire les cellules s'engagent dans la lignée de la mémoire et divergent du destin effecteur. De nombreuses approches expérimentales différentes ont ainsi conduit à l'établissement de modèles alternatifs (Arsenio et al. 2014; Buchholz et al. 2013; Chang et al. 2007; Crauste et al. 2017; Kaech and Cui 2012; Kakaradov et al. 2017; Pace et al. 2018). Bien qu'un engagement précoce des cellules activées vers la différenciation en mémoire soit relativement admis, l'existence d'un branchement vers la mémoire reste débattue (Flossdorf et al., 2015).

La question de la qualité fonctionnelle des cellules mémoires générées est également importante afin de protéger efficacement l'hôte. La qualité regroupe la capacité de migration au site de l'infection et la force et la rapidité d'expression des fonctions effectrices. Plusieurs études ont mis en évidence sur la base d'expériences de phénotypage une diversité de la qualité de LT mémoires générées (Böttcher et al., 2015 ; Hikono et al., 2007 ; Olson et al., 2013). De plus, le contexte d'immunisation influence les voies que suivent les LT jusqu'à la mémoire. En effet, la persistance d'un antigène dans le contexte d'une infection chronique ou du cancer, entraîne les LT CD8 activés dans une voie de différenciation parallèle à la voie de l'infection aiguë et mène à un dysfonctionnement des cellules mémoires (Beltra et al. 2020; Chen et al. 2019; Hudson et al. 2019; Im et al. 2016).

Ainsi, au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressée à la génération des LT CD8 mémoires et à leur qualité fonctionnelle par des approches en cellule unique. Mes travaux de recherche s'articulent donc autour de 2 axes principaux :

- (1) L'étude du stade auquel les LT CD8 activés s'engagent dans le destin mémoire et divergent des effecteurs
- (2) L'impact d'une stimulation transitoire par une tumeur en comparaison d'une infection virale aiguë sur la qualité fonctionnelle des LT CD8 mémoires

Pour ce premier axe, nous avons réanalysé, en collaboration avec Héléna Todorov, une étudiante en thèse, par bio-informatique un jeu de données de scRNA-seq existants comportant des lymphocytes T CD8 collectés pendant la phase d'expansion d'une infection virale aiguë. Nous avons utilisé des approches qualitatives et quantitatives et des techniques de machine learning pour identifier les précurseurs de la mémoire au cours d'une primo-infection afin de concevoir un modèle expliquant la dynamique de génération des cellules mémoires. Les résultats obtenus *in silico* ont été ensuite validés *in vivo*.

Étant capable d'identifier ces précurseurs de la mémoire, la génération de celles-ci à des étapes précoces post-activation a été étudié. J'ai collaboré avec Shaoying Wang, une étudiante en thèse, pour étudier par scRNA-seq l'impact de l'IL-2 exogène sur la génération des précurseurs de cellules mémoire *in vitro*.

Pour le second axe de mes recherches, nous avons réalisé du scRNA-seq et analysé les signatures transcriptomiques par bio-informatique de populations de mémoires générées chez la souris en réponse à une infection virale aiguë ou après un challenge tumoral transitoire. Les résultats ont ensuite été validés par cytométrie en flux ce qui a permis de caractériser davantage une protéine pouvant expliquer des différences de qualité fonctionnelle entre les LT CD8 mémoires générés dans ces 2 contextes d'immunisation.

Résultats

I. ÉTUDE DU STADE AUQUEL LES LT CD8 ACTIVÉS S'ENGAGENT DANS LE DESTIN MÉMOIRE ET DIVERGENT DES EFFECTEURS PAR DES APPROCHES EN CELLULE UNIQUE

1. Article 1 – Génération des précurseurs de la mémoire T CD8 après infection virale et persistance *in vivo*

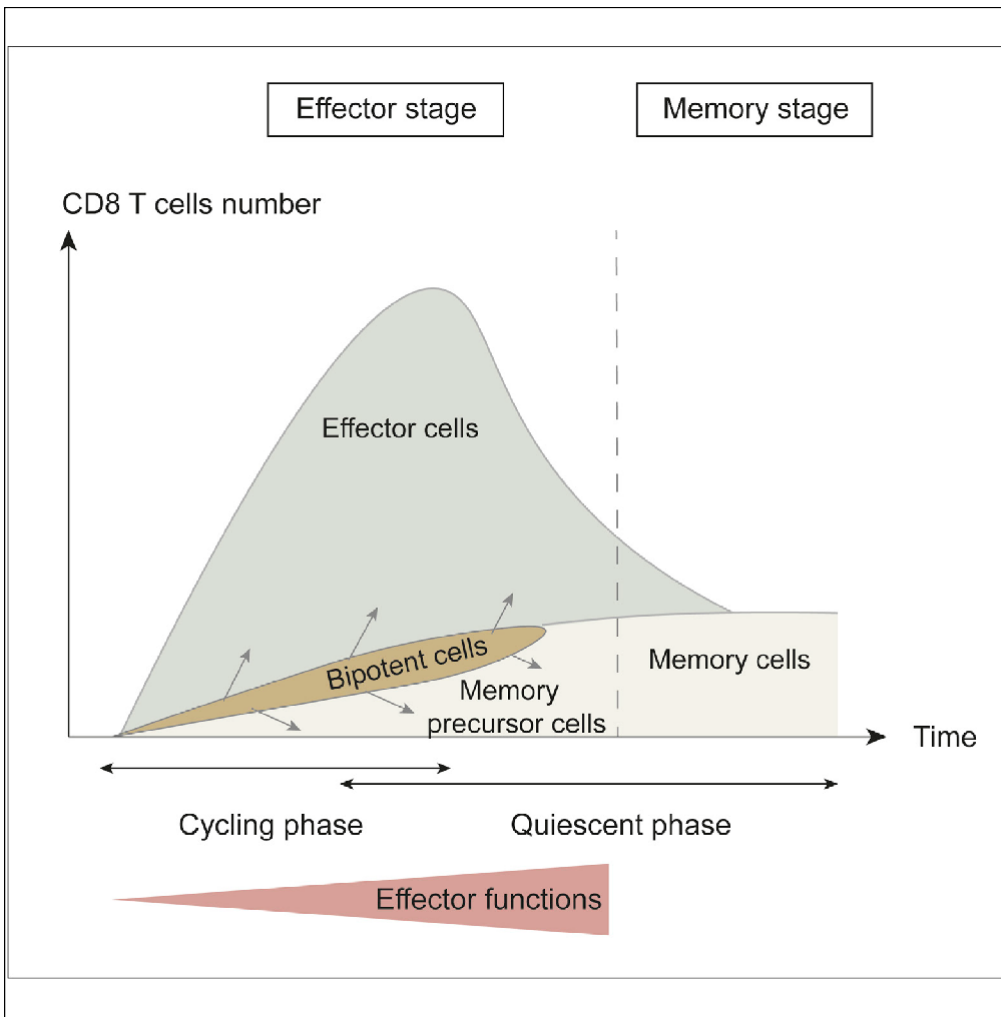
Ce premier travail de recherche a été réalisé en collaboration avec Hélène Todorov, une doctorante en bio-informatique en cotutelle dans l'équipe. Comme évoqué précédemment, il existe de nombreux modèles de différenciation des LT CD8. La communauté scientifique s'accorde à dire qu'il existe un engagement précoce de la mémoire. Toutefois l'existence d'un branchement vers la mémoire reste débattue.

Nous avons dans ce travail, reconstruit la trajectoire suivie par les LT CD8 naïfs pour se différencier en cellules mémoires. Pour cela, nous avons réanalysé un jeu de données de single-cell RNA-seq comprenant des LT CD8 effecteurs à 4 et 7 jours après une infection aiguë par LCMV-A. Nous avons appliqué de nouveaux outils d'analyses bio-informatiques afin de mieux caractériser la dynamique d'apparition des précurseurs de cellules mémoires au cours d'une primo-infection virale.

Les outils d'inférence de trajectoires et de vélocité d'ARN nous ont permis de mettre en évidence une trajectoire définie par les gènes codant pour les protéines régulatrices du cycle cellulaire et celles associées aux fonctions effectrices des LT CD8. L'analyse des GRN ainsi que l'analyse d'enrichissement a permis d'identifier les précurseurs de la mémoire (MP) à plusieurs points le long de la trajectoire. Notre approche quantitative a montré que le nombre de MP augmentaient avec le temps et acquéraient les gènes des fonctions effectrices. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* via un marquage au BrdU. Ainsi, les MP sont générées en continu pendant la primo-infection et participent à la génération du pool de mémoire bien que la majorité des LT mémoires soient dérivées de cellules ayant proliféré et acquis des fonctions effectrices.

Article

CD8 memory precursor cell generation is a continuous process



Helena Todorov,
Margaux Prioux,
Daphne
Laubreton, ...,
Fabien Crauste,
Yvan Saeys,
Jacqueline Marvel

Jacqueline.marvel
@inserm.fr

Highlights

Trajectory inference tools reconstruct the timing of memory precursors generation

The trajectory is defined by both cell cycle and effector functions encoding genes

Memory precursors numbers in lymphoid organs increase with time after priming

In vivo BrdU labeling validate the *in-silico* data

Article

CD8 memory precursor cell generation is a continuous process

Helena Todorov,^{1,2,10} Margaux Prioux,^{3,4,10} Daphne Laubretton,³ Matteo Bouvier,^{4,5} Shaoying Wang,³ Simon de Bernard,⁶ Christophe Arpin,³ Robrecht Cannoodt,^{1,2,7} Wouter Saelens,^{1,2} Arnaud Bonnaffoux,⁵ Olivier Gandrillon,^{4,8} Fabien Crauste,⁹ Yvan Saeys,^{1,2} and Jacqueline Marvel^{3,11,*}

SUMMARY

In this work, we studied the generation of memory precursor cells following an acute infection by analyzing single-cell RNA-seq data that contained CD8 T cells collected during the post infection expansion phase. We used different tools to reconstruct the developmental trajectory that CD8 T cells followed after activation. Cells that exhibited a memory precursor signature were identified and positioned on this trajectory. We found that these memory precursors are generated continuously with increasing numbers arising over time. Similarly, expression of genes associated with effector functions was also found to be raised in memory precursors at later time points. The ability of cells to enter quiescence and differentiate into memory cells was confirmed by BrdU pulse-chase experiment *in vivo*. Analysis of cell counts indicates that the vast majority of memory cells are generated at later time points from cells that have extensively divided.

¹Department of Applied Mathematics, Computer Science and Statistics, Ghent University, Ghent, Belgium

²Data Mining and Modeling for Biomedicine, VIB Center for Inflammation Research, Ghent, Belgium

³Centre International de recherche en Infectiologie, Université de Lyon, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

⁴Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la cellule, Université de Lyon, ENS de Lyon, CNRS UMR 5239,

INSERM U1210, Lyon, France ⁵Vidium, Lyon, France ⁶AltraBio, Lyon, France

⁷Data Intuitive, Lebbeke, Belgium

⁸Inria, Villeurbanne, France

⁹Laboratoire MAP5 (UMR CNRS 8145), Université de Paris, Paris, France

¹⁰These authors contributed equally

¹¹Lead contact

*Correspondence: jacqueline.marvel@inserm.fr

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104927>

INTRODUCTION

In mice, the number of naive CD8 T cells that are specific for a given epitope is relatively low, ranging from 100 to 1,000 cells (Obar et al. 2008; Haluszczak et al. 2009). Upon infection, these pathogen-specific CD8 T cells will be recruited and activated. This, under appropriate conditions, leads to their extensive proliferation and differentiation in a large (10^6 – 10^7 cells) population of effector CD8 T cells that display the capacity to eliminate infected cells. The majority of effector cells will die by apoptosis, except for a smaller subset of memory precursor (MP) cells that will further differentiate to give rise to a long-lived population of memory cells (10^5 – 10^6 cells) that will provide protection upon subsequent infection (Murali-Krishna et al. 1998; Crauste et al. 2017; Johnnidis et al. 2021, Pais Ferreira et al. 2020). Although these cells are mainly quiescent, they retain the capacity, upon re-exposure to pathogens, to expand and rapidly display effector functions due to epigenetic modifications of genes involved in these processes (Fitzpatrick et al. 1999; Marçais et al. 2006).

In order to better understand the properties of memory cells generated in different settings (Appay et al. 2002), many studies have focused on defining CD8 T cell subsets, relying on a restricted number of surface proteins (Sallusto et al. 1999; Hikono et al. 2007; Jameson and Masopust, 2009). These cell subsets include central and effector memory cells, exhausted memory cells, or tissue resident memory cells. Over the years, the study of these subsets has brought a wealth of knowledge on the responsiveness (Bouneaud et al. 2005; Wherry et al. 2007; Hikono et al. 2007; Sallusto et al. 1999), homing (Masopust et al. 2001), and self-renewal capacities (Graef et al. 2014; Gattinoni et al. 2012) of memory cells. The molecular pathways sustaining their development have also been largely uncovered. Indeed, the involvement of numerous transcription factors (Intlekofer et al. 2005; Omilusik et al. 2015; Mann and Kaech, 2019; Kaech and Cui, 2012) and epigenetic reprogramming factors (Pace et al. 2018) in the differentiation of different classes of effector and/or memory cells has been described.

The lineage relationship between the different subsets of CD8 T cells (Bouneaud et al. 2005; Wherry et al. 2003) and the stage at which activated CD8 T cells diverge from the effector fate to commit to the memory lineage has been extensively studied, with many different experimental approaches leading to results supporting alternative models (Kaech and Cui, 2012). A linear pathway, where memory cells are derived from effector cells, is supported by early studies using genetic marking of memory cells (Jacob and Baltimore, 1999). A linear model, where activated naive cells first differentiate into MP cells that give rise to effector cells, has been suggested following *in vivo* fate mapping of single cells (Buchholz et al. 2013). These early MP cells could correspond to the memory stem cells described in a restricted number of experimental systems (Gattinoni et al. 2012). Fate mapping experiments have highlighted the heterogeneity of effector

cells in terms of their functional capacities and their differentiation potential into memory cells (Joshi et al. 2007; Wherry et al. 2007; Sarkar et al. 2008; Kalia et al. 2010). Hence, a new classification of effector cells based on the expression of KLRG1 and CD127 has emerged with, on one side, short-lived effector cells doomed to die at the end of the primary response and, on the other side, MP effector cells that maintain the capacity to differentiate into memory cells (Joshi et al. 2007). In this model and in the first linear models, memory cells are derived from cells that express fully developed effector functions and that have maintained the potential to differentiate into memory cells (Pace et al. 2018; Youngblood et al. 2017). In contrast, a number of other studies have suggested a separation of MP cells at an earlier stage that precedes the differentiation into effector cells. Indeed, branching as early as following the first division has been proposed based on single-cell transcriptome analysis (Arsenio et al. 2014; Kakaradov et al. 2017) and would potentially result from an asymmetric division of antigen-triggered cells (Chang et al. 2007). Although these models agree on the early commitment of activated naive CD8 T cells to the memory lineage, there remains some debate about the existence of an early branching (Flossdorf et al. 2015; Kretschmer et al. 2020; Kinjyo et al. 2015).

More recently, Crauste et al., (2017), based on the modeling of the generation of memory CD8 T cell counts, demonstrated that the total pool of memory CD8 T cells could mainly be generated by a linear pathway; the majority of quiescent memory cells are generated following the transition of naive cells through an early activation effector stage characterized by active cell cycling followed by a late quiescent effector stage (Crauste et al. 2017). In this model, an early branching of memory cells was permitted, but it could not account for the generation of the full supply of memory cells.

Overall, functional studies of memory differentiation routes by genetic ablation or cell fate mapping studies have led to the description of multiple possible pathways that lead to a diversity of effector/memory populations. They suggest that memory commitment could take place at several stages of the primary immune response. However, some of these pathways might represent routes followed by only a few cells that generate a minor fraction of the memory cell pool.

In order to uncover the different trajectories followed by naive CD8 T cells to differentiate into memory cells, we have used new trajectory analysis tools that take into account the large amount of information that is delivered by single-cell transcriptomics. Indeed, over the last decades, single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) has emerged as a powerful tool and allowed a great advance in the exploration of the heterogeneity of the immune system (Papalexi and Satija, 2018). We analyzed gene expression dynamics in CD8 T cells collected during the effector response to an acute infection with the lymphocytic choriomeningitis Armstrong virus (LCMV-Arm), generated by (Yao et al. 2019) and (Kurd et al. 2020). We applied trajectory inference on these datasets to identify trajectories

leading to the generation of MP cells. Using cell-cycle classification and RNA velocity algorithms, we show that the differentiation is driven by cell-cycle and immune function genes. To identify the molecular regulatory mechanisms supporting the process, we then performed a gene regulatory network (GRN) inference analysis, which allowed us to identify a cluster enriched in cells harboring transcription factors associated with MP cells. Using an MP gene signature, we confirmed that this cluster was enriched in MP cells, although cells expressing that signature were also found at multiple points along the trajectory. Finally, we used another pathogen infection and BrdU labeling to generalize and validate these results *in vivo*. Analysis of cell counts confirmed that memory cells are generated continuously all along the trajectory. However, due to cellular expansion, the majority of memory cells were derived from cells that had proliferated and acquired effector functions.

RESULTS

Trajectory inference of the CD8 T cell response to an acute infection

In order to gain insight into the differentiation dynamics of CD8 T cells in response to an acute infection (LCMV-Arm), we performed trajectory inference on a scRNAseq dataset generated by [Yao et al., \(2019\)](#) using two recently published methods, Slingshot ([Street et al. 2018](#)) and TinGa ([Todorov et al. 2020](#)). This dataset consists of measurements on 20,295 splenic CD8 T cells generated following LCMV-Arm acute infection and isolated at two different time points (4.5 and 7 days post infection [dpi]), in two separate replicates. We identified the 2,000 most highly variable genes in the dataset using variance modeling statistics from the Scran R package ([Lun et al. 2016](#)), on which we applied both trajectory inference methods. Slingshot was shown to be very efficient in a study that compared more than 40 methods on a large number of datasets ([Saelens et al. 2019](#)). TinGa is a new method for trajectory inference that showed comparable results on simple trajectories and better results on complex trajectories than Slingshot ([Todorov et al. 2020](#)). These two methods both share a first step in which the dimensions of the data are reduced, either by principal component analysis for Slingshot or by multidimensional scaling (MDS) for TinGa. In the two resulting representations of the data, the cells form a continuum from cells taken 4.5 dpi to cells taken 7 dpi ([Figures 1A and S1A](#)).

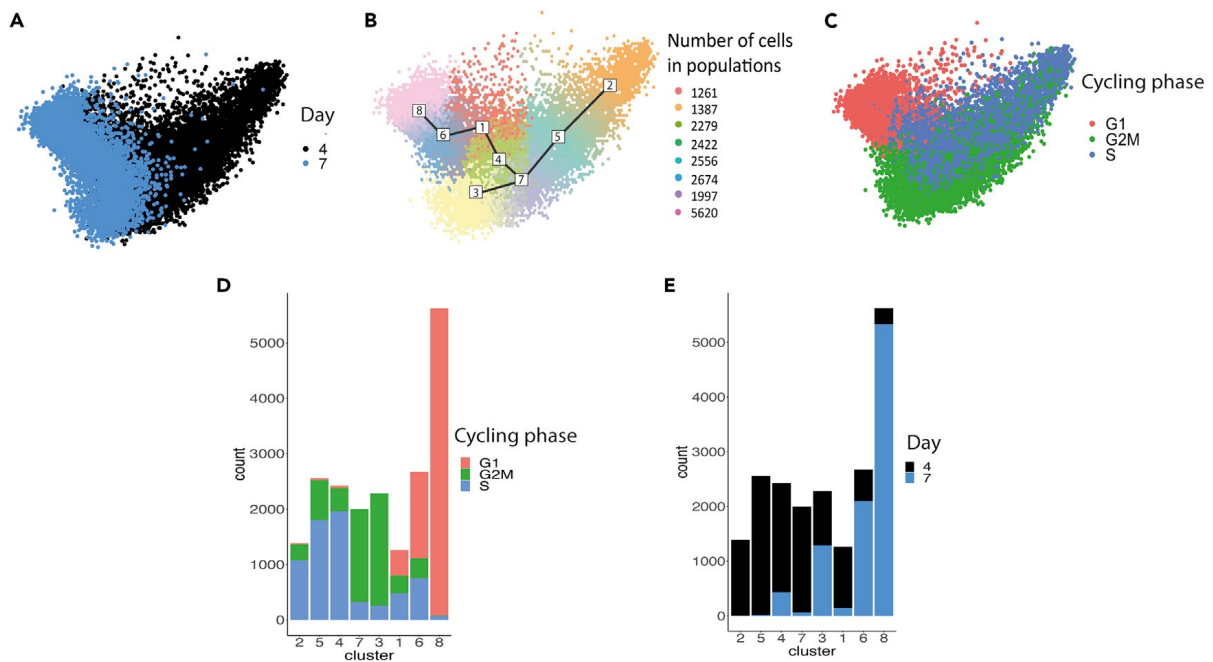


Figure 1. TinGa trajectory inference

(A–C) Visualization of the cells in a 2D space computed by multidimensional scaling. (A) The cells were colored according to the two experimental time points 4.5 and 7 days post-LCMV-Armstrong infection. (B) The TinGa algorithm identifies a branching trajectory in the data, that is represented by a black line. Milestones along the trajectory can be used to define subgroups of cells that are represented by different colors. They will be referred to as “clusters.” The number of cells in each cluster is indicated. (C) The cells were classified into one of the cycling phases (either G1, S, or G2/M) using the Seurat package and colored accordingly. (D and E) The number of cells in the G1, S, and G2/M phases (D) and in the two experimental time points (E) are shown for each cluster. See also [Figures S1](#) and [S2](#).

Slingshot first applies clustering to the data and then identifies transitions between these clusters. It identified a linear trajectory starting among cells from day 4.5 post infection (pi), transitioning through a mix of cells from day 4.5–7 pi, and ending in a part of the data that was enriched in cells from day 7 pi ([Figure S1B](#)). The genes that varied the most along this trajectory are identified in [Figure S1C](#). The linear Slingshot trajectory started in early activated cells, in which we identified an overexpression of *Ybx1*, *Rps2*, and *Rps8* genes involved in the initiation of transcription. The trajectory then transitioned through a state where the cells seemed to be undergoing divisions (*Tubb4b*, *Tuba1b*, *Ccna2*, *Cks1B* genes) and ended in cells that expressed genes associated with immune functions (such as *Ccl5*, *Hcst*, *B2m*, *H2-D1*). In comparison, the trajectory identified by TinGa started similarly to the Slingshot trajectory, but then split into two branches ([Figure 1B](#)). One small branch (identified by the number 3) corresponded to cells that were in a highly cycling state, whereas the other longer branch ended, after several transitional states, in the effector state described in the Slingshot trajectory ([Figure S2A](#)). Eight transitional states were identified along the TinGa trajectory. For convenience, these eight transitional populations will be referred to as

clusters from now on.

Among the 40 genes that varied the most along the two trajectories defined by Slingshot and TinGa (Figures S1C and S2A), 33 were commonly found in both trajectories. This suggests that, even though TinGa identified an extra small branch that Slingshot included in a linear trajectory, the genes that are mainly driving cells along the two trajectories are similar. Interestingly, when we applied Slingshot and TinGa to a reduced set of 1,300 highly variable genes, both methods recovered a branching trajectory (Figures S1D and S2B). This indicates that the main trajectory uncovered is robust and that the small branch identified differs only marginally from the neighboring cluster.

The inferred trajectories retrace an early-late-memory differentiation pathway

To further characterize the CD8 differentiation trajectory supported by the single cell transcriptomics data, we used the trajectory obtained with TinGa, as it identified more transition points along the route and hence might give a more refined definition of differentiation steps. As both the Slingshot and the TinGa trajectories were clearly driven by cell-cycle-associated genes (Figures S1C and S2A), we used a classifier from the Seurat R package (Tirosh et al. 2016) to allocate cells to the G1, S, or G2/M cell-cycle phases (Figure 1C). We identified clear cycling trends along the trajectory. Cells in clusters 2, 5, and 4 were mainly classified in the S phase (Figures 1C and 1D), whereas clusters 7 and 3 were *de facto* classified in the G2/M phase (Figures 1C and 1D). Cluster 6 was clearly enriched in G1 cells, whereas cluster 8 contained almost exclusively cells in G1 (Figures 1C and 1D). Hence, these results showed that the TinGa trajectory consisted of a first cycling effector population that differentiated in a quiescent effector population. Interestingly, TinGa identified three clusters enriched in cells positioned in the S phase (cluster 2, 5, and 4) and two clusters enriched in cells positioned in the G2/M phase (cluster 7 and 3). These clusters, however, differed in terms of sampling days, and the two clusters (3 and 4) positioned at a later pseudotime by TinGa contained a larger fraction of cells sampled on day 7 compared with the earlier clusters with a similar cell-cycle position. To identify the genes that were driving the trajectory of cells along these different clusters, we decided to perform differential expression analyses. The cell cycle is directly related to the differentiation of CD8 T cells in response to infection; however, it influences the expression of so many genes that comparing cells that are in different cell-cycle states would only show us differences between genes related to the cell cycle. In order to unravel the genes that were driving the trajectory aside from the cell cycle in more detail, we thus decided to perform differential expression analyses between cells from the same cycle phase present in each neighboring cluster along the trajectory (Table S1 and Figure S3A). This highlighted the slow

transition from early activation markers (Xcl1, Srm) to effector functions (Ccl5, Id2, Gzma/b) and quiescence (Btg1) (Figure S3A right panel).

To further define the dynamics of cell differentiation, we applied the scVelo algorithm (Bergen et al. 2020) that defines RNA velocities. These were projected onto the TinGa embedding (Figure 2A). ScVelo retraced two RNA trajectory dynamics (Figure 2B). The first suggests a circular trajectory that would fit with cells going through the cell cycle. The second corresponds to a linear trajectory of differentiation leading from clusters 5 and 7 to 8 and 3.

A similar dynamic was obtained using only the top 50 genes contributing to the scVelo's dynamical model (Figure S3B, Table S2) indicating that they were sufficient to recover the overall cell dynamics (Figure 2A). Interestingly, the dynamics in cluster 3 suggests that these cells could either stop in the G1 phase of the cell cycle and join those of cluster 8 or cycle again. Thus, the small branch identified by TinGa could correspond to a transient state of proliferating cells. We then analyzed the molecular function associated with these 50 genes and found that they could be broadly classified into three categories (cell cycle, migration, and immune function) (Table S2). To compare the contribution of these genes to the dynamic, the RNA velocities associated with cell-cycle-/migration-related genes or immune function genes were calculated and projected onto the TinGa embedding (Figures 2C and 2D). The cell cycle and migration genes clearly defined the first circular dynamics found at the start of the trajectory and also contributed to the differentiation process (Figure 2C), whereas the immune genes recapitulated a linear trajectory going from cluster 2 to 8 (Figure 2D). By looking at individual gene dynamics, we found that genes act on different parts of the cell differentiation trajectory. Genes such as Id2 have an early effect, with stronger contribution to the global velocities in clusters 4, 5, and 7, whereas genes such as IL18r1 and Gimap6 start to act at later pseudotime with stronger velocities in the final clusters of the trajectory (Figure S3C).

The trajectory inference based on single-cell transcriptomic data seems to recapitulate the two effector compartments that we have previously described, i.e., a first set of early effector cells that are cycling followed by a set of late effector cells that are quiescent and express increased levels of genes encoding immune effector functions (Crauste et al. 2017).

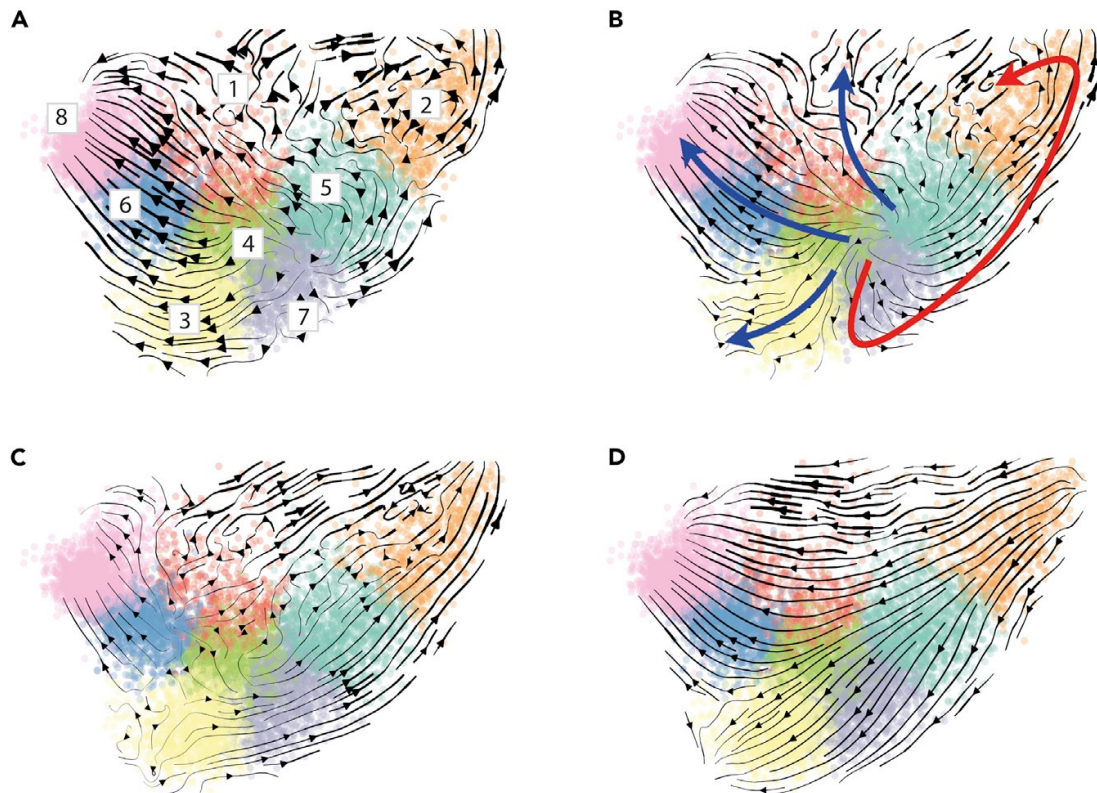


Figure 2. Gene expression dynamics along the differentiation trajectories

RNA velocities are projected onto the TinGa embedding. The cells in the trajectory were colored according to their TinGa milestones. (A) Velocities were calculated using all genes. Numbers correspond to TinGa clusters.

(B) The RNA velocities show two distinct dynamics. In clusters 2, 5, and 7, cells are cycling (red arrow) but can commit to the differentiation dynamic (blue arrows) by leaving clusters 5 and 7 to reach cluster 8. (C and D) RNA velocities based only on cell cycle and migration (C) or immune-function-related (D) genes. See also [Figure S3](#) and [Table S2](#).

Gene regulatory interaction analysis reveals a memory-precursors-associated module enriched in cluster 1

To further characterize the transitional stages defined along the TinGa trajectory, we identified regulatory interactions between transcription regulators and their target genes in the dataset using the BRED tool ([Cannoodt, 2019](#)). We identified six main GRN-modules, which we defined as groups of target genes gathered around a regulator ([Figure 3A](#)). As expected, based on previous results on the cell cycle, three of these modules (Pcna, Hmgb2, Cenpf) were strongly enriched in genes involved in cell-cycle regulation. The Ybx1 GRN-module contained two groups of genes: one coding for proteins involved in RNA and protein synthesis metabolism that were upregulated in the cells from the cluster 2-5-7 branch and the other for immune functions that were enriched in clusters 6 and 8 ([Figure S4](#)). Two GRN-modules were composed essentially of genes associated

with the immune response. The GRN module Spi1 was expressed in very few cells along the trajectory (Figure S5). In contrast, the Tcf7/Id2/Phb2 GRN-module contained genes coding for transcription factors and immune functions, associated with the differentiation of CD8 T cells in memory cells. These genes were expressed in different clusters along the trajectory (Figure S6). Interestingly, cluster 1 was enriched in cells that co-expressed genes from the Tcf7/Id2/Phb2 modules that were associated with an MP cell phenotype as defined by a number of studies (Yao et al. 2019, Pais Ferreira et al. 2020; Jeannet et al. 2010; Yang et al. 2011; Zhou et al. 2010; Chen et al. 2019). Indeed, they expressed Tcf7 and Id3, two transcription factors that were previously associated with an MP potential (Yao et al. 2019, Pais Ferreira et al. 2020; Jeannet et al. 2010; Yang et al. 2011; Zhou et al. 2010). Two target genes, Slamf6 and Tnfsf8, were found to be positively correlated with the presence of Tcf7 in the Tcf7/Id2/Phb2 module. In contrast, the Id2 transcription factor, which has previously been associated with an effector fate (Omilusik et al. 2018), was repressed in these cells, as was the effector-associated gene Gzmb (Figures 3B and S6).

In summary, cluster 1 seemed to contain an interesting set of cells in which effector functions were down-regulated, whereas genes associated with a memory precursor signature were overexpressed. We thus decided to further characterize the cells in cluster 1.

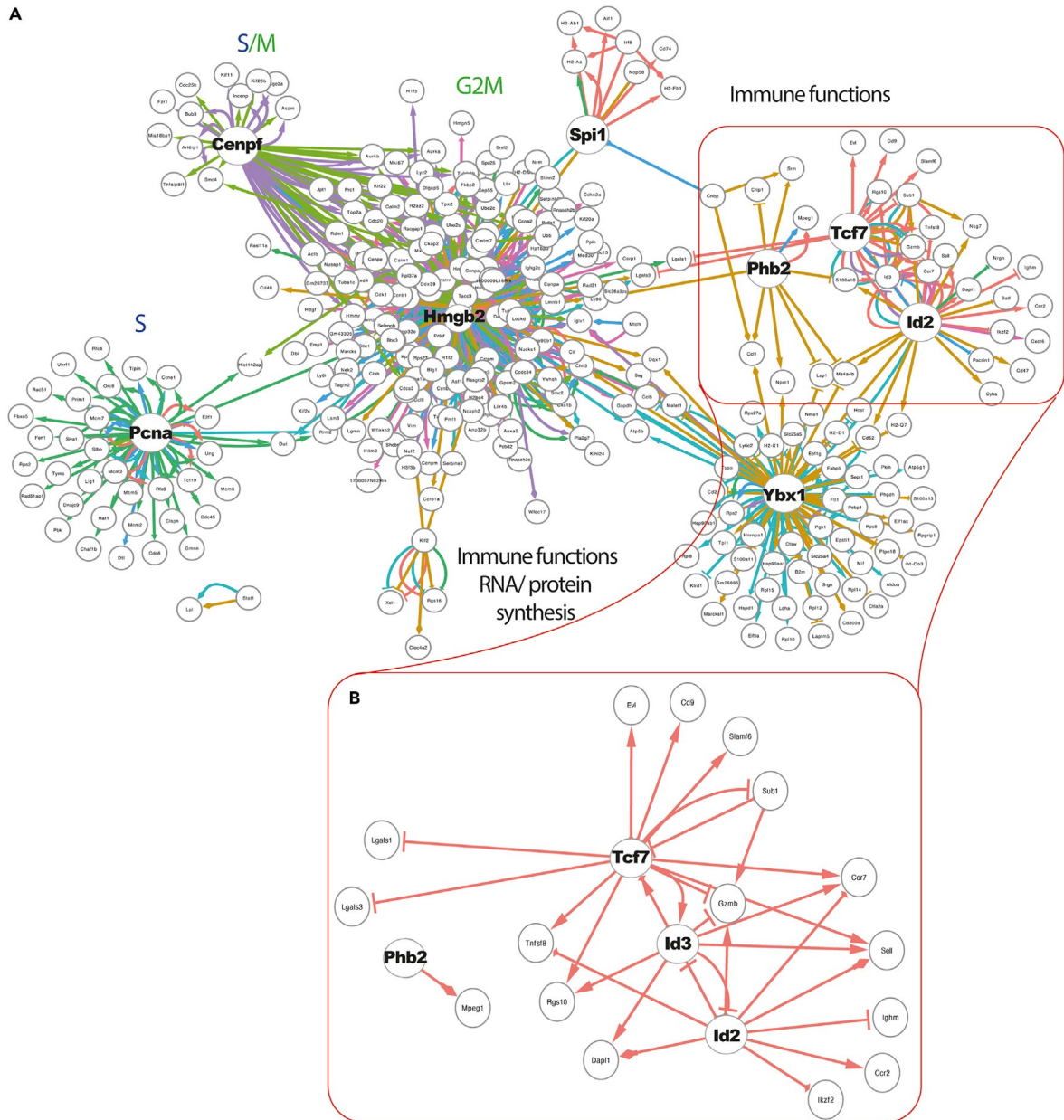


Figure 3. Gene regulatory interactions

(A) Gene regulatory network identified with BRED. In this GRN, regulatory processes are symbolized by arrows that are directed from transcription factors to their target genes or to other transcription factors. The top 100 interactions per TinGa cluster are represented and are colored according to the cluster in which they are occurring. The shape of the arrow indicated whether the interaction was an activation (->) or an inhibition (-|).

(B) Zoom on the Id2/Tcf7/Id3 module identified by BRED. Only the interactions occurring in cluster 1 in the TinGa trajectory are represented. See also [Figures S4–S6](#).

TinGa identifies distinct clusters associated with a memory-precursor phenotype

Cluster 1 was mainly composed of cells from day 4.5 pi, a large fraction of which (36%) was classified as being in the G1 phase of the cell cycle (Figures 1D, 1E, and S7A). This contrasted with other clusters enriched in cells from day 4.5 pi, such as clusters 2 and 5, that contained very few cells classified as being in G1 (Figures 1D and 1E).

To ascertain that cells in cluster 1 had been activated, we compared their transcriptome with the genes expressed in cluster 2 positioned at the beginning of the trajectory. Results in Figure S7B showed that the cells in cluster 1 expressed an increased amount of genes coding for effector functions such as *Ccl5* and *Gzma* compared with cluster 2, indicating that these cells had been activated as they had started to acquire effector functions. Cells in cluster 1 also expressed interferon-induced genes such as *Ifl27L2a*, *Ifl203*, *Ifl47* (colored in red in Figure S7B), indicating that these cells had responded to the pathogen-induced innate response. We thus concluded that cluster 1 contained cells from day 4.5 pi that had been activated but already displayed traits of quiescence.

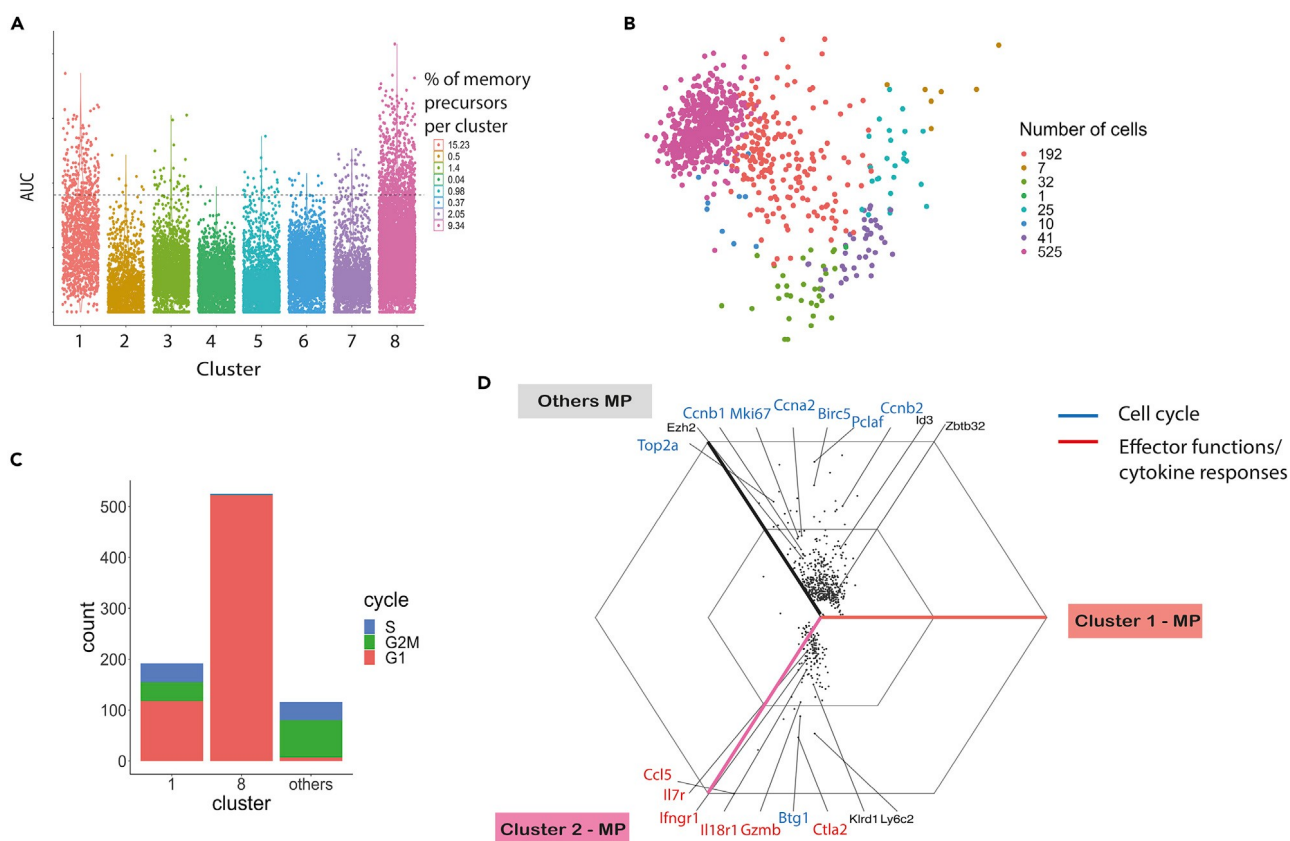


Figure 4. Memory precursor cell identification and characterization

(A and B) Memory precursor signature enrichment in each cluster along TinGa's trajectory. The cells above the threshold represented as a dotted line are considered as memory precursors. The percentage of cells with a memory precursor signature in each cluster is indicated. AUC: area under the curve. (B) The cells with a memory precursor signature were represented on the TinGa map and colored according to the cluster they came from. The number of cells with a memory precursor signature in each cluster is indicated. (C) Distribution in the G1, S, and G2/M cell-cycle phases of cells with a memory precursor signature from clusters 1, 8, or all others. (D) Triwise plot of the log fold-change expression of genes that were differentially expressed between the memory precursor cells found in cluster 1, 8, and all other memory precursors. Only the genes that were differentially expressed with a p value < 0.05 are represented. The internal hexagon corresponds to a log fold-change of 1, and the external hexagon corresponds to a log fold-change of 2. See also [Figures S7](#) and [S8](#) and [Table S3](#).

Cluster 1 cells expressed increased amounts of *Tcf7*, *Id3*, and *Ltb* as compared with all other cells in the trajectory, whereas *Klrg1*, a gene associated with terminal differentiation, was downregulated in these cells ([Figure S7C](#)). This was in agreement with the activation of the *Tcf7/Id2/Phb2* module containing genes associated with an MP potential in these cells.

To confirm the MP genetic program of cells in cluster 1 and to identify all MP cells along the trajectory, we performed a gene set enrichment analysis (GSEA) using the MP gene signature recently defined in [Yao et al., \(2019\)](#) ([Table S3](#) and [Figure 4A](#)). We identified 833 MP cells that were mainly localized in clusters 1 and 8 ([Figures 4A](#) and [4B](#)). Unsurprisingly, cluster 1 was the most enriched in the MP signature, with 15% of the cells presenting the signature. Cluster 8 also contained a significant fraction (9%) of MP cells. However, the majority of MP cells were associated with cluster 8 that contained 3 times more MP cells than cluster 1 ([Figures 4B](#) and [4C](#)). The majority of MP in cluster 1 and 8 were associated with the G1 phase of the cell cycle compared with those in the other clusters that were mainly in S and G2/M phase ([Figure 4C](#)). A second gene signature coming from P14 CD8 T cells expressing *Tcf7* at the effector stage (referred to as Tpcm) and published by Pais Ferreira et al., ([Pais Ferreira et al. 2020](#)) was used to validate these results ([Figures S7D](#) and [S7E](#)). We found 456 Tpcm cells that were mainly associated with clusters 1 (about 7%) and 8 (5.5%) in agreement with the previous results.

To determine the number of MP cells associated with secondary lymphoid organs that had effectively been found on each sampling day, we recalculated the number of MP cells present in the spleen of animals at the two experimental time points (see [STAR Methods](#) section). Based on the number of LCMV-Arm-specific CD8 T cells present in the spleen on day 4.5 and 7 pi, we could estimate the number of cells with an MP gene signature on these two days to be 3,850 and 643,000. This indicated that the number of MP cells generated 4.5 days after infection is more than 150 times lower than the number of MP cells generated 7 days after infection, in agreement

with values estimated in [Crauste et al., \(2017\)](#).

To investigate differences between MP cells generated at day 4.5 and at day 7 pi, we compared the gene expression profiles of cluster 1 with that of cluster 8 MP cells respectively and with the profiles of MP from all the other clusters ([Figure 4D](#)). Both clusters 1 and 8 MP cells showed a decreased expression of genes driving the cell cycle compared with the other MP, in agreement with their position in G1 phase ([Figures 4C and 4D](#)). Cluster 8 MP cells have an increased expression of genes coding for proteins involved in effector functions (*Gzmb*, *Ctla2*, *Ccl5*) and cytokine response (*Il7r*, *Il18r1*, *Ifngr1*) compared with cluster 1 MP cells, indicating that, although they display an MP gene signature, they have also acquired effector cell properties. This was in agreement with the data showing that effector cells could dedifferentiate into quiescent memory cells ([Youngblood et al. 2017](#)). Interestingly, cycling MP (i.e., MP from clusters other than 1 and 8) expressed genes coding for transcription factors (*Zbtb32*, *Id3*) or histone modifier (*Ezh2*) involved in the regulation of the developmental switch between effector and MP cells, suggesting that cycling MP are still oscillating between these two fates ([Kakaradov et al. 2017](#); [Shin et al. 2017](#); [Yang et al. 2011](#)).

To confirm the continuous generation of MP cells, we analyzed a second transcriptomic dataset generated by [Kurd et al.](#), that contained cells sampled at multiple time points during the primary response (day 4, 5, 6, 7, and 10 post-LCMV infection). Highly variable genes expressed by the 9,614 cells were selected and TinGa was applied ([Figure S8A](#)). The trajectory obtained is similar to the [Yao et al.](#)'s data ([Yao et al. 2019](#)), with the first part of the trajectory being enriched in cycling cells (cluster 1, 3, 8, 6, and 4) that were sampled on day 4, 5, 6, and 7 pi. The second part contained quiescent cells sampled on day 6, 7, and 10 pi ([Figures S8A–S8C](#)). Similarly, 574 MP cells were found by GSEA all along the TinGa trajectory ([Figures S8D and S8E](#)).

Overall, these results suggested that MP cells with different functional and differentiation statuses, from activated cycling cells to quiescent effector cells, were present at different points along the trajectory.

In vivo validation of memory cell generation at different time points following activation of CD8 T cells

Our *in-silico* analyses strongly suggest that CD8 T cells become quiescent and differentiate into memory cells at different stages following activation in response to acute viral infection. To validate this result *in vivo*, we used BrdU pulse-chase experiments. Indeed, these allow tracking cells that proliferate during the pulse time and stop soon thereafter, thus maintaining their BrdU labeling in the memory phase. This way, we can identify MP cells present at the time of pulse. We also wanted

to extend the data to other experimental systems, so we used vaccinia virus (VV) that induces a local acute infection in the lung when inoculated intra- nasally. Thus, mice were infected intranasally with a VV harboring the NP68 epitope, and we followed the activation of TCR transgenic F5 cells in secondary lymphoid organs (Crauste et al. 2017). Mice were given one injection of BrdU on days 4, 7, or 11 pi, and BrdU labeling was analyzed after 24 h in the spleen and the lymph nodes draining the lung and nasal cavity (Figures 5A and S9A).

Following VV infection, TCR transgenic F5 CD8 T cells increased in proportion and numbers over time in both spleen and draining lymph nodes (dLN), with a peak 8 dpi (Figures 5B, 5C, and S9B). The percentage of BrdU-labeled cells, representative of proliferating CD8 T cells, was maximal 5 dpi in the dLN and 8 dpi in the spleen, reflecting the local initiation of the CD8 T cell immune response following intranasal infection (Figures 5D, 5E, and S9C). The number of BrdU-labeled cells was maximal both in spleen and dLN 8 dpi and started to decrease thereafter with a limited number of cycling cells detected at 12 dpi.

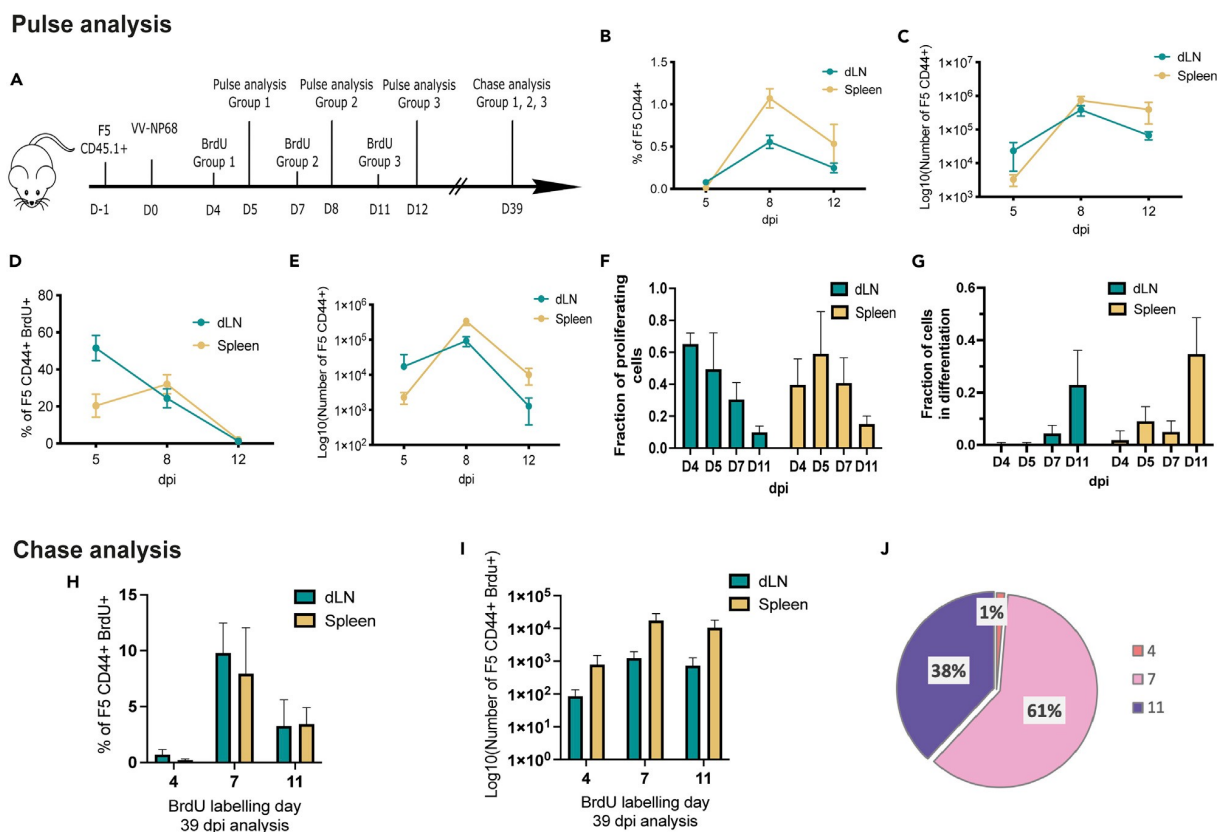


Figure 5. *In vivo* identification of memory precursors using BrdU labeling

(A) Naive CD45.1 F5 TCR-tg CD8 T cells were transferred to C57BL/6 congenic recipients (n = 5 per group) one day prior i.n. infection with VV-NP68. Mice then received one BrdU injection (2 mg i.p.) on day 4

(Group1), day 7 (Group2), or day 11 (Group3). BrdU labeling was determined by flow cytometry on cells collected 24 h after BrdU injection (pulse) or 39 days post infection (chase).

(B–E) The percentages (B, D) and numbers (C, E) of total F5 CD44⁺ (B, C) and BrdU + F5 CD44⁺ (D, E) CD8 T cells were determined 24 h after BrdU injection (pulse) in the indicated organs. (F) Fraction of proliferating early effector (EE) cells in the indicated organs from day 4 to day 11 postinfection. (G) Fraction of EE cells that differentiate into late effector (LE) cells in the indicated organs from day 4 to day 11 post infection. (H and I) The percentages (H) and numbers (I) of BrdU + F5 CD8 memory T cells originating from cells labeled on days 4, 7, or 11 pi was determined 39 days after BrdU injection (chase) in the indicated organs.

(J) The proportion of BrdU positive memory cells originating from MP labeled on days 4, 7, or 11 pi was determined as follows: the mean number of BrdU + F5 CD8 memory T cells at a given day was normalized to the sum of mean BrdU + F5 CD8 memory T cells numbers recovered on day 4, 7, and 11. Data are represented as mean \pm SD and are representative of 3 independent experiments. See also [Figure S9](#).

Using data from three independent experiments, we next estimated (see [STAR Methods](#) section) the fraction of early effector cells that proliferate and differentiate into late effector cells ([Crauste et al. 2017](#)) on days 4, 5, 7, and 11 pi. In agreement with the BrdU-labeling profile of total CD8 T cells, we found that the fraction of proliferating effector cells peaks on days 4–5 before quickly decreasing both in dLN and spleen ([Figure 5F](#)). This is in agreement with previous results ([Crauste et al. 2017](#)) obtained on blood samples. In contrast, the fraction of cells that differentiate into quiescent effector cells are very low on days 4–5 pi, increasing on day 7 pi with the highest fraction of cells being observed on day 11 pi, once proliferation has drastically vanished, in both spleen and dLN ([Figure 5G](#)).

We then measured the fraction and number of BrdU-labeled CD8 T cells in the memory phase (39 dpi) in order to evaluate the MP cells present on day 4, 7, or 11 pi ([Figures 5A, 5H, 5I, S9D, and S9E](#)). Indeed, cells still labeled after chase in the memory phase correspond to memory precursors having dropped out of proliferation soon after labeling and survived the contraction phase. As predicted by the single-cell transcriptomic data, we found that memory cells could derive from activated/effector cells at all investigated times. However, the largest fraction of memory cells was derived from cells labeled on day 7 or later ([Figure 5J](#)). Importantly the few cells that were labeled with BrdU between days 11 and 12 gave rise to a significant fraction of the memory cell pool in agreement with increasing fraction of cells in differentiation ([Figure 5G](#)).

Finally, we compared protein expression of memory cells generated on day 4, 5, or day 7 pi. We thus performed a BrdU chase experiment ([Figure 6A](#)) and measured the expression of proteins encoded by genes that were differentially expressed in the single-cell transcriptomic dataset ([Figures 4D, S10A, and S10B; Table S4](#)). We found that only CCL5, which was the most differentially

expressed gene in late d7 MP cluster 8 (Figure 4D), was also expressed at a higher protein level by F5 memory cells generated at 7 dpi (Figure 6B). Two other proteins, CD127 (IL7R) and Ly6C, were not differentially expressed in the memory phase (Figures S10A and S10B). The expression of CCL5 was also measured on endogenous antigen-induced BrdU positive memory cells, identified based on their CD49d expression (Grau et al. 2018) (Figure S10C). Similarly, we found a significant increase of CCL5 expression on BrdU+ endogenous memory cells generated at 7 dpi in the dLN and spleen (Figures 6C and 6D).

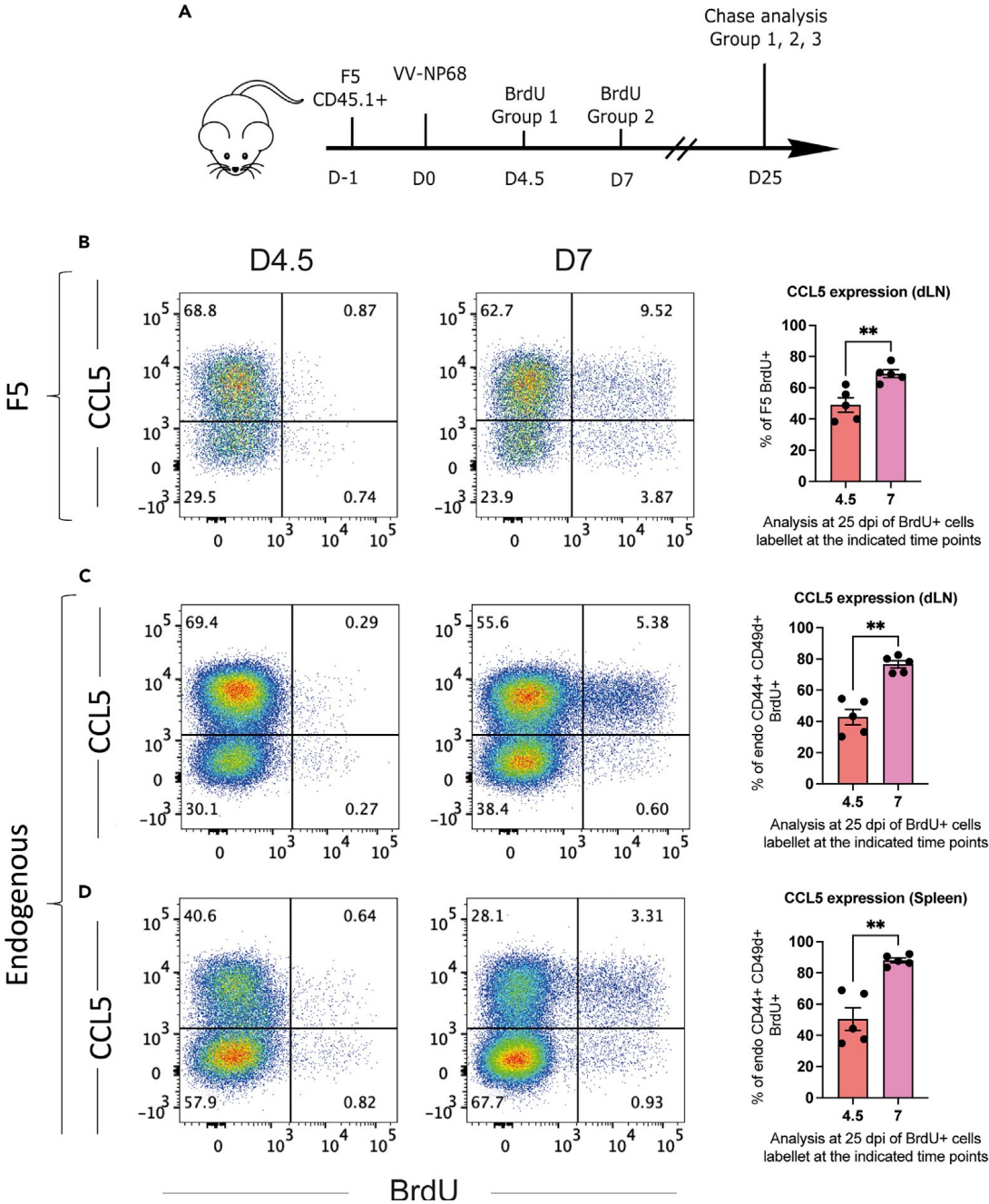


Figure 6. CCL5 expression by memory cells generated on day 4.5 or day 7 pi

(A) Naive CD45.1 F5 TCR-tg CD8 T cells were transferred to C57BL/6 congenic recipients (n = 5 per group) one day prior i.n. infection with VV-NP68. Mice then received one BrdU injection (2 mg i.p.) on day 4.5 (Group1) or day 7 (Group2). BrdU labeling was determined by flow cytometry on cells collected 25 days (chase) after infection. (B) Flow cytometry plots and quantification of BrdU + F5 memory cells expressing CCL5 labeled on day 4.5 and 7 with BrdU was assessed.

(C and D) Flow cytometry plots and quantification of CD44⁺ CD49d⁺ BrdU + endogenous memory cells expressing CCL5 labeled on day 4.5 and 7 with BrdU was assessed in the draining lymph node (C) and in the spleen (D). *p < 0.05 (Mann-Whitney test). Data are represented as mean ± SD and are representative of 2 independent experiments. See also [Figure S10](#) and [Table S4](#).

Overall, these results show that memory cells are generated continuously after activation. However, due to cellular expansion, the majority of memory cells are generated late during the effector phase.

DISCUSSION

In this study, we have used trajectory inference tools to analyze the generation of memory precursor CD8 T cells during a primary response against an acute viral infection. A single-cell transcriptomic dataset ([Yao et al. 2019](#)) generated at two time points during the primary response, was analyzed using two recently developed trajectory inference algorithms (Slingshot [[Street et al. 2018](#)] and TinGa [[Todorov et al. 2020](#)]). These tools allow modeling gradual transitions between cell states, as they tend to preserve the local similarities between cells, thus predicting the likely differentiation path followed by cells activated *in vivo* by the virus ([Saelens et al. 2019](#)). Trajectory inference tools have become essential, as they allow to predict the fate of cells that have to be lysed to analyze their cellular content and/or transcriptome. Although different dimensionality reduction and trajectory computation approaches were used, the trajectories identified by both algorithms were driven by similar sets of genes and displayed a consistent trajectory starting among cells from day 4.5 post infection that were mainly cycling and ending among cells from day 7 post infection that were mainly quiescent. Importantly, there was a significant overlap between cells collected on each day, as clusters in the middle of the trajectory contained cells from both time points. This indicates that the differentiation process, although continuous, is heterogeneous in its duration, as for example some cells exit the cell cycle at early time points or acquire effector functions more rapidly. This is in agreement with experiments tracking the fate of single T cells in mice that have shown that the clonal size of memory cells generated from a naive CD8⁺ T cell is heterogeneous ([Buchholz et al. 2013](#); [Gerlach et al. Gerlach et al. 2013](#)). The trajectory identified by TinGa was more refined, as it identified 8 transitional stages, one of which (cluster 1) was strongly enriched in MP cells identified using a gene signature derived from [Yao et al., \(2019\)](#).

We also applied scVelo ([Bergen et al. 2020](#)), a method that uses the splicing state of transcripts to calculate RNA velocities. The projection of RNA velocities on the TinGa-generated map evidenced two cellular behaviors with early cycling cells that remain on a circular trajectory and later cells that follow a linear path. These two behaviors were associated with cell-cycle and immune function genes, respectively. Importantly, the linear trajectory driven by the immune effector genes started in early (d4.5) cells underpinning cycling and quiescent cells, thus reflecting the progressive expression of effector functions by activated CD8 T cells. These results are in agreement with the two effector compartments previously described, namely the early cycling effector cells and late quiescent effector cells expressing genes encoding immune effector functions, through which most MP cells have to go to generate the full pool of memory CD8 T cells ([Crauste et al. 2017](#)).

We herein found that MP are present at all pseudo-times, with an enrichment in clusters 1 and 8. The majority of MP cells in clusters 1 and 8 were in the G1 phase of the cell cycle, suggesting that they were on their way to become quiescent memory cells. We confirmed the continuous generation of MP cells on another dataset from [Kurd et al., \(2020\)](#). Importantly, we estimate that the number of MP cells generated on day 7 pi is around 100-fold higher than the number generated on day 4.5 pi. *In vivo* pulse-chase BrdU experiment confirmed that CD8 T cells became quiescent memory cells at different stages of an acute infection and that the differentiation rate of early effector cells increased over time. Overall, our data support a model where MP cells are generated continuously over the duration of the expansion phase and beyond, with the majority generated at the peak of the response. Memory precursors identified on day 7 (cluster 8) differ from MP cells generated earlier in the response, mainly by their expression of genes coding for CD8 effector functions (*Gzmb*, *Ccl5*), and we confirm that CCL5 is expressed at higher protein level by memory cells generated at 7 dpi compared with cells generated at 4.5 dpi. This is in agreement with the gradual acquisition of epigenetic modifications that lead to a poised transcriptional state of the effector molecule loci in memory CD8 T cells ([Dogra et al. 2016](#); [Henning et al. 2018](#)). Moreover, a recent paper by Bresser et al., ([Bresser et al. 2022](#)) using an elegant “division recorder” accordingly demonstrate that memory cells are derived from cells that have undergone a large number of divisions during the activation/effector phase. They also show that among the TCM pool of memory cells, those that have performed more divisions express more genes associated with effector functions ([Bresser et al. 2022](#)). Based on differential gene expression, we searched for surface markers that could distinguish memory precursor CD8 T cells generated early or late in the response. Unfortunately, we have been unable to identify such markers that would have allowed us to compare the functions and self-renewal capacities of these cells.

The continuous generation of MP over the duration of the effector phase could be explained by the sustained proliferation of MP generated early in the response. These cells would maintain self-renewing capacity while opening the chromatin at effector function gene loci. This would fit with the increased expression of mRNA coding for effector functions in MP identified on day 7. We estimate that cycling MP cells represent only about 15% of all MP cells. Interestingly, these cells differ from quiescent memory precursors by the expression of the transcription factors *Zbtb32* and *Ezh2*, which encodes a catalytic subunit of the polycomb repressive complex 2 (PRC2) (Gray et al. 2017). *Zbtb32*, which is transiently expressed during the effector phase, has recently been shown to control the magnitude of effector cells and the generation of memory cells (Shin et al. 2017). Epigenetic modification by *Ezh2* controls the survival and cytokine production of effector cells. Also, it would be involved in the developmental switch between terminal effector cells and memory cells by depositing H3K27me3 in T effector cells (Gray et al. 2017; Kakaradov et al. 2017). Thus, proliferating MP cells could represent bipotential cells that oscillate between two fates: the terminally differentiated effector fate that is associated with the repression of the self-renewing capacity and the activation of effector function loci and the memory precursor fate that maintains the self-renewing capacity while acquiring bivalent chromatin modification marks on gene encoding effector functions. This hypothesis would be in line with a recent study by Pace et al., (2018) and Kinjyo et al., (2015) suggesting that cycling cells may represent bipotent differentiation intermediates expressing both effector and stem/memory potential. A similar differentiation pattern has recently been found in a hematopoietic stem cell differentiation model (Moussy et al. 2017). Importantly in that model and similarly to our data, the number of divisions performed by bipotent cells before arresting and stabilizing in one or the other fate is heterogeneous.

Such a continuous bivalent model could reconcile a number of previously proposed conflicting models that positioned memory precursor cells at either early or late stages following activation (Arsenio et al. 2014; Bouneaud et al. 2005; Buchholz et al. 2013; Flossdorf et al. 2015; Jacob and Baltimore, 1999; Kakaradov et al. 2017) (Graphical abstract). Importantly, it could account for the diverse sizes of clones derived from a single cell, observed in fate mapping experiments (Buchholz et al. 2013; Gerlach et al. 2013) while being in agreement with the dynamical modeling of memory CD8 T cells generation (Crauste et al. 2017). Finally, it would allow the deposition of epigenetic fingerprints on genes that encode effector functions and are poised for rapid expression in memory cells.

Limitation of the study

This study mainly concerns memory CD8 T cells that transit through or reside within the spleen. The differentiation of tissue-associated memory CD8 T cells was not addressed. Indeed, the *in silico* as well as the *in vivo* data mainly focused on CD8 T cells sampled from the spleen or other

lymphoid organs. This should be the subject of future studies. Another limitation of the study results from using BrdU labeling to trace memory CD8 T cell differentiation *in vivo*. This only allowed us to characterize the differentiation of cycling memory precursor cells generated during the expansion phase of the primary response. However, our main conclusions are supported by a recent study that could trace memory cell generation further into the response (Bresser et al. 2022).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104927>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Yao (NIAMS), J. O'shea (NIAMS), P. Schwartzberg (NIAID), and T. Wu (Department of Immunology and Microbiology, University of Colorado School of Medicine) for sharing their data and advice. We acknowledge the contribution of SFR BioSciences (UAR3444/CNRS, US8/Inserm, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon) and the CELPHEDIA infrastructure (<http://www.celphedia.eu/>), especially the center AniRA in Lyon (AniRA-Cytometrie and AniRA-PBES facilities). This work was supported by Inserm, CNRS, Université de Lyon, ENS de -Lyon, region Auvergne-Rhône-Alpes (Ingerence pack ambition recherche), and ANR (MEMOIRE ANR-18-CE45-0001). Margaux Prieux has a region Auvergne-Rhône-Alpes PhD fellowship.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, H.T., M.P., and J.M.; Methodology, H.T. and J.M.; Software, H.T., R.C., and W.S.; Validation, H.T., M.P., D.L., and S.W.; Formal analysis, H.T., M.P., D.L., M.B., S.B., A.B., O.G., F.C., and Y.S.;

Investigation, H.T., M.P., and D.L.; Data curation, H.T., M.P., and J.M.; Writing—original draft, H.T., M.P., M.B., F.C., and J.M.; Writing—review and editing, H.T., M.P., D.L., C.A., A.B., O.G., F.C., and J.M.; Visualization, H.T. and M.P.; Supervision, A.B., O.G., Y.S., and J.M.; Project administration, J.M.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: March 9, 2022

Revised: June 21, 2022

Accepted: August 9, 2022

Published: September 16, 2022

REFERENCES

Aibar, Sara, Gonzalez-Blas, Carmen B, Moerman, Thomas, Huynh-Thu, Vân Anh, Imrichova, Hana, Aerts, Stein, et al. 2017. SCENIC: Single-cell regulatory network inference and clustering. *Nature Methods* 14, 1083–1086. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4463>. In press.

Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., et al., (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* 8, 379–385. <https://doi.org/10.1038/nm0402-379>.

Aran, D., Looney, A.P., Liu, L., Wu, E., Fong, V., Hsu, A., Chak, S., Naikawadi, R.P., Wolters, P.J., Abate, A.R., Butte, A.J., and Bhattacharya, M. (2019). Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat. Immunol.* 20, 163–172. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0276-y>.

Arsenio, J., Kakaradov, B., Metz, P.J., Kim, S.H., Yeo, G.W., and Chang, J.T. (2014). Early specification of CD8+ T lymphocyte fates during adaptive immunity revealed by single-cell gene expression analyses. *Nat. Immunol.* 15, 365–372. <https://doi.org/10.1038/ni.2842>.

Bergen, V., Lange, M., Peidli, S., Wolf, F.A., and Theis, F.J. (2020). Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling. *Nat. Biotechnol.* 38, 1408–1414.

Bouneaud, C., Garcia, Z., Kourilsky, P., and Pannetier, C. (2005). Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 201, 579–590. <https://doi.org/10.1084/jem.20040876>.

Bresser, K., Kok, L., Swain, A.C., King, L.A., Jacobs, L., Weber, T.S., Perie´, L., Duffy, K.R., de Boer, R.J., Scheeren, F.A., and Schumacher, T.N. (2022). Replicative history marks transcriptional and functional disparity in the CD8+ T cell memory pool. *Nat. Immunol.* 23, 791–801. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01171-9>.

Buchholz, V.R., Flossdorf, M., Hensel, I., Kretschmer, L., Weissbrich, B., Graf, P., Verschoor, A., Schiemann, M., Hofer, T., and Busch, D.H. (2013). Disparate individual fates compose robust CD8+ T cell immunity. *Science* 340, 630–635. <https://doi.org/10.1126/science.1235454>.

Cannoodt, R. (2019). Modelling Single-Cell Dynamics with Trajectories and Gene Regulatory networks (University of Ghent). PhD thesis.

Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., et al., (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 3151687–1691. <https://doi.org/10.1126/science.1139393>.

Chen, Z., Ji, Z., Ngiow, S.F., Manne, S., Cai, Z., Huang, A.C., Johnson, J., Staube, R.P., Bengsch, B., Xu, C., et al., (2019). TCF-1-Centered transcriptional network drives an effector versus exhausted CD8 T cell-fate decision. *Immunity* 51, 840–855.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.013>.

Crauste, F., Mafille, J., Boucinha, L., Djebali, S., Gandrillon, O., Marvel, J., and Arpin, C. (2017). Identification of nascent memory CD8 T cells and modeling of their ontogeny. *Cell Syst.* 4, 306–317.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.01.014>.

Dogra, Pranay, Ghoneim, Hazem E., Abdelsamed, Hossam A., Youngblood, Ben, 2016. Generating long-lived CD8⁺ T-cell memory: Insights from epigenetic programs. *Eur. J. Immunol.* 46, 1548–1562. <https://doi.org/10.1002/eji.201545550>. In press.

Fitzpatrick, D.R., Shirley, K.M., and Kelso, A. (1999). Cutting edge: stable epigenetic inheritance of regional IFN-gamma promoter demethylation in CD44^{high}CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* 162, 5053–5057.

Flossdorf, M., Rössler, J., Buchholz, V., Busch, D.H., and Hofer, T. (2015). CD8⁺ T cell diversification by asymmetric cell division. *Nat. Immunol.* 16, 891–893. <https://doi.org/10.1038/ni.3235>.

Gattinoni, L., Klebanoff, C.A., and Restifo, N.P. (2012). Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat. Rev. Cancer* 12, 671–684. <https://doi.org/10.1038/nrc3322>.

Gerlach, C., Rohr, J.C., Perie, L., van Rooij, N., van Heijst, J.W., Velds, A., Urbanus, J., Naik, S.H., Jacobs, H., Beltman, J.B., et al., (2013). Heterogeneous differentiation patterns of individual CD8⁺ T cells. *Science* 340, 635–639. <https://doi.org/10.1126/science.1235487>.

Graef, P., Buchholz, V.R., Stemberger, C., Flossdorf, M., Henkel, L., Schiemann, M., Drexler, I., Hofer, T., Riddell, S.R., and Busch, D.H. (2014). Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8(+) central memory T cells. *Immunity* 41, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.018>.

Grau, M., Valsesia, S., Mafille, J., Djebali, S., Tomkowiak, M., Mathieu, A.L., Laubretton, D., de Bernard, S., Jouve, P.E., Ventre, E., et al., (2018). Antigen-induced but not innate memory CD8 T cells express NKG2D and are recruited to the lung parenchyma upon viral infection. *J. Immunol.* 200, 3635–3646. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701698>.

Gray, S.M., Amezquita, R.A., Guan, T., Kleinstein, S.H., and Kaech, S.M. (2017). Polycomb repressive complex 2-mediated chromatin repression guides effector CD8⁺ T cell terminal differentiation and loss of multipotency. *Immunity* 46, 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.012>.

Hafemeister, C., and Satija, R. (2019). Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol.* 20,296. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1874-1>.

Haluszczak, C., Akue, A.D., Hamilton, S.E., Johnson, L.D., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S.C., and Kedl, R.M. (2009). The antigen-specific CD8⁺ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J. Exp. Med.* 206, 435–448. <https://doi.org/10.1084/jem.20081829>.

Hao, Yuhao, Hao, Stephanie, Andersen-Nissen, Erica, MauckIII, William M, Zheng, Shiwei, Satija, Rahul, et al. 2021. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 184, 3573–3587. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.048>. In press.

Henning, Amanda N, Roychoudhuri, Rahul, Restifo, Nicholas P, 2018. Epigenetic control of CD8⁺ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 340–356. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.146>. In press.

Hikono, H., Kohlmeier, J.E., Takamura, S., Wittmer, S.T., Roberts, A.D., and Woodland, D.L. (2007). Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 204, 1625–1636. <https://doi.org/10.1084/jem.20070322>.

Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., et al., (2005). Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* 6, 1236–1244. <https://doi.org/10.1038/ni1268>.

Jacob, J., and Baltimore, D. (1999). Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo. *Nature* 399, 593–597. <https://doi.org/10.1038/21208>.

Jameson, S.C., and Masopust, D. (2009). Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* 31, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.007>.

Jeannot, G., Boudousquie, C., Gardiol, N., Kang, J., Huelsken, J., and Held, W. (2010). Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 9777–9782. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914127107>.

Johnnidis, J.B., Muroyama, Y., Ngiow, S.F., Chen, Z., Manne, S., Cai, Z., Song, S., Platt, J.M., Schenkel, J.M., Abdel-Hakeem, M., et al., (2021). Inhibitory signaling sustains a distinct early memory CD8⁺ T cell precursor that is resistant to DNA damage. *Sci. Immunol.* 6, eabe3702. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe3702>.

Joshi, N.S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H.K., Urso, D.R., Hagman, J., Gapin, L., and Kaech, S.M. (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8⁽⁺⁾ T cell fates via the

graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 27, 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.010>.

Jubin, V., Ventre, E., Leverrier, Y., Djebali, S., Mayol, K., Tomkowiak, M., Mafille, J., Teixeira, M., Teoh, D.Y., Walzer, T., et al., (2012). T inflammatory memory CD8 T cells participate to antiviral response and generate secondary memory cells with an advantage in XCL1 production. *Immunol. Res.* 52, 284–293. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8340-4>.

Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 749–761. <https://doi.org/10.1038/nri3307>.

Kakaradov, B., Arsenio, J., Widjaja, C.E., He, Z., Aigner, S., Metz, P.J., Yu, B., Wehrens, E.J., Lopez, J., Kim, S.H., et al., (2017). Early transcriptional and epigenetic regulation of CD8+T cell differentiation revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat. Immunol.* 18, 422–432. <https://doi.org/10.1038/ni.3688>.

Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2010). Prolonged interleukin-2/Ralpha expression on virus-specific CD8+ T cells favors terminal- effector differentiation in vivo. *Immunity* 32, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.010>.

Kinjyo, I., Qin, J., Tan, S.Y., Wellard, C.J., Mrass, P., Ritchie, W., Doi, A., Cavanagh, L.L., Tomura, M., Sakaue-Sawano, A., et al., (2015). Real-time tracking of cell cycle progression during CD8+ effector and memory T-cell differentiation. *Nat. Commun.* 6, 6301. <https://doi.org/10.1038/ncomms7301>.

Kretschmer, L., Flossdorf, M., Mir, J., Cho, Y.L., Plambeck, M., Treise, I., Toska, A., Heinzl, S., Schiemann, M., Busch, D.H., and Buchholz, V.R. (2020). Differential expansion of T central memory precursor and effector subsets is regulated by division speed. *Nat. Commun.* 11, 113. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13788-w>.

Kurd, N.S., He, Z., Louis, T.L., Milner, J.J., Omilusik, K.D., Jin, W., Tsai, M.S., Widjaja, C.E., Kanbar, J.N., Olvera, J.G., et al., (2020). Early precursors and molecular determinants of tissue- resident memory CD8+T lymphocytes revealed by single-cell RNA sequencing. *Sci. Immunol.* 15, eaaz6894. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaz6894>.

Lun, A.T.L., McCarthy, D.J., and Marioni, J.C. (2016). A step-by-step workflow for low-level analysis of single-cell RNA-seq data with Bioconductor. *F1000Res* 5, 2122. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9501.2>.

Marcais, A., Coupet, C.A., Walzer, T., Tomkowiak, M., Ghittoni, R., and Marvel, J. (2006). Cell-autonomous CCL5 transcription by memory CD8 T cells is regulated by IL-4. *J. Immunol.* 177, 4451–4457. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4451>.

- Mann, T.H., and Kaech, S.M. (2019). Tick-TOX, it's time for T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 20, 1092–1094. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0478-y>.
- Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrançois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291, 2413–2417. <https://doi.org/10.1126/science.1058867>.
- McCarthy, D.J., Campbell, K.R., Lun, A.T.L., and Willis, Q.F. (2017). Scater: pre-processing, quality control, normalisation and visualisation of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics* 33, 1179–1186. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw777>.
- Melsted, P., Boeshaghi, A.S., Liu, L., Gao, F., Lu, L., Min, K.H., Da Veiga Beltrame, E., Hjørleifsson, K.E., Gehring, J., and Pachter, L. (2021). Modular, efficient and constant-memory single-cell RNA-seq preprocessing. *Nat. Biotechnol.* 39, 813–818. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00870-2>.
- Moussy, A., Cosette, J., Parmentier, R., da Silva, C., Corre, G., Richard, A., Gandrillon, O., Stockholm, D., and Pa'Idi, A. (2017). Integrated time-lapse and single-cell transcription studies highlight the variable and dynamic nature of human hematopoietic cell fate commitment. *PLoS Biol.* 15, e2001867. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001867>.
- Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Sourdive, D.J., Zajac, A.J., Miller, J.D., Slansky, J., and Ahmed, R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 2, 87–177, In press. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80470-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80470-7).
- Obar, J.J., Khanna, K.M., and Lefrançois, L. (2008). Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 28, 859–869. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.04.010>.
- Omilusik, K.D., Best, J.A., Yu, B., Goossens, S., Weidemann, A., Nguyen, J.V., Seuntjens, E., Stryjewska, A., Zweier, C., Roychoudhuri, R., et al., (2015). Transcriptional repressor ZEB2 promotes terminal differentiation of CD8+ effector and memory T cell populations during infection. *J. Exp. Med.* 212, 2027–2039. <https://doi.org/10.1084/jem.20150194>.
- Omilusik, K.D., Nadsombati, M.S., Shaw, L.A., Yu, B., Milner, J.J., and Goldrath, A.W. (2018). Sustained Id2 regulation of E proteins is required for terminal differentiation of effector CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 215, 773–783. <https://doi.org/10.1084/jem.20171584>.
- Pace, L., Goudot, C., Zueva, E., Gueguen, P., Burgdorf, N., Waterfall, J.J., Quivy, J.P., Almouzni, G., and Amigorena, S. (2018). The epigenetic control of stemness in CD8+ T cell fate commitment. *Science* 359, 177–186. <https://doi.org/10.1126/science.aah6499>.
- Pais Ferreira, D., Silva, J.G., Wyss, T., Fuertes Marraco, S.A., Scarpellino, L., Charmoy, M., Maas, R., Siddiqui, I., Tang, L., Joyce, J.A., et al., (2020). Central memory CD8+ T cells derive from stem-like

Tcf7hi effector cells in the absence of cytotoxic differentiation. *Immunity* 53, 985–1000.e11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.09.005>.

Papalexi, E., and Satija, R. (2018). Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 35–45. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.76>.

Saelens, W., Cannood, R., Todorov, H., and Saeys, Y. (2019). A comparison of single-cell trajectory inference methods. *Nat. Biotechnol.* 37, 547–554. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0071-9>.

Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W.N., Konieczny, B.T., Subramaniam, S., and Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J. Exp. Med.* 205, 625–640. <https://doi.org/10.1084/jem.20071641>.

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712. <https://doi.org/10.1038/44385>. PMID: 10537110.

Shin, H.M., Kapoor, V.N., Kim, G., Li, P., Kim, H.R., Suresh, M., Kaech, S.M., Wherry, E.J., Selin, L.K., Leonard, W.J., et al., (2017). Transient expression of ZBTB32 in anti-viral CD8+ T cells limits the magnitude of the effector response and the generation of memory. *PLoS Pathog.* 13, e1006544. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006544>.

Street, K.Y., Risso, D., Fletcher, R.B., Das, D., Ngai, J., Yosef, N., Purdom, E., and Dudoit, S. (2018). Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genom.* 19, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4772-0>.

Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., 2nd, Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al., (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 352, 189–196. <https://doi.org/10.1126/science.aad0501>.

Todorov, H., Cannoodt, R., Saelens, W., and Saeys, Y. (2020). TinGa: fast and flexible trajectory inference with Growing Neural Gas. *Bioinformatics* 36, i66–i74. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa463>.

Van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C.L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., and Guilliams, M. (2016). Yolk sac macrophages, fetal liver, and adult monocytes can colonize an empty niche and develop into functional tissue-resident macrophages. *Immunity* 44, 755–768. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.017>.

Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., and Ahmed, R. (2003). Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* 77, 4911–4927. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.8.4911-4927>.

Wherry, E.J., Ha, S.J., Kaech, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L., and Ahmed, R. (2007). Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27, 670–684. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>.

Yang, C.Y., Best, J.A., Knell, J., Yang, E., Sheridan, A.D., Jesionek, A.K., Li2, H.S., Rivera, R.R., Lind, K.C., M D’Cruz, L., Watowich, S.S., et al., (2011). The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat. Immunol.* 12, 1221–1229. <https://doi.org/10.1038/ni.2158>.

Yao, C., Sun, H.W., Lacey, N.E., Ji, Y., Moseman, E.A., Shih, H.Y., Heuston, E.F., Kirby, M., Anderson, S., Cheng, J., et al., (2019). Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8+ T cell persistence in chronic infection. *Nat. Immunol.* 20, 890–901. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0403-4>.

Youngblood, B., Hale, J.S., Kissick, H.T., Ahn, E., Xu, X., Wieland, A., Araki, K., West, E.E., Ghoneim, H.E., Fan, Y., et al., (2017). Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature* 552, 404–409. <https://doi.org/10.1038/nature25144>.

Zhou, X., Yu, S., Zhao, D.M., Harty, J.T., Badovinac, V.P., and Xue, H.H. (2010). Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity* 33, 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.002>.

STAR+METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
FITC anti-rat/mouse-Bcl-2 (clone BCL10C4)	Biolegend	Cat#633504; RRID: AB_2028394
BUV395 anti-mouse CD8a (Clone 53–6.7) PE	BD Bioscience	Cat#563786; RRID: AB_2732919
anti-mouse CCL5 (clone 2E9)	Biolegend	Cat#149103; RRID: AB_2564405
BV605 anti-mouse/human CD44 (clone IM7)	Biolegend	Cat#103047; RRID: AB_2562451
BUV737 anti-mouse CD45.1 (clone A20) BV650	BD Biosciences	Cat#564574; RRID: AB_2738850
anti-rat/mouse CD49a (clone Ha31/8)	BD Biosciences	Cat#740519; RRID: AB_2740235 Cat#46-
PerCP-eFluor 710 anti-mouse CD49d (clone R1-2) BV510	eBiosciences	0492-82; RRID: AB_11150051
anti-mouse CD62L (MEL-14)	Biolegend	Cat#104441; RRID: AB_2561537
BV421 anti-mouse CXCR3 (CXCR3-173)	Biolegend	Cat#126521; RRID: AB_2562205 Cat#65-
Fixable Viability Dye eFluor 780 Biotin	eBiosciences BD	0865-14
anti-mouse Ly-6C (clone AL-21)	Biosciences	Cat#557359; RRID: AB_396663 cat#13-
Biotin anti-mouse Ly108 (clone 13G3-19D) PE-	eBiosciences	1508-82; RRID: AB_763614 Cat#25-
Cy7 anti-mouse CD127 (clone A7R34) PerCP-	eBiosciences	1271-82; RRID: AB_469649 Cat#46-5698-
eFluor 710 anti-mouse Ki67	eBiosciences	82; RRID: AB_11040981 Cat#11-5893-82;
FITC anti-mouse KLRG1 (clone 2F1)	eBiosciences	RRID: AB_1311265
Bacterial and virus strains		
VV-NP68Dr. D.Y.-L.	Teoh (Human Immunology Unit, Institute of Molecular Medicine, Oxford, U.K.)	Modified from the Western Reserve strain

Chemicals, peptides, and recombinant proteins

DMEM	Thermofisher	Cat#61965-026
Sodium pyruvate (100mM)	Thermofisher	Cat#11360-039
HEPES (1M)	Thermofisher	Cat#15630-056
Gentamicin (50mg/mL)	Thermofisher	Cat#15750-037
Beta-mercaptoethanol	Thermofisher	Cat#31350-010
DPBS	Thermofisher	Cat#14190-094
FBS	BioWest	Cat#S1810-500 (Lot#S13439S1810)
NaN3 (CAS# 26628-22-8)	Sigma-Aldrich	Cat#S2002-500 (Lot#MKBX7529V)
efluor780-coupled Fixable Viability Dye	Invitrogen	Cat#65-0865-18
NP68 (ASNENMDAM)	Proteogenix	N/A
BrdU	Sigma	Cat#B5002-100MG
		Cat#00-4440-51A

Critical commercial assays

BrdU Staining Kit for Flow Cytometry APC	eBiosciences	Cat#8817-6600-42
--	--------------	------------------

Experimental models: Organisms/strains

Mouse : C57Bl6/J : C57BL/6J	Charles River	Strain code : 632
Mouse : F5 : B6/J-Tg(CD2-TcraF5, CD2-TcrbF5)1Kio/Jmar	Prof. D. Kioussis (National Institute of Medical Research, London, U.K.)	N/A

Software and algorithms

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
BDFACSDiva (v8.0) software	BD Biosciences	N/A
Flowjo (v10.8.1)	Flowjo software	N/A
Prism (v9.3.1)	Graphpad software	N/A
Cell Ranger v3.1	10X genomics	single-cell-gene-expression/software/pipelines/latest/installation
Kallisto and Bustools	Melsted et al. 2021	https://www.kallistobus.tools/kb_usage/kb_usage/
Scater	McCarthy et al. 2017	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/scater.html
Seurat v4	Hao et al. 2021	https://satijalab.org/seurat
Scan	Lun et al. 2016	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/scan.html
SingleR	Aran et al. 2019	https://bioconductor.org/packages/SingleR/
TinGa (implemented in dynverse package)	Todorov et al. 2020	https://dynverse.org
Slingshot (implemented in dynverse package)	Street et al. 2018	https://dynverse.org
AUCell	Aibar et al. 2017	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/AUCell.html
ScVelo	Bergen, et al., 2020	https://scvelo.readthedocs.io
BRED	Cannoodt, 2019 (PhD thesis)	https://github.com/rcannoodt/bred
Cytoscape	Cytoscape	https://cytoscape.org

Other

D4.5 and D7 p.i. single-cell RNA-seq on P14 cells	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE119943
D0 to D90 p.i. single-cell RNA-seq on P14 cells	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE131847

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Jacqueline Marvel (jacqueline.marvel@inserm.fr).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

- Accessions for publicly-available datasets used in this study are described in previous publications and in the [key resources table](#).
- This paper does not report original code. Code used to generate figures is available upon reasonable request from the [lead contact](#).
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the [lead contact](#) upon request.

METHOD DETAILS

Experimental procedures

Mice

C57BL/6J mice were purchased from the Charles River Laboratories. F5 TCR [B6/J-Tg(CD2-Tcr α F5,CD2-Tcr β F5) 1Kio/Jmar] transgenic mice were provided by Prof. D. Kioussis (National Institute of Medical Research, London, U.K.) and backcrossed on CD45.1 C57BL/6 background ([Jubin et al. 2012](#)). Mice were bred or housed under specific pathogen free conditions in our animal facility (AniRA-PBES, Lyon, France). All experiments were approved by our local ethics committee (CECCAPP, Lyon, France) and accreditations have been obtained from governmental agencies.

BrdU labelling

Mice received 2.3×10^5 naive CD45.1 F5-Tg CD8 T cells by intravenous (i.v.) injection one day prior intranasal (i.n.) infection with VV-NP68 (2.3×10^5 pfu under 20 μ L). Mice then received one intraperitoneal (i.p.) BrdU injection (2 mg, Sigma). BrdU labelling was analysed 24h after BrdU administration or 25 and 39 days post infection (dpi).

Cell analyses

Mice were sacrificed by cervical dislocation and spleen and draining lymph nodes (cervical and mediastinal) were collected. Flow cytometry staining was performed on single-cell suspensions from each organ. Briefly, cells were first incubated with efluor780-coupled Fixable Viability Dye (Thermo Scientific) for 20 min at 4°C to label dead cells. Surface staining

was then performed for 45 min at 4°C in PBS (TFS) supplemented with 1% FBS (BioWest) and 0.09% NaN₃ (Sigma-Aldrich). Cells were then fixed and permeabilized in 96 wells plates using 200 L of BrdU staining solution from the BrdU Staining Kit for Flow Cytometry APC (ThermoScientific) according to manufacturer instructions. The following mAbs(clones) were used: CD8(53.6.7), CD45.1 (A20) from BD Biosciences, CD44(IM7.8.1), Bcl2 (BCL/10C4) and CCL5 (2E9) from Bio-legend and Ki67 (SolA15) and CD49days (R1-2) from Thermofischer Scientific. Samples were acquired on a FACS LSR Fortessa (BD biosciences) and analyzed with FlowJo software (TreeStar).

Estimation of proliferation and differentiation rates of early effector CD8⁺ T cells

Neglecting CD8⁺ CD44⁺ effector cells death over the 24 h period between BrdU injection and sample collection, we consider that early effector (CD44⁺ Bcl2- Ki67+, [Crauste et al. 2017](#)) CD8 T cells can either proliferate or differentiate. Upon BrdU injection, proliferating cells incorporate BrdU, therefore early effector cell proliferation rate can be approximated by the ratio: #CD44+ Bcl2- BrdU+ cells/#CD44+ Bcl2- Ki67 + cells (which is equivalent to assuming a linear proliferation rate and that all proliferating cells are BrdU+).

The number of BrdU + late effector (CD44⁺ Bcl2- Ki67-, [Crauste et al., 2017](#)) cells one day after BrdU injection corresponds to the fraction of BrdU + early effector cells that have dropped out of cycle, i.e. the first step in their differentiation, following BrdU injection. Hence, the differentiation rate of early effector cells into late effector cells is approximated by the ratio: #CD44+ Bcl2- Ki67- BrdU + cells/#CD44+ Bcl2- BrdU + cells.

In vivo memory precursor cell number calculation

The number of MP present in the spleen of animals at each time point was estimated for each cluster by multiplying the number of cells recovered at this time point (given by the number of cells collected in [Yao et al., \(2019\)](#)/by the percentage of cells in the given cluster (given by the TinGa analysis) and the percentage of MP cells among these (given by the GSEA analysis). Then the number of MP was summed for all 8 clusters to yield the number of MP present in the spleen at a given time point.

Data preprocessing

Single-cell RNA-seq data preprocessing

Existing single cell data from [Yao et al., \(2019\)](#) were used (GEO, accession no. GSE119943). A feature-bar-code matrix by replicate was generated using the Cell Ranger v.3.1 software (10X genomics) and only effector CD8 T cells in acute infection sampled at day 4.5 and day 7 post infection were kept for the analysis. The two replicates were pooled since no batch effect was observed. The cell filtering was made with the scater package ([McCarthy et al. 2017](#)). Briefly, cells with a log-library size and a log-transformed number of expressed genes that were more than 3 median absolute deviations below the median value were excluded. The

cells with less than 5% of mitochondrial counts were kept. These criteria were applied separately on the cells from day 4.5 and day 7 leading to 20,295 cells that were kept in total. The data was then normalized using the `sctransform` function in Seurat (Hafemeister and Satija, 2019) and variable genes were selected based on variance modeling statistics from the `modelGeneVar` function in Scran (Lun et al. 2016). The log-normalized expression values of the 2,000 highly variable genes were used for downstream analysis.

To validate our results, a second dataset from Kurd et al., (2020) were used (GEO, accession no. GSE131847). Pre-processed count matrices of cells sampled at day 4, 5, 6, 7 and 10 (replicate 1 only) were pooled (9,614 total cells) and genes detected in less than 1% of the total cells were removed. The data was then normalized using `sctransform` function and 1,573 highly variable genes were selected by setting the `variable.features.rv.th` parameter to 1.3 (default value).

Cell type classification

The cells were automatically annotated and the cell type to which they best corresponded was defined using the SingleR R package (Aran et al. 2019). The labeled normalized expression values of 830 microarray samples of pure mouse immune cells, generated by the Immunologic Genome Project (ImmGen), were used as reference. Cells that were clearly identified as non-T cells (7 B cells, 2 dendritic cells, 3 fibroblasts, 25 macrophages and 62 monocytes) were removed before further analyses were applied.

Advanced analyses

Cell cycle assignment

The Seurat R package was used to classify cells into G1, S or G2/M phases. The classifier relies on a list of genes from Tirosch et al., (2016), that contains markers of the G2/M and S phase. It attributes a class to each cell with a certain probability, with the possibility to attribute the G1 class to cells for which the G2/M or S scores were low.

Trajectory inference

Two recently published trajectory inference tools, Slingshot and TinGa, were used to identify a trajectory in the data. The normalized data was first wrapped into a dataset object with the `dynwrap` R package. The `slingshot` implementation in `dynwrap`, as found on the `github/dynverse/dynwrap` github PAGE, was applied to the data using the default parameters. The `TinGa` implementation as found on the `github/Helena-todd/TInGa` repository was applied to the data using the default parameters. The `dynplot` R package was then used for an easy visualization of the resulting trajectories.

Generating heatmaps of gene expression along trajectories

We used the `plot_heatmap()` function from the `dynplot` package to visualize the expression

of specific genes along the Slingshot and TinGa trajectories. We either used the function as a discovery tool to identify the top n genes that varied the most along the trajectories, or we provided lists of genes associated with a certain signature to see in which parts of the trajectories these genes were the most expressed.

Differential expression analysis

The transitional populations that were identified along the TinGa trajectory were used as clusters defining similar cells. Differential expression analysis was performed between these clusters using the Seurat R package. Wilcoxon rank sum tests were applied and genes were selected as differentially expressed if the difference in the fraction of detection of the gene between the two compared groups of cells was higher than 0.25, and if the log fold-change difference between the two groups was higher than 0.3. The differentially expressed genes were then visualized using the triwise R package (Van de Laar et al. 2016) and in a volcano plot that was generated manually in R with the ggplot2 R package.

Gene set enrichment analysis

Gene rankings were computed in cells using the AUCell R package. This allowed to identify cells that showed specific gene signatures. The memory precursor signature published by Yao et al., (Yao et al. 2019), consisting of a re-analysis of the data from Joshi et al., (Joshi et al. 2007) (GSE8678), was used. Of the 122 genes described as associated with a memory-precursor signature, only 42 genes were present in the 2,000 HVGs that we selected. We thus decided to use all genes available instead of restricting ourselves to the 2,000 HVGs for this analysis (115 genes found). 833 cells out of the 20,196 studied acute responding CD8 T cells were assigned to a memory precursor signature. The Tpcm signature from Pais Ferreira et al., (Pais Ferreira et al. 2020) was also tested. The signature consisted of 602 genes (576 gene expressed in Yao et al., dataset) differentially expressed in the effector-phase Tcf7^{GFP} CD8 T cells versus Tcf7^{GFP}- P14 cells at day 8 post LCMV Armstrong infection (criteria: adjusted p value <0,05 and log2FC > 1).

Inferring the number of memory precursors in the spleen

The number of memory precursors in the spleen was calculated based on the percentage of memory pre- cursors identified by gene set enrichment among total day 4.5 or day 7 cells and the average number of CD8 T cells found in the spleen of mice on those same days (Number of MP on day x = % of MP among single cell from day X * average total number of CD8 T cells in spleen on day X).

RNA velocity

Counts of spliced and unspliced abundances were obtained using the Kallisto and Bustools workflow (Melsted et al. 2021). Raw fastq files were pseudo-aligned on Ensembl's *Mus musculus* reference transcriptome using release 97. Only cells which passed previously

described preprocessing steps were kept. To infer RNA velocities and predict cell-specific trajectories, scVelo version 0.2.3 (Bergen et al. 2020) was used. As described in Bergen et al., (2020), velocities were estimated using the dynamical model and the neighborhood graph was computed on the PCA representation using 50 components. The velocity graph was computed with parameter *n_neighbors* set to 20. Other parameters were set to default values. Per-cell MDS coordinates obtained in TinGa were imported into scVelo to project RNA velocities in the same reduced embedding. The 50 genes best fitting scVelo's model were selected and divided into *Cell-Cycle*, *Migration* and *Immune Functions* categories according to their function. Finally, figures were obtained by applying the *velocity_embedding_stream* function.

Gene regulatory network inference

The BRED R package was used to identify regulatory interactions between a list of transcription factors (that was identified among the 2,000 HVGs using the database in the org.Mm.eg.db R package, and manually curated), and the 2,000 target genes. The scaled importances corresponding to these interactions were filtered, and the top 100 interactions corresponding to the 8 populations identified in the TinGa trajectory were selected, resulting in a gene regulatory network containing 800 interactions. A layout of these interactions was then generated using Cytoscape. In the resulting gene regulatory network, we define modules as groups of target genes linked to one central transcription factor.

SUPPLEMENTARY FIGURES

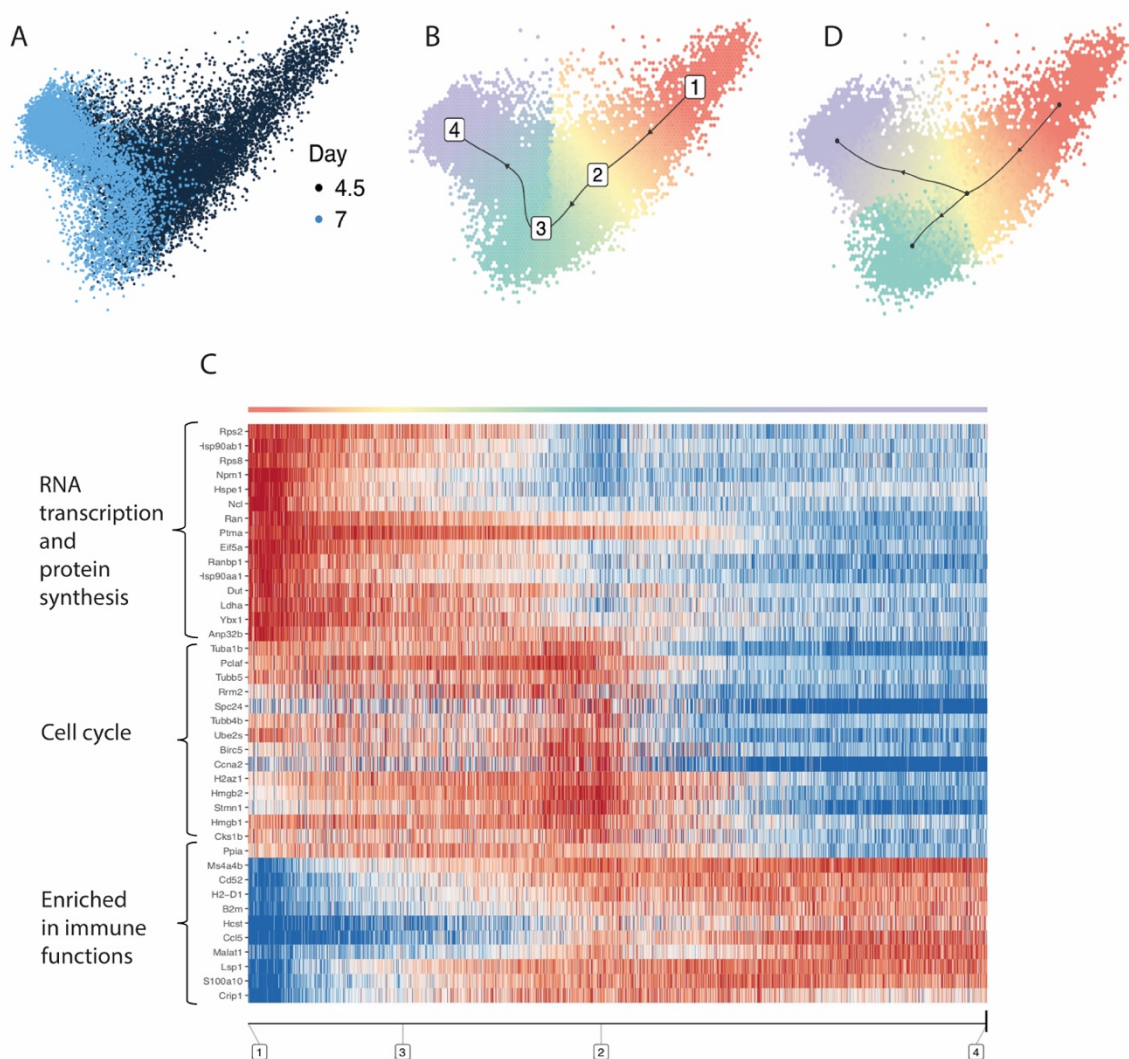


Figure S1: Slingshot trajectory, Related to Figure 1. (A, B) Visualisation of the cells in a 2D space computed by principal component analysis. (A) The cells were colored according to the two experimental time points 4.5 and 7 days post LCMV-Armstrong infection. (B) Slingshot recovered a linear trajectory that is represented by a black directed line. Numbers along the trajectory are used as milestones. (C) Heatmap of the 40 main genes that were associated with the Slingshot trajectory. The genes are represented in rows and the cells are represented in columns, re-ordered along the trajectory. The trajectory milestone structure is reported at the bottom of the heatmap as a visual support, and the cluster associated colours are represented at the top of the heatmap. Gene expression is depicted from low (blue) to high (red) values in the heatmap. (D) Trajectory identified by Slingshot using the top 10 percent (= 1300) of the most highly variable genes instead of the 2000 HVGs described in this paper.

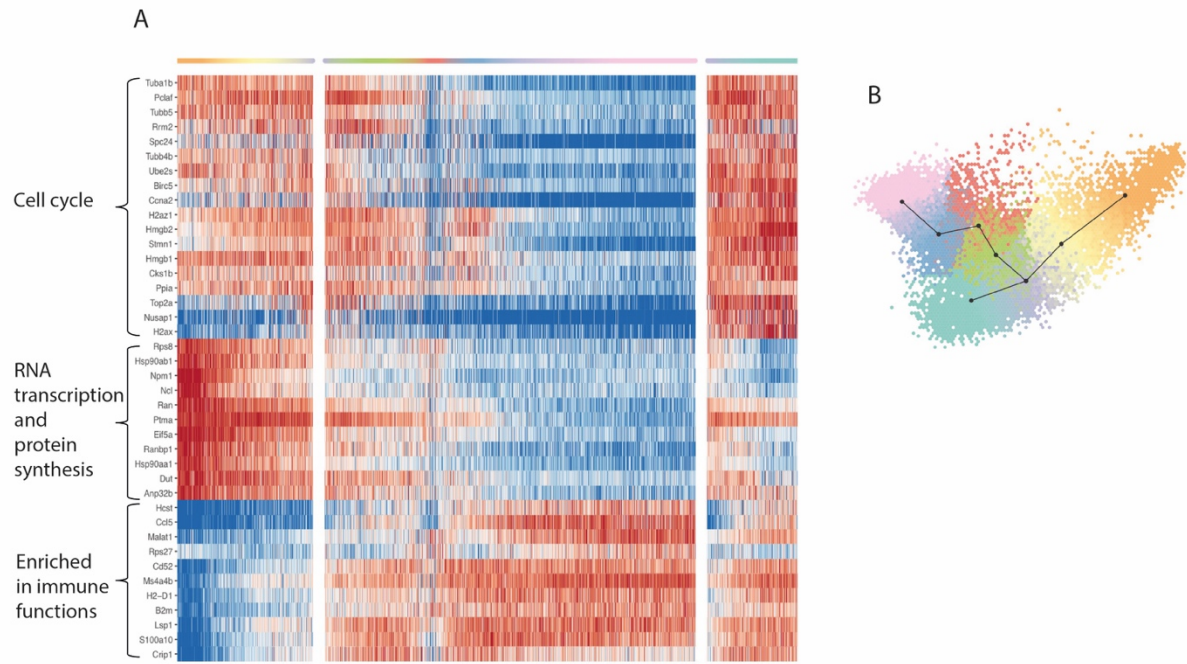


Figure S2: TinGa trajectory, Related to Figure 1. (A) Heatmap of the 40 main genes that were associated with the TinGa trajectory. The genes are represented in rows and the cells are represented in columns and are ordered along the TinGa trajectory. The three branches of the trajectory can be identified with milestone colours on top of the heatmap and numbers at the bottom of the heatmap. Gene expression is depicted from low (blue) to high (red) values in the heatmap. (B) Trajectory identified by TinGa when the top 10 percent (= 1300) of the most highly variable genes instead of the 2000 HVGs used in (A) and other figures.

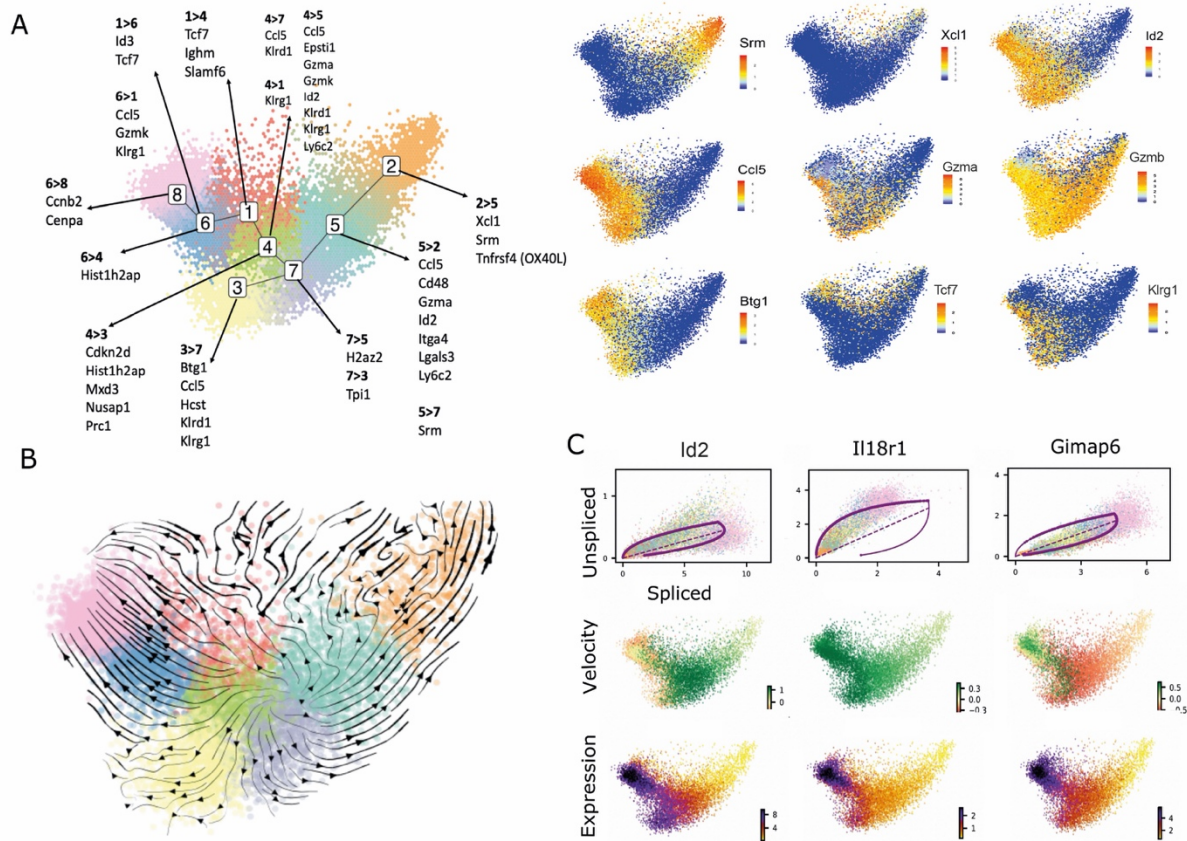


Figure S3: Trajectory dynamics and selected-genes expression along the trajectory, Related to Figure 2 and Table S1 and S2. (A) Left panel: Differential expression analysis between two clusters of cells in the same phase of the cell cycle along the TinGa trajectory. Only the genes that are shared between the phases of the cycle were kept. The genes over-represented in paired neighbour-cluster comparative analyses are listed. Right panel: expression of some representative genes was highlighted on the TinGa trajectory. (B) Velocities were calculated using the top 50 genes best fitting the dynamical model. (C) Illustration of the genetic dynamics of 3 immune function-related genes. Top row: scVelo’s dynamical model fitting on the spliced and unspliced counts. Middle row: velocity vectors obtained for each cell on a single gene, positive (green) values indicate cells moving towards regions of higher expression, negative (red) values indicate cells moving towards lower expression. Bottom row: First moment (‘Ms’ matrix) of expression levels (spliced counts) for each cell across its nearest neighbours (local mean) for the indicated gene.

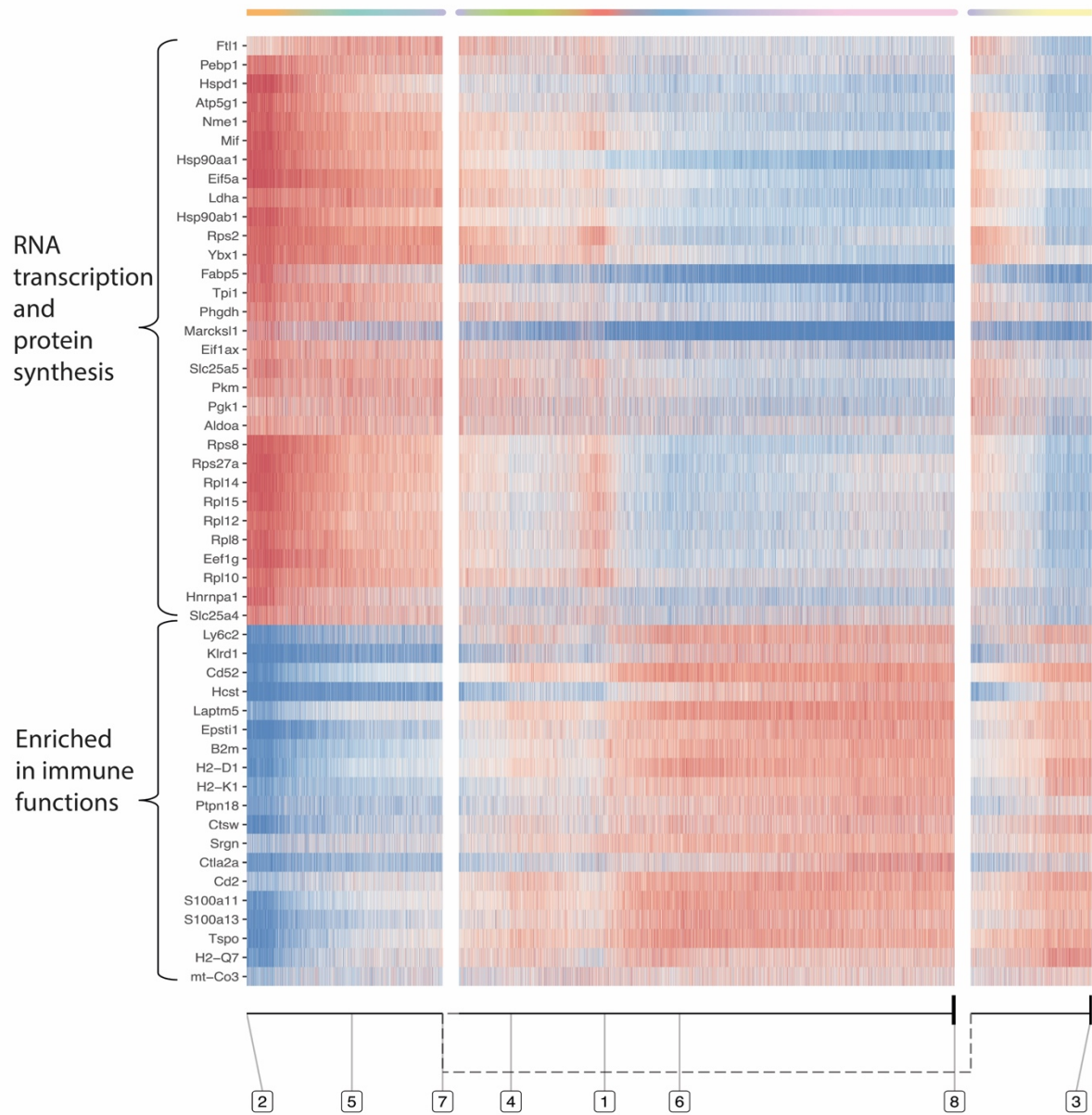


Figure S4: Ybx1 gene module heatmap along TinGa’s trajectory represented as explained in the legend to Figure S1, Related to Figure 3. Two different groups of genes can be identified. Genes at the top of the heatmap are enriched at the beginning of the trajectory and are involved in RNA and protein synthesis. Genes at the bottom of the heatmap are expressed at the end of the trajectory (in clusters 6 and 8) and code for immune receptors.

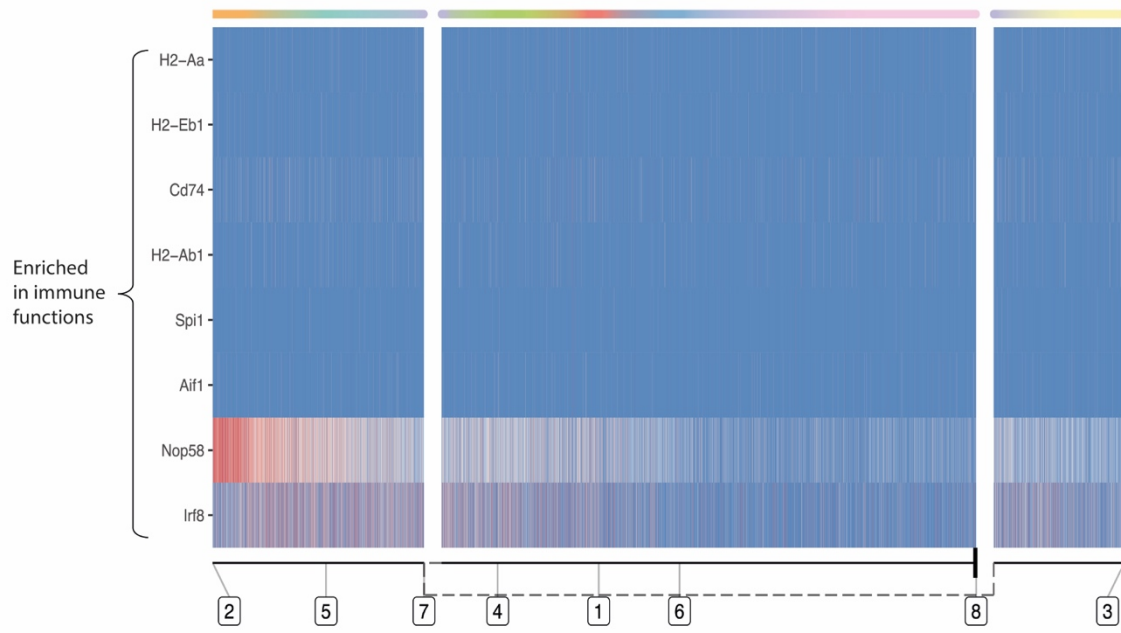


Figure S5: Spi1 gene module heatmap along TinGa's trajectory represented as explained in the legend to Figure S1, Related to Figure 3.

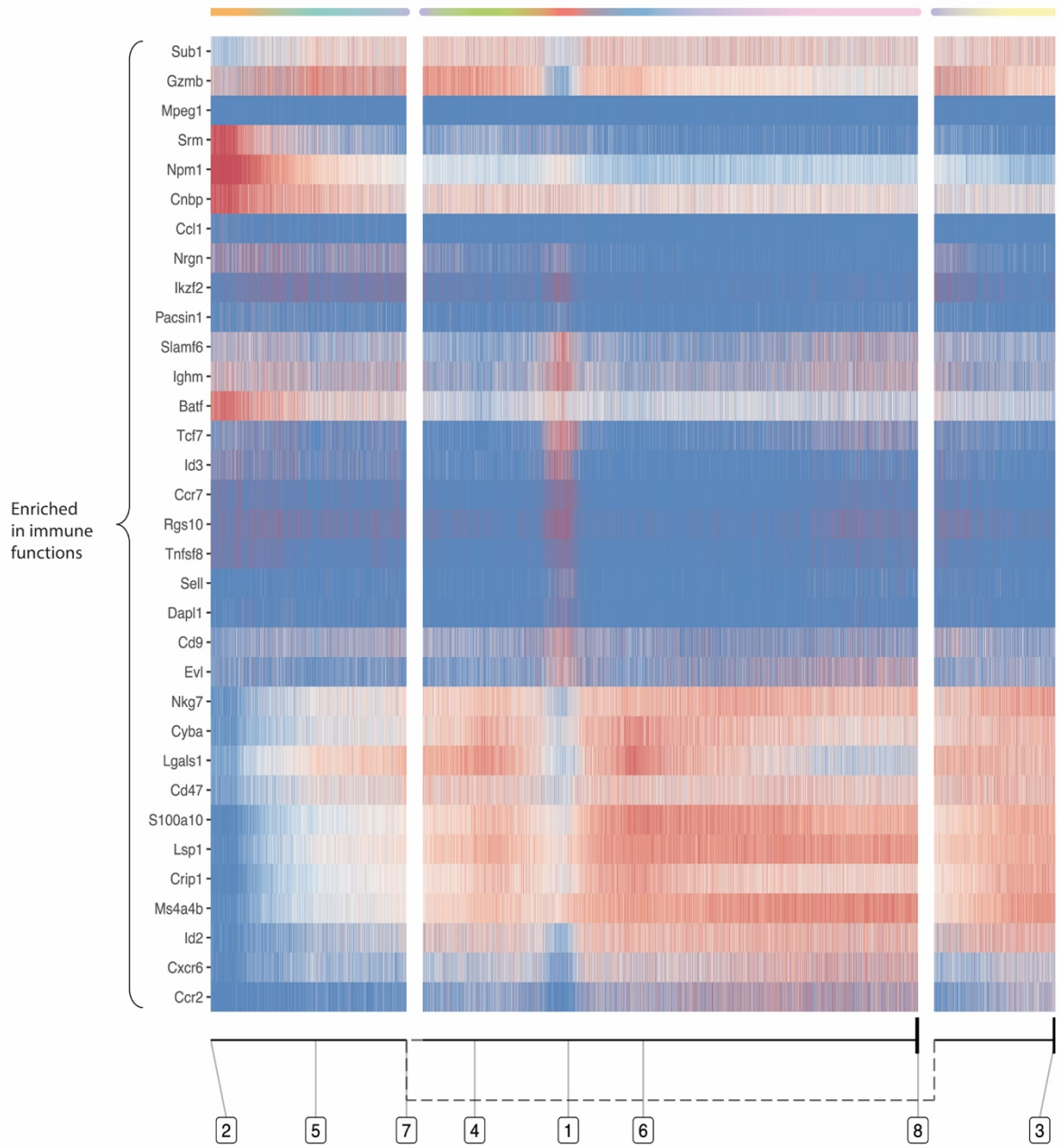


Figure S6: Tcf7/Id2/Phb2 gene module heatmap along TinGa's trajectory represented as explained in the legend to Figure S1, Related to Figure 3.

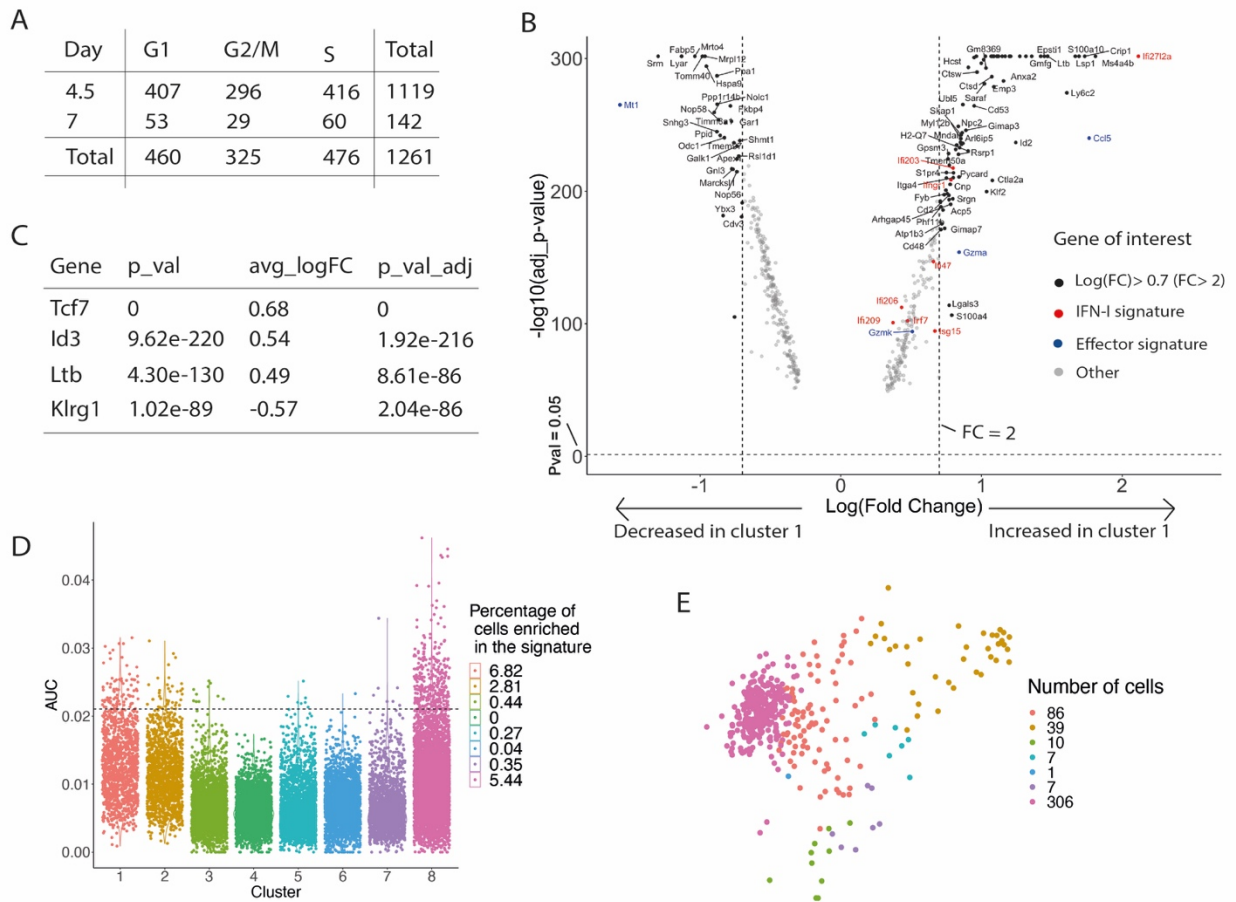


Figure S7: Analysis of the memory precursor potential of cells, Related to Figure 4 and Table S3. (A) The cell-cycle distribution of cluster-1-cells and their sampling time. (B) Volcano plot of the genes that were differentially expressed between cluster 1 and cluster 2. The genes that showed a fold-change < -2 or > 2 are represented by black dots. The genes associated with a type 1 IFN signature are colored in red and the genes that are associated with an effector signature are colored in blue. (C) Four genes were differentially expressed in cluster 1 compared to the rest of the cells. The p-values, averaged log fold-changes and the adjusted p-values are reported in this table. Positive values of averaged log fold-changes indicate that the feature is highly expressed in the cluster 1. (D) Tpcm signature (Pais Ferreira, et al. 2020) enrichment in each cluster along TinGa's trajectory. The percentage of cells enriched in the signature in each cluster is indicated. AUC: area under the curve. (E) The cells enriched in the Tpcm signature were represented on the TinGa map and colored according to their cluster of origin. The number of cells in each cluster is indicated.

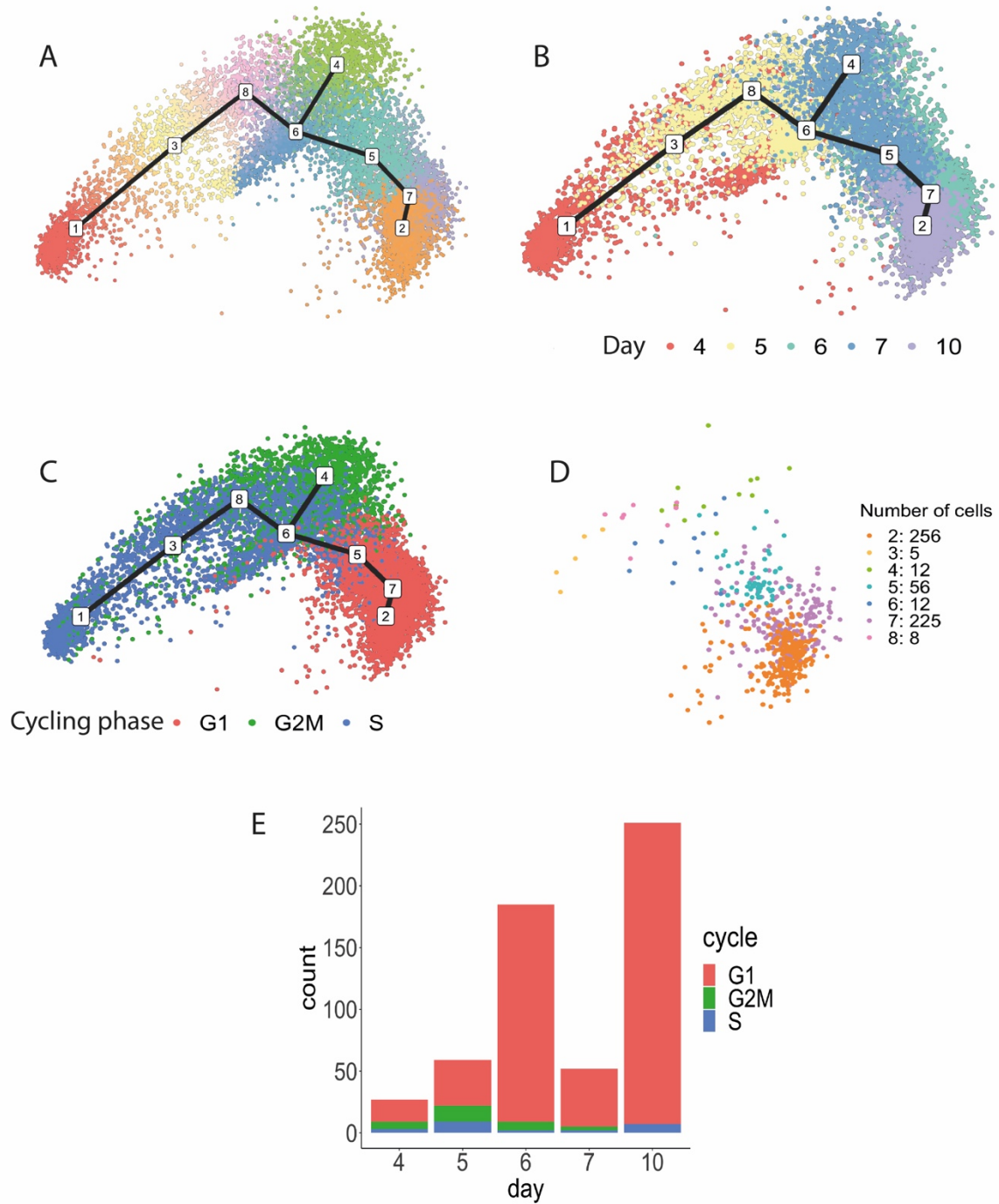


Figure S8: TinGa trajectory inference and memory precursors enrichment on Kurd et al.'s dataset, Related to Figure 4 and Table S3. (A) The TinGa algorithm applied on the Kurd et al., dataset identifies a branching trajectory. (B) All cells were colored according to their sampling day (4, 5, 6, 7 and 10 post LCMV-Armstrong infection) along the TinGa trajectory. (C) All cells along the TinGa trajectory were colored according to their cell cycle phase. (D) MP cells colored by clusters along the TinGa trajectory. The number of MP cells per cluster is given in the legend. (E) MP cell count for each sampling day and their cell cycle phase association.

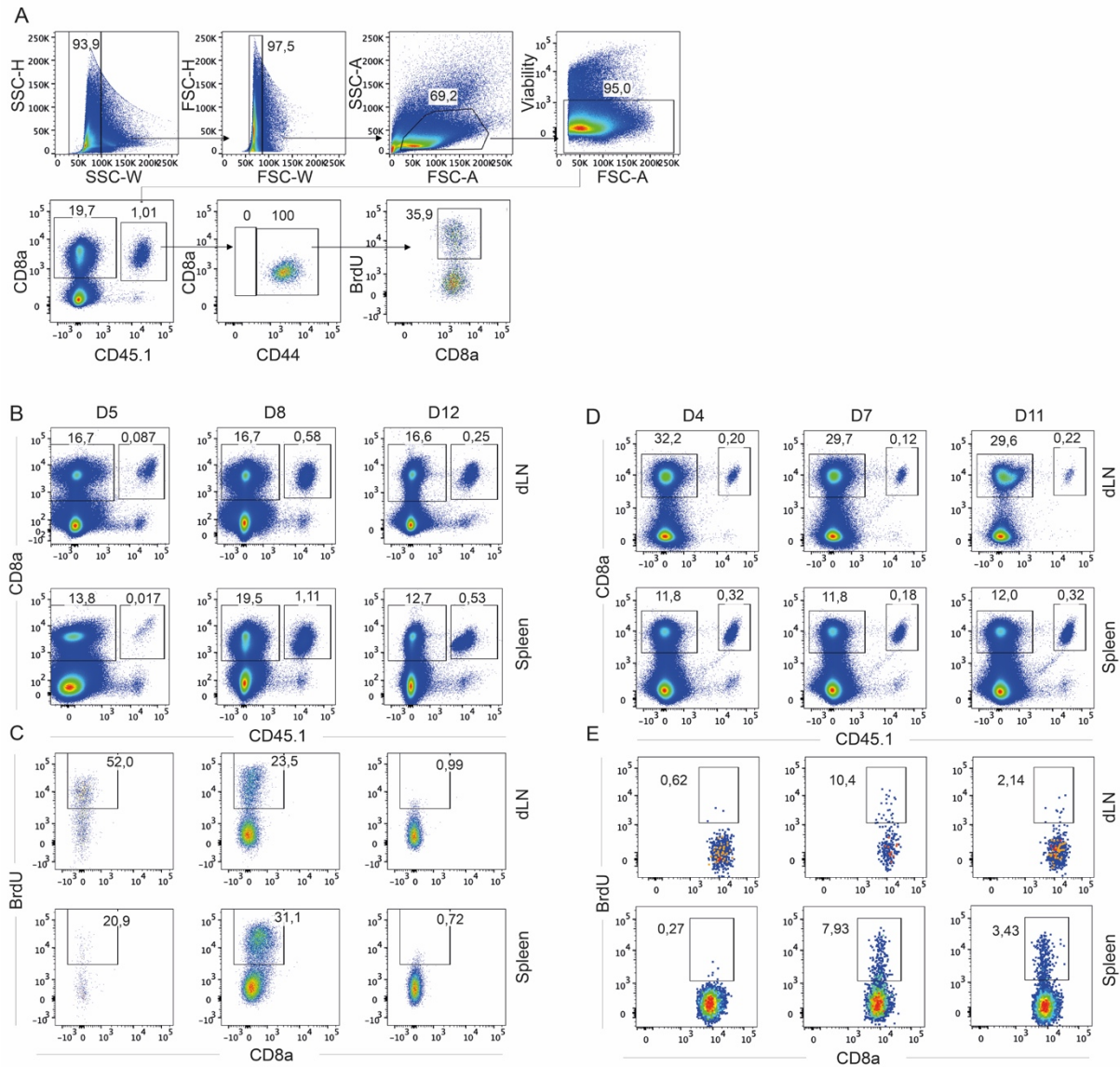


Figure S9: BrdU⁺ CD8 T cells analysis in pulse/ chase, Related to Figure 5. (A) Gating strategy for the identification of F5 CD44⁺ BrdU⁺ cells. (B-E) FACS plots showing the fraction of endogenous (CD8⁺ CD45.1⁻) and F5 (CD8⁺ CD45.1⁺) T cells (B-D) and of BrdU⁺ CD44⁺ CD8 T cells (C-E) determined in pulse (B-C) or in chase (D-E) in the indicated organs. Data are representative of 3 independent experiments.

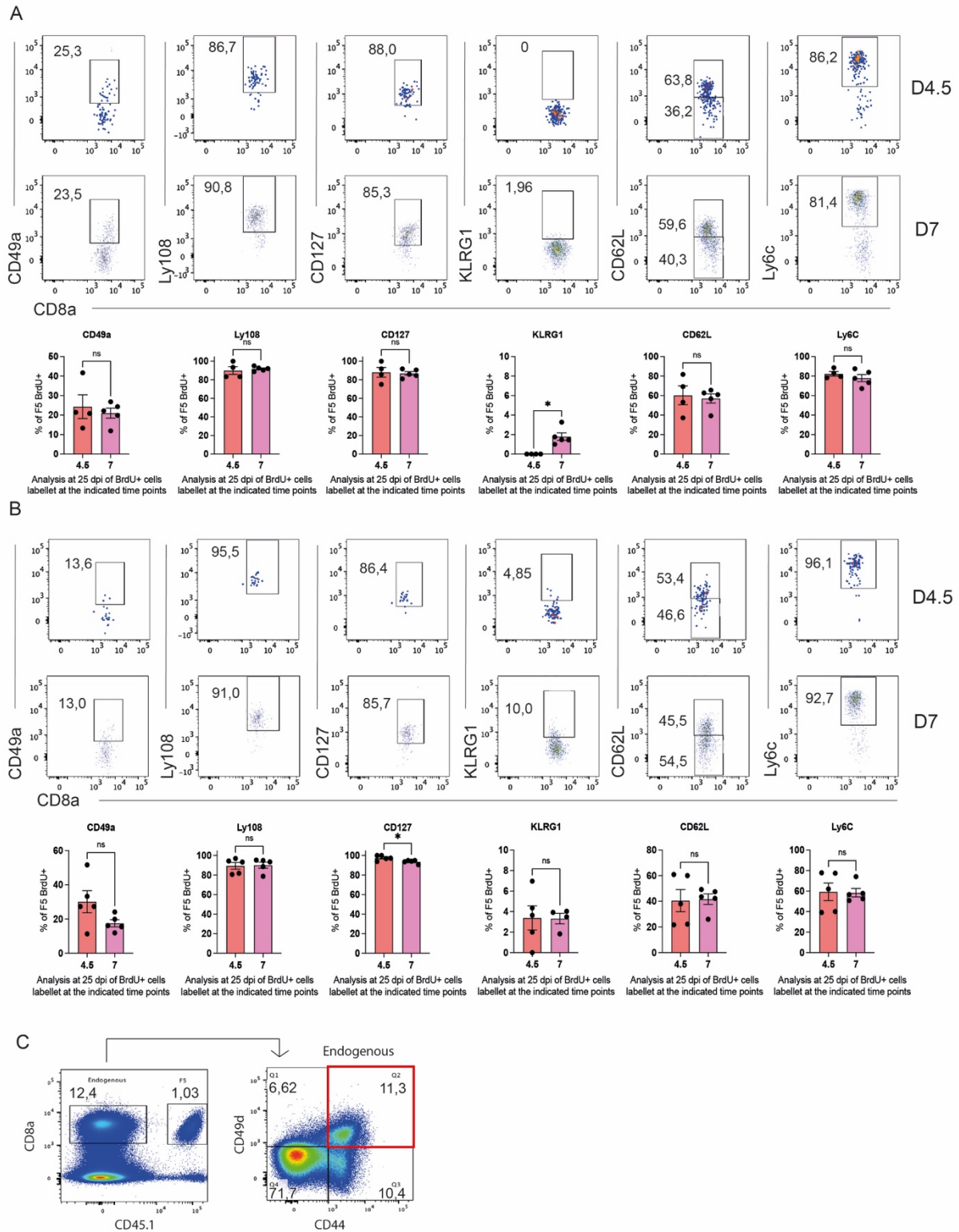


Figure S10: Phenotype of BrdU positive F5 memory cells generated on day 4 or 7, Related to Figure 6 and Table S4. (A-B Expression of the indicated markers by BrdU⁺ F5 memory cells labelled on day 4.5 and 7 with BrdU in dLN (A) and in spleen (B). (C) Gating strategy for the identification of antigen-specific endogenous memory CD8 T cells. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney test). Data are represented as mean \pm SD and are representative of 2 independent experiments.

2. Article 2 – Impact de l'IL-2 exogène sur la génération des précurseurs de la mémoire à des étapes précoces post-activation des LT CD8 *in vitro*

Pour la seconde partie de mes recherches, j'ai collaboré avec Shaoying Wang, une doctorante dans l'équipe. Ce travail a consisté à étudier l'impact de l'IL-2 exogène (IL-2ex) sur la différenciation des précurseurs de la mémoire à des étapes précoces post-activation. En effet, cette cytokine a un rôle essentiel pour l'acquisition des fonctions effectrices et sur le développement des cellules mémoires. Ainsi, S. Wang a mis au point un modèle *in vitro* dans lequel les LT CD8 naïfs ont été activés en présence de cellules dendritiques maturées avec du CpG et présentant le complexe CMH-I/peptide NP68-(366-374) aux LT avec ou sans ajout d'IL-2 exogène (IL-2ex). Les LT CD8 ont ainsi été analysés entre 3 et 5 jours après activation.

Les résultats ont montré que l'IL-2ex permettait l'augmentation de l'expression de CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2, d'EOMES ainsi que de Bcl2 et régulait à la baisse l'expression de TCF1. Le transfert des LT CD8 après 4 jours d'activation dans des souris infectées par le VV a montré, qu'elles soient supplémentées en IL-2 ou non, que les cellules avaient une capacité similaire à participer à une réponse immunitaire en cours et ont généré des LT mémoires avec un phénotype similaire. À l'inverse, transférées dans des hôtes naïfs, les LT CD8 activés en présence d'IL-2ex généraient une fréquence plus élevée de cellules mémoires qui présentaient des traits de mémoires fonctionnels accrus tels que l'expression d'intégrines ou la production de cytokines. Afin d'étudier les différences transcriptionnelles que l'IL-2ex pourrait médier au cours de l'activation *in vitro*, nous avons réalisé un scRNA-seq sur les LT CD8 activés après 3, 4 et 5 jours *in vitro*. Les analyses bio-informatiques ont montré que les programmes transcriptionnels des LT CD8 supplémentés ou non avec de l'IL-2 divergeaient à partir de 4 jours après activation. À partir de 4 jours d'activation, les cellules cultivées sans IL-2ex acquéraient rapidement une signature précurseur de la mémoire, alors qu'en présence d'IL-2, elles adoptaient principalement une signature de LT effecteurs. Ainsi, dans l'ensemble, notre étude a montré que l'IL-2ex retardait la transition précoce des LT CD8 activés en cellules précurseurs de la mémoire leur permettant d'acquérir des fonctions effectrices qui sont « imprimées » dans les cellules mémoires qu'elles génèrent.

Exogenous IL-2 delays the generation of memory precursor cells and is essential for the generation of memory cells with increased effector functions

Shaoying Wang^{1,2}, Margaux Prioux^{1,5}, Simon de Bernard³, Maxence Dubois¹, Daphne Laubretton¹, Sophia Djebali¹, Christophe Arpin¹, Camille Fourneaux⁵, Olivier Gandrillon^{4,5}, Fabien Crauste⁶, Wenzheng Jiang², Jacqueline Marvel^{1*}

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, Lyon, France

² Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, Institute of Biomedical Sciences and School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai, China

³ AltraBio, Lyon, France

⁴ Inria, Villeurbanne, France

⁵ Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la cellule, Université de Lyon, ENS de Lyon, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, Lyon, France

⁶ Laboratoire MAP5 (UMR CNRS 8145), Université Paris Cité, Paris, France

* Correspondence: jacqueline.marvel@inserm.fr

Abstract

The encounter of naive CD8 T cells with antigen presenting cells triggers their activation, proliferation and differentiation up to the memory state. To evaluate the impact of exogenous IL-2 (ex-IL-2) on memory precursors differentiation, we have set-up an *in vitro* model of CD8 T cell activation. Our findings indicate that the initial cellular concentration of responding CD8 T cells determines their dependency on IL-2. Indeed, ex-IL-2 only impacts the number of activated CD8 T cells generated when they are seeded at a low concentration. However, in all culture conditions ex-IL-2 enhances the expression of CD25, EOMES and Bcl2. To assess the capacity of the *in vitro* activated CD8 T cells to participate in an ongoing effector response or to directly differentiate in memory cells we have transferred *in vitro* activated CD8 T cells in either virus infected or naive mice. When transferred in virus infected mice, whether IL-2

supplemented or not, activated CD8 cells showed a similar ability to participate in an ongoing immune response and they gave rise to memory cells with a similar phenotype. In contrast, when transferred in a naive host, CD8 T cells activated in the presence of ex-IL-2 generated a higher frequency of memory cells that displayed increased functional memory traits such as integrins expression or cytokines production. Finally, a single-cell transcriptomic analysis of *in vitro* activated CD8 T cells indicates that, in the absence of ex-IL-2, activated CD8 T cells rapidly acquire a memory precursor signature, while in its presence they mainly adopt an effector CD8 T cell signature. Overall, our study shows that ex-IL-2 delays the early transition of activated CD8 T cells into MP cells, allowing them to acquire effector functions that are imprinted in the memory cells they generate. These findings may help design optimal culture conditions for the generation of therapeutic CAR-T cells.

Key words: CD8 T cell, exogenous IL-2, memory precursors

Introduction

After antigen encounter during an acute infection, naive CD8 T cells are activated and differentiate into antigen-specific effector T cells that proliferate and eradicate the pathogen. The majority of effector cells then die by apoptosis, however, a small fraction survives and gives rise to long-lived memory cells able to mount a recall response (Williams and Bevan, 2007). Optimal activation of naive CD8 T cells requires 3 signals which are T cell antigen receptor (TCR) activation, co-stimulation signal and inflammatory cytokines (Williams and Bevan, 2007). Besides these signals, IL-2 has a central role in cellular proliferation, differentiation and survival of CD8 T cells (Kalia and Sarkar, 2018). IL-2 is a member of the common cytokine-receptor γ -chain (γ c) family and its receptor is formed by CD25 (IL-2R α), CD122 (IL-2R β) and CD132 (IL-2R γ) (Boyman and Sprent, 2012; Shourian et al., 2019). IL-2 signals through STAT5 and phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-AKT pathway (Boyman and Sprent, 2012; Crompton et al., 2014; Kalia and Sarkar, 2018). Dendritic cells (DCs) and CD4 T cells are essential for the proliferation and the generation of efficient memory CD8 T cells (Borst et al., 2018; Kalia and Sarkar, 2018).

The role of IL-2 in the activation of CD8 T cells and their differentiation in memory cells has been extensively studied (Feau et al., 2011; Kahan et al., 2022; Kalia et al., 2010; Krämer et al., 1994; Pipkin et al., 2010; Redeker et al., 2015; Williams et al., 2006). IL-2 is essential for the generation of functional memory CD8 T cells. Indeed, when CD25-KO CD8 T cells are activated *in vivo*, their primary response is similar to CD25-WT CD8 T cells as is the number of memory cells generated. However, the CD25-KO memory cells are non-functional and unable to mount

an effective recall response (Pipkin et al., 2010; Williams et al., 2006). IL-2 is produced by both CD4 and CD8 T cells. The role of CD8-derived IL-2 has been shown to be critical for CD8 differentiation, as IL-2 deficiency in CD8 T cells but not CD4 T cells impeded the generation of functional memory CD8 T cells (Feau et al., 2011). Similarly, enforced expression of IL-2 by CD8 T cells increased their expansion capacity to primary and secondary viral challenge (Redeker et al., 2015).

The essential role of CD8-derived IL-2, in the generation of memory CD8 T cells, has recently been confirmed by tracing the fate of IL-2-producing CD8 T cells *in vivo*. Indeed, over the course of an infection, not all CD8 T cells produce IL-2 and it was found that IL-2 producing-CD8 T cells are more prone to differentiate in memory cells (Kahan et al., 2022).

However, the role of IL-2 is ambivalent as too much IL-2 signaling seems to counteract the capacity of CD8 T cells to differentiate in memory cells (Kalia and Sarkar, 2018). Indeed, Kalia et al, using the CD25 expression level as an indicator of the IL-2 signaling strength received by CD8 T cells responding to a viral infection, have shown that CD25-high CD8 T cells tend to differentiate in terminal effector cells, while CD25-low cells give rise to memory cells (Kalia et al., 2010), indicating that a strong IL-2 stimulation drives CD8 T cells towards terminal effector differentiation. These results are in line with experiments showing that high IL-2 concentrations promote the expression of the effector molecules perforin and granzyme B (Pipkin et al., 2010).

The timing of exogenous IL-2 signaling could also impact CD8 T cell differentiation. Indeed, after DC immunization, *in vivo*, administration of IL-2-complexed with an anti-IL-2 antibody early (days 1-3) or late (days 4-6) after priming enhances memory cell formation or promotes CD8 T cell terminal effector cell differentiation respectively (Kim et al., 2016).

The number of responding cells is another parameter that can influence CD8 T cell differentiation. Particularly, CD8 T cells tend to differentiate into central memory cells (TCM) in adoptive transfer experiment when a high number of naive CD8 T cells is transferred (Badovinac et al., 2007; Marzo et al., 2005; Obar et al., 2008). Similarly, the generation of CD44⁺CD62L⁺ precursors of central memory cells (pTCM) is promoted when naive CD4 T cells are cultured at a high density (Polonsky et al., 2018).

T-cell-transfer-therapy such as CAR-T cells (chimeric antigen receptor–T cell) have been a remarkable achievement in anticancer immunotherapy. The generation of these cells from patient T cells requires their activation and expansion *ex-vivo*. This is usually done by activating cells in culture with anti-CD3, supplemented with IL-2 to support T cell expansion. The robust

proliferation and survival of therapeutic T cells *in vivo* are regarded as critical indicators of clinical response in patients with B-cell malignancies and solid tumors (Collinson-Pautz et al., 2019; Sengupta et al., 2018; Yeku et al., 2017). However, a significant fraction of patients relapses after immunotherapy or is refractory to the treatment. The quality of T cells that are transferred is one of the limiting factors that has been identified (Hinrichs et al., 2009). Experiments in preclinical models have shown that the degree of differentiation of CD8 T cells used to prepare the therapeutic T cells inversely correlated with the magnitude of tumor rejection (Gattinoni et al., 2005; Gattinoni et al., 2011; Hinrichs et al., 2009). The cytokines used to support *in vitro* T cell proliferation also influence the quality of T cells that are generated (Shourian et al., 2019). Hence, one of the potential improvements in the generation of therapeutic T cells is the definition of culture condition that will generate T that are efficient in killing tumor cells and that will persist as memory cells once transferred *in vivo*.

In these contexts, we have reexamined the impact of exogenous IL-2 (ex-IL-2) on the activation and the generation of memory precursor CD8 T cells *in vitro*. We show that the cellular concentration of responding CD8 T cells determines the dependency on ex-IL-2 for their optimal expansion. We assessed the capacity of these *in vitro* activated CD8 T cells to differentiate into memory cells either directly after adoptive transfer in naive recipients or following *in vivo* re-stimulation in virus infected mice. We found that ex-IL-2 promotes direct differentiation into memory of a larger fraction of activated CD8 T cells when transferred in naive mice. However, it does not change the differentiation into effector and memory cells in the viral environment. We characterized transcriptional changes occurring over the course of *in vitro* activation and performed single-cell RNA-seq. We found that the transcriptional program of CD8 T cells activated with or without ex-IL-2 was similar on day 3 and only started to diverge from day 4 onwards. Indeed, the majority of CD8 T cells activated in the absence ex-IL-2 acquires a quiescent-cell gene expression profile and a significant fraction adopted a gene expression signature associated with memory precursor cells. In contrast, cells activated with ex-IL-2 maintained a cycling-cell gene expression profile and acquired a gene expression signature associated with effector functions. Overall, these results indicate that ex-IL-2 delays the transition into memory precursors and is essential for the acquisition of effector function.

Results

Impact of exogenous IL-2 on the in vitro activation of CD8 T cells

To characterize the impact of exogenous IL-2 (ex-IL-2) on CD8 T cell priming, naive F5 CD8 T cells labelled with CTV were activated with NP68-loaded DCs in the presence or absence of ex-IL-2. We measured cell division and characterized the phenotype of CD8 T cells at different time points following activation. The strategy to gate divided CD8 T cells is described in Figure S1A. Ex-IL-2 had no impact on the number of divided cells recovered 4, 5 and 6 days after activation (Figure 1A). In agreement with these results, the number of performed divisions and the level of the Ki67 proliferation marker expression by divided CD8 T cells were similar in the presence or absence of ex-IL-2 (Figure 1B and 1C). Furthermore, ex-IL-2 had no impact on the increased CD8 T cell glucose uptake that follows activation (Figure S1B). Increasing the dosage of IL-2 from 11.5 ng/ml to 34.5 ng/ml using two different sources of IL-2 did not influence the number of divided CD8 T cells nor CD25 expression (Figure S1C). These results were not due to the usage of TCR transgenic CD8 T cells as similar results were obtained with non-transgenic polyclonal CD8 T cells from C57BL/6 mice following their activation with anti-CD3 and anti-CD28 beads (Figure S1D). CD8 T cells produce IL-2 following antigenic stimulation (Figure S1E), suggesting that, in our conditions, intrinsic IL-2 (int-IL-2) might be sufficient to sustain the initial CD8 T cells proliferation. From day 3 onwards, ex-IL-2 did however impact activated CD8 T cells as it was able to maintain an increased expression of CD25, EOMES and Bcl2 (Figure 1D and E) and the phosphorylation of AKT and STAT5 in activated CD8 T cells (Figure 1F). These findings suggested that although ex-IL-2 impacts the expression of transcription factors, and bcl2 and maintains the phosphorylation of AKT and STAT5, it does not affect the initial proliferation nor the number of activated CD8 T cells recovered after 4 days of activation.

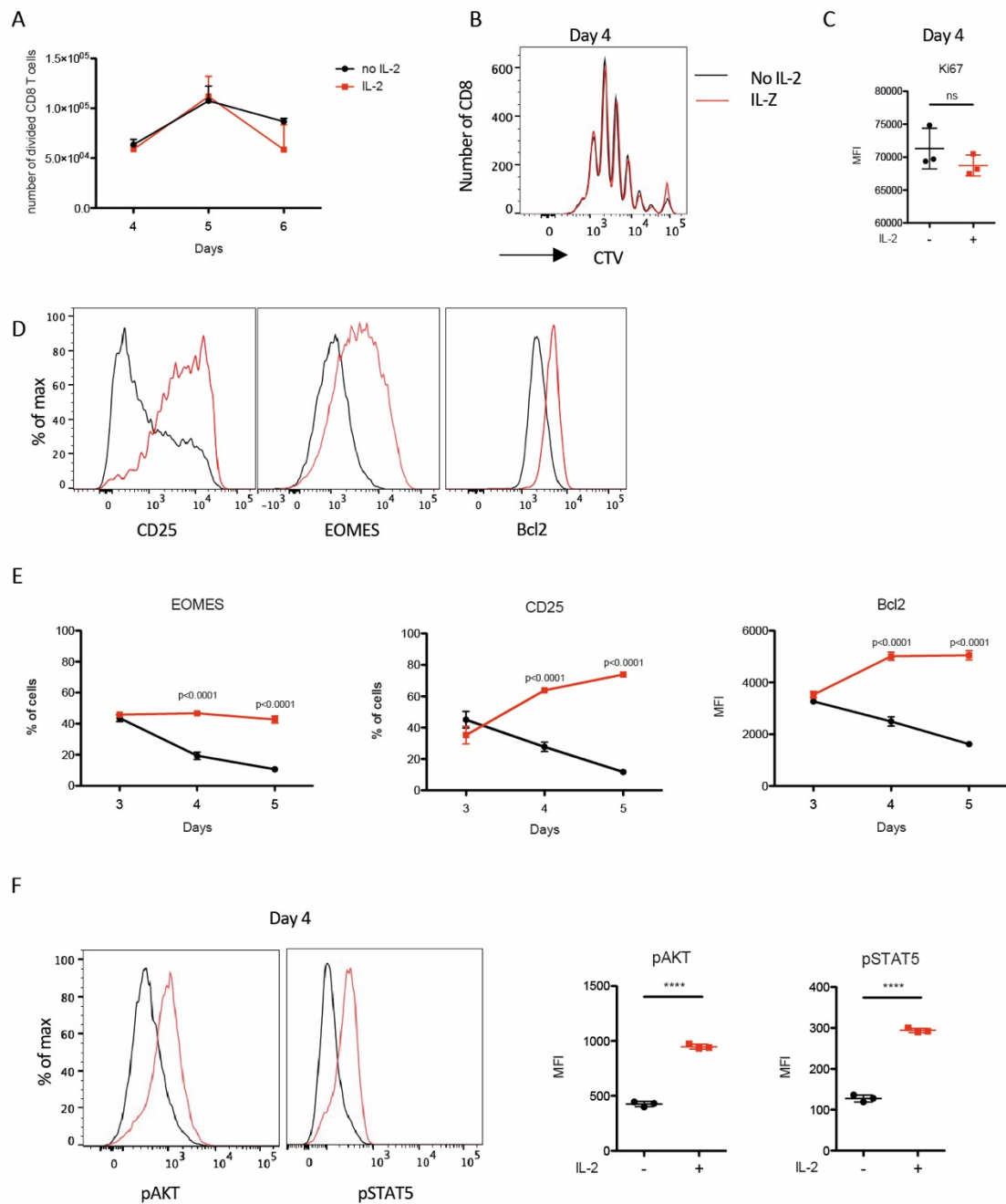


Figure 1. ex-IL-2 impacts the phenotype but not the proliferation of *in vitro* activated CD8 T cells.

1.5 × 10⁵ magnetically purified naive F5 CD8 T cells labelled with CTV were cultured with CpG-matured, peptide-loaded cDC at a ratio of cDC:CD8 = 1:10, in the presence or absence of ex-IL-2.

A. The number of divided CD8 T cells was determined on day 4, 5 and 6.

B. CD8 proliferation in the presence (red) or absence (black) of ex-IL-2 was analyzed after 4 days by CTV dilution and represented as overlay histogram.

C. Mean of fluorescence intensity (MFI) of Ki67 was measured on divided cells after 4 days. **D.** Expression of CD25, EOMES and Bcl2 by divided CD8 T cells was analyzed 4 days after activation. Representative histograms of cells cultured in the presence (red) or absence (black) of ex-IL-2 is shown (D).

E. Kinetics of the percentage of EOMES⁺ and CD25⁺ cells, as well as the level of Bcl-2 expression by divided CD8 T cells.

F. Expression of pAkt and pSTAT5 by divided CD8 T cells were analyzed 4 days after activation (right panel). Representative histograms of cells culture in the presence (red) or absence (black) of ex-IL-2 are shown (left panel).

The results are representative of 6 independent experiments. The statistical significance of differences was determined by the student t-test (****p<0.0001).

Impact of responding CD8 T cell concentration on the dependency of ex-IL-2

A number of studies showed that the local responding-T-cell density can modulate T cell differentiation (Badovinac et al., 2007; Marzo et al., 2005; Obar et al., 2008; Polonsky et al., 2018). Therefore, we investigated the impact of ex-IL-2 on the proliferation and differentiation of CD8 T cells activated at different cellular densities. The CD8 T cell concentration at the start of the culture was decreased by 3-fold and 10-fold while maintaining a DC/T ratio of 1/10. To compare the different culture conditions, we calculated the proliferation index per 100 cells. Decreasing the CD8 T cell density reduced the cell proliferation index in presence, as well as in the absence of ex-IL-2, indicating a degree of cellular cooperation independent of IL-2 (Figure 2A). However, ex-IL-2 was able to increase the number of divided CD8 T cells recovered 4 days after activation, in a cell density-dependent manner, low density-cultured cells being especially sensitive to ex-IL-2. To test if the decrease in the proliferation index was due to a decrease survival of cells when grown at low density, we performed the same experiment adding an excess (3×10^5) of C57BL/6J splenocytes to the culture. When grown at low density, a similar decrease in the CD8 T cell proliferation index was observed and ex-IL-2 was able to enhanced their proliferation (Figure S2A). This suggests that the ex-IL-2 dependency at low cell density was determined by the number of responding cells rather than the number of total cells in the environment. At lower cell densities, ex-IL-2 increased the number of cells in each division but dividing cells performed on average the same number of divisions (Figure 2B). However, the presence of non-transgenic splenocytes increased the number of divisions at all cell densities regardless of the addition of ex-IL-2 (Figure S2B). Interestingly, this was not due to an increase in the production of intrinsic IL-2 since the IL-2 concentration was lower in the presence of feeders (Figure S2C). The reduction of cell density or the addition of non-transgenic splenocytes did not influence the effect of ex-IL-2 on the expression of Bcl2 or CD25 (Figure 2C and S2D). In agreement with what has been observed for CD4 T cells (Polonsky et al., 2018), the expression of CD62L decreased as cell density decreased (Figure 2D).

In conclusion, the activation of CD8 T cells is highly dependent on cellular cooperation and the cellular density of responding cells in the culture influences the dependency on ex-IL-2.

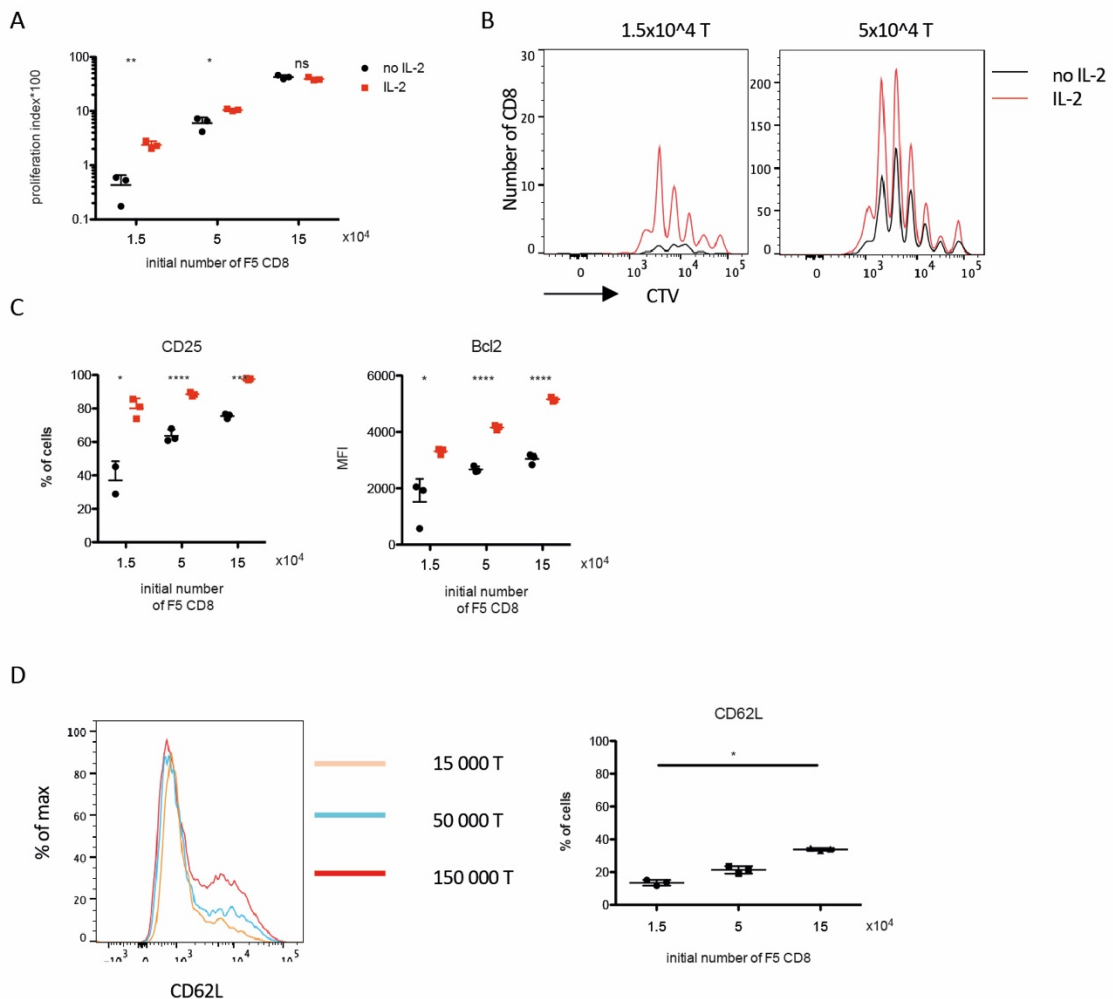


Figure 2. Lower CD8 cellular concentration strongly increases the dependency on ex-IL-2.

1.5x10⁵, 5x10⁴ or 1.5x10⁴ purified naive F5 CD8 T cells labelled with CTV were cultured with CpG-matured, peptide-loaded cDC at a ratio of cDC:CD8 = 1:10, in the presence or absence of ex-IL-2 for 4 days.

A. The number of divided cells was measured and the proliferation index was determined as [(the number of divided cells/ the initial number of CD8 T cells) *100].

B. CD8 proliferation in the presence (red) or absence (black) of ex-IL-2 was analyzed after 4 days by CTV dilution and represented as overlay histogram.

C. Expression of CD25 and Bcl2 by divided CD8 T cells was measured.

D. Expression of CD62L by CD8 T cells activated at different concentrations with ex-IL-2.

The results are expressed as the mean of triplicates ± SD and are representative of 3 independent experiments. The statistical significance of differences was determined by the student t-test in A, C and one-way ANOVA Friedman test in D (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Ability of in vitro activated CD8 T cells to differentiate into effector and memory cells in vivo

To evaluate the capacity of *in vitro* activated CD8 T cells to participate in the antiviral immune response and therefore, to differentiate into effector and memory cells, we sorted F5 CD8 T cells after 4 days of activation in the presence or absence of ex-IL-2 and transferred them into C57BL/6J mice challenged with vaccinia virus (VV) 4 days earlier (Figure 3A). On day 8 post-activation similar numbers of effector cells were recovered in the blood whether cells had been activated with or without ex-IL-2 (Figure 3B). Similarly, after 32 days, F5 CD8 T cells activated with or without ex-IL-2 gave rise to similar numbers of memory CD8 T cells (Figure 3C). This was even true when cells were cultured at low density, a condition where they depend more on ex-IL-2 (Figure 2). Next, we analyzed the phenotype of the memory cells generated. To be able to do this, we transferred higher numbers of *in vitro*-activated F5 cells. The presence of ex-IL-2 during priming did not influence the expression of CD62L, NKG2D or integrins essential for tissue migration such as CD29, CD49a and CD49d (Figure 3D). Moreover, memory cells predominantly adopted a CD27⁺ CD43⁻ phenotype, which was found to be associated with better recall responses (Hikono et al., 2007), following both priming conditions (Figure 3E). Finally, F5 memory cells restimulated with NP68 peptide produce similar levels of IFN- γ and CCL5 whether ex-IL-2 was added in the *in vitro* cultures or not.

In summary, these results indicate that cells activated with and without ex-IL-2 have a similar potential to participate in primary immune response and differentiate into memory cells.

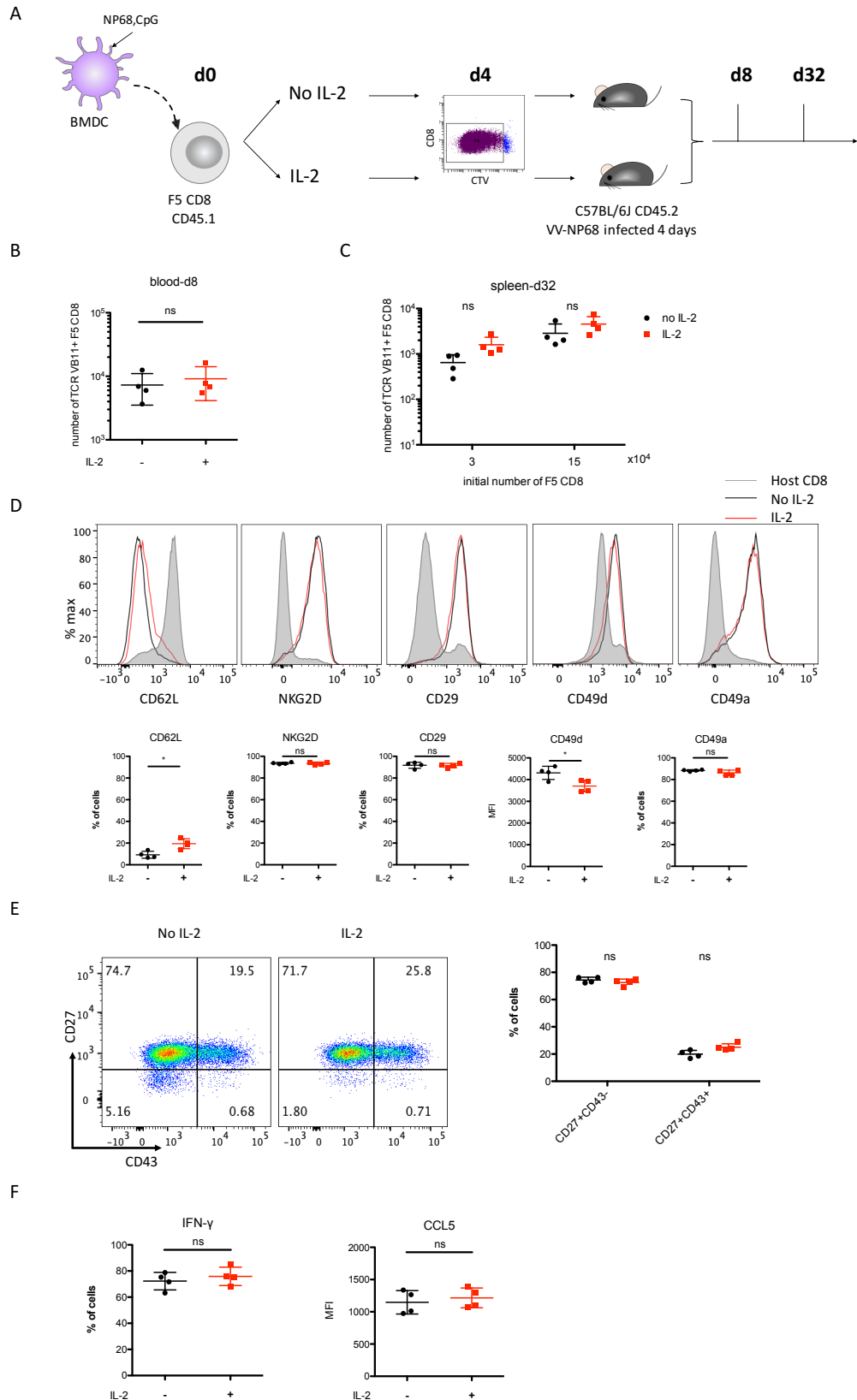


Figure 3. Cells activated with and without ex-IL-2 have a similar potential to participate in an ongoing immune response.

A-F. CTV-labelled purified naive F5 CD8 T cells, at a concentration of $1.8 \times 10^7/30\text{ml}$ (B; D-F) or $1.5 \times 10^5/250 \mu\text{l}$ or $3 \times 10^4/250 \mu\text{l}$ (C), were cultured with CpG-matured, peptide-loaded cDC at a ratio of cDC:CD8 = 1:10

for 4 days. Divided CD8 cells were sorted by flow cytometry and 1×10^6 (B; D-F) or 2×10^4 (C) cells were adoptively transferred into vaccine virus infected C57BL/6J mice (4 days post-infection).

A. Outline of the experimental scheme.

B-C. The number of TCR V β 11+ F5 CD8 T cell was determined in the blood on day 8 (B) and in the spleen on day 32 after activation (C).

D. The expression of CD62L, NKG2D, CD29, CD49d and CD49a was analyzed on TCR V β 11+ F5 CD8 T cells from spleen on day 32 and represented as histogram.

E. The expression of CD43 and CD27 was analyzed on TCR V β 11+ F5 CD8 T cells from spleen on day 32. Representative histograms and individual percentages of CD27+CD43- and CD27+CD43+ cells are depicted.

F. On day 32, 3×10^6 splenocytes were stimulated with NP68 (10nM) for 4 hours. The expression of IFN- γ and CCL5 by F5 CD8 T was analyzed by flow cytometry.

Results are representative of 4 independent experiments (n= 4 mice per group). The statistical significance of differences was determined by the student t-test (ns = $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$).

Ability of in vitro activated CD8 T cell to differentiate directly into memory cells in vivo

To further explore the impact of ex-IL-2 during the primary response on memory cells generation, we next adoptively transferred F5 CD8 T cells activated with and without ex-IL-2 for 4 days into naive C57BL/6J mice (Figure 4A). In this context, *in vitro* activated CD8 T cells are not further stimulated by infection associated inflammation or antigen, they only receive homeostatic survival signals. The number and phenotype of F5 CD8 T cells recovered from the spleen were analyzed 32 days post-activation. We found that the addition of ex-IL-2 during priming increased the number of F5 CD8 T cells whether initially activated at low or high density (Figure 4B). Cells activated with ex-IL-2 further differentiated into CD27+ CD43+ memory cells while they predominantly adopt a CD27+CD43- phenotype in the absence of ex-IL-2 during priming (Figure 3C). Furthermore, the presence of ex-IL-2 during priming resulted in higher expression of CD29, CD49a, CD49d and NKG2D (Figure 4D) but did not impact CD62L expression. Finally, cells activated with ex-IL-2 produced more IFN- γ and expressed higher level of CCL5 following NP68 restimulation (Figure 4E).

Overall, these results indicate that the presence of ex-IL-2 during priming in vitro promotes, after transfer in naive hosts, the generation of more memory CD8 T cells that displays increased memory traits.

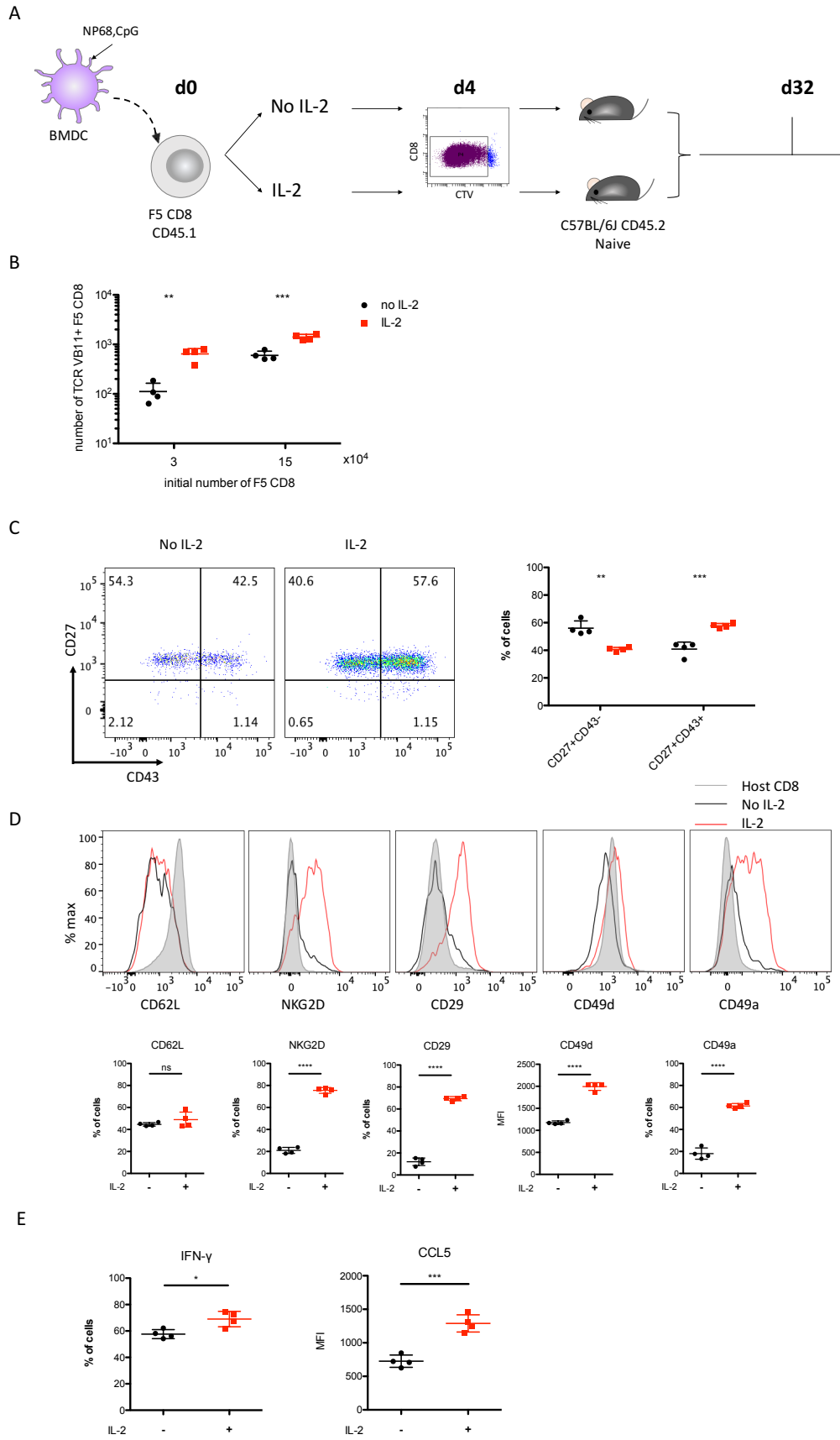


Figure 4. ex-IL-2 promotes direct in vivo memory differentiation of *in vitro* activated cells.

A-E. CTV-labelled purified naive F5 CD8 T cells at a concentration of $1.8 \times 10^7/30\text{ml}$ (C-E) or $1.5 \times 10^5/250 \mu\text{l}$ or $3 \times 10^4/250 \mu\text{l}$ (B) were cultured with CpG-matured, peptide-loaded cDC at a ratio of cDC:CD8 = 1:10 for 4 days. Divided CD8 cells were sorted by flow cytometry and 1×10^6 (C-E) or 2×10^4 (B) cells were adoptively transferred into naive C57BL/6J mice.

A. Outline of the experimental scheme.

B. The number of TCR V β 11+ F5 CD8 T cell was determined in the spleen on day 32 after activation.

C. The expression of CD43 and CD27 was analyzed on TCR V β 11+ F5 CD8 T cells from spleen on day 32. Representative histograms and individual percentages of CD27+CD43- and CD27+CD43+ cells are depicted.

D. The expression of CD62L, NKG2D, CD29, CD49d and CD49a was analyzed on TCR V β 11+ F5 CD8 T cells from spleen on day 32 and represented as histogram.

E. On day 32, 3×10^6 splenocytes were stimulated with NP68 (10 nM) for 4 hours. The expression of IFN- γ and CCL5 by F5 CD8 T was analyzed by flow cytometry.

Results are representative of 4 independent experiments ($n = 4$ mice per group). The statistical significance of differences was determined by the student t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Single-cell RNA-sequencing of in vitro activated CD8 T cell with or without ex-IL-2

To investigate the transcriptional differences and changes that IL-2 could mediate over the course of *in vitro* activation, we performed single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) on F5 CD8 T cells activated with or without ex-IL-2. Cells were collected 3, 4 or 5 days after activation and naive cells were sorted as control. UMAP and clustering analysis partitioned cells into 10 clusters (Figure 5A). Cells collected on day 3 whether grown with or without ex-IL-2 were partitioned in similar proportion between cluster 2 and 3, indicating a similar gene expression pattern. Interestingly, Cluster 2 was enriched in genes related to regulation of growth and apoptosis (Gadd45b, Ddit3) and were based on their gene expression associated with the G1 phase of the cell cycle. In contrast, cluster 3 expressed genes associated with early activation and differentiation (Srm, Ybx3), and cell cycle (Tuba4a, Pclaf, Top2a) and were likely in cycle (Figure S3A, B and C). The transcriptional programs of CD8 T cells activated with and without ex-IL-2 diverged from day 4 onwards with the majority of CD8 cells activated with ex-IL-2 accumulating in cluster 1 and 4, while cells activated without ex-IL-2 were mainly found in cluster 6 and 0 (Figure 5A and B). We observed that clusters 1 and 4 expressed genes associated with cell division (Top2a, Pclaf, Mki67) and were classified as in cycle (Figure S3A-C). Conversely, cells in cluster 0 completely downregulated these genes and were classified in G1 indicating that in absence of ex-IL-2 CD8 T cells acquired a quiescent state more rapidly. We next performed a gene set enrichment analysis (GSEA) using the memory precursors (MP) gene signature from Yao, et al. (Yao et al., 2019) and a terminal effector (TE) signature from Kanbar, et al. (Kanbar et al. 2022). The MP signature was expressed by a large fraction of the cells in cluster 0, approximately 40% of the cells (Figure 5C-D) while the effector signature

showed a strong enrichment in clusters 1, 3, 4, 6, 7 and 9 (Figure 5E-F). Cluster 3 and 6 contained a significant fraction of CD8 T cells activated in the absence of ex-IL-2 (Figure 5B) suggesting that a fraction of these cells develop effector functions. Our previous results suggested that following activation memory precursor cells could derive from bipotent cells that retain MP potential while developing effector functions (Todorov et al. 2022). In order to identify cells with such a profile, we searched for cells that expressed the combined MP and TE signatures. Cluster 1, 4 and 6 were enriched in cells expressing both signature with cluster 6 containing the largest fraction (about 70%) and cluster 1 and 4 containing a significant fraction with about 24% of positive cells in each cluster (Figure S3D-E). To further define the dynamics of cell differentiation between the different clusters, the RNA velocities of cells were determined by applying the scVelo algorithm and were projected onto the UMAP (Bergen et al. 2020). Globally, this analysis revealed two RNA trajectory dynamics with a first trajectory of differentiation starting from day 3 cells in cluster 2, passing through cluster 3 and leading to clusters 1 and 4 which contain cells activated in presence of ex-IL-2 (Figure S3F). The second trajectory of differentiation also started from cluster 2, passing through cluster 8 and finishing in cluster 0 that contained CD8 T cells activated without ex-IL-2 and was enriched in cells expressing the MP signature. The scVelo trajectory projection corresponds to the average RNA velocities of cells within a given location/cluster. To determine if cells activated with or without ex-IL-2 had the same dynamics along the trajectories, we projected their RNA velocity independently on the UMAP (Figure 5G-H). Interestingly, CD8 T cells activated in the absence of ex-IL-2 could follow two paths from day 3 onwards a small fraction became effector (clusters 3, 1 and 4) with some of them then moving towards MP cells while a larger fraction directly moved towards quiescent MP cells (cluster 0) (Figure 5G). Conversely, CD8 T cells activated in the presence of ex-IL-2 mainly followed an effector differentiation trajectory towards cluster 1 and 4 with a few cells in cluster 1, 4 and 6 being directed towards cluster 0 that is enriched in MP cells (Figure 5H).

In summary, in absence of ex-IL-2, CD8 T cells started acquiring quiescent memory precursor traits from 4 days in culture while in the presence of ex-IL-2 they strongly adopted an effector transcriptional program.

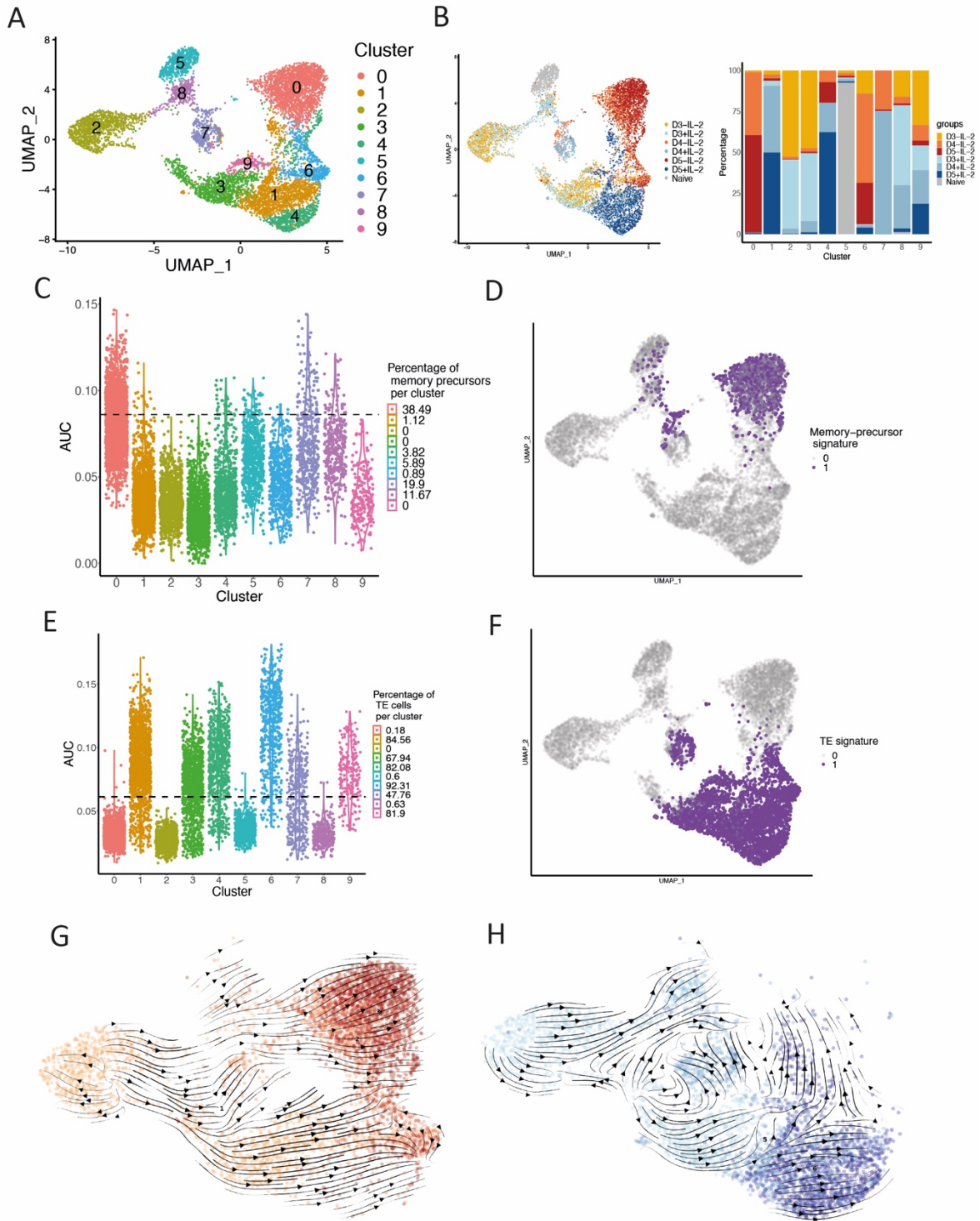


Figure 5. scRNA-seq shows that absence of ex-IL-2 during in vitro activation allows the development of cells with a memory precursor phenotype, while cells cultured with ex-IL-2 display effector traits.

A. UMAP projection of cells sorted on day 0, 3, 4 and 5 after activation with or without ex-IL-2 and colored according to cluster identification by Seurat cluster.

B. Left : UMAP projection of cells as in A colored according to the experimental time points and conditions of culture (+/- ex-IL-2). **Right :** Percentages of cells from each experimental conditions in each cluster.

C-E. Memory precursor (**C**) and terminal effector (TE) (**E**) signature enrichment per cluster. The dotted line represents the threshold above which, cells are considered as memory precursors. The legend indicates the percentage of memory precursor cells in each cluster. AUC: area under the curve.

D-F. The cells with a memory precursor (**D**) or a terminal effector (TE) (**F**) signature were represented on the UMAP.

G-H. RNA velocities are projected onto the UMAP of cells without exIL-2 (**G**) or with exIL-2 (**H**). Colors are the same as in **B**.

Discussion

IL-2 is regarded as a growth factor driving the proliferation and expansion of T cells (Cheng et al., 2002; Cousens et al., 1995; Smith, 1988). In this paper, we showed that exogenous IL-2 is dispensable for CD8 T proliferation, *in vitro*, when cells are cultured at a high density. Still increased expression of IL-2 target genes such as CD25 and Bcl-2 and sustained phosphorylation of STAT5 and AKT were observed when CD8 T cells were cultured in the presence of ex-IL-2, indicating a good degree of IL-2 responsiveness of the cells. Addition of ex-IL-2 was associated with a better CD8 expansion only when cells were cultured at low density. Interestingly, we observed a better differentiation toward a central memory phenotype when CD8 cells are cultured at higher density, similarly to what has been described for CD4 T cells (Polonsky et al., 2018).

Several studies have suggested that the initial encounter and stimulation by antigen is sufficient to drive the proliferation and the differentiation program leading to the generation of effector and memory CD8 T cells (Kaech and Ahmed, 2001; Kalia et al., 2006; Mercado et al., 2000; van Stipdonk et al., 2001; Williams and Bevan, 2007). Naive CD8 T cells that have been activated for a brief period could continue expand and differentiate in the absence of further stimulation in an autopilot process (van Stipdonk et al., 2001). Here, we showed that CD8 T cells activated in the absence of ex-IL-2 indeed proliferated *in vitro* to the same extent as cells activated with ex-IL-2, and this even when activated at low density. This is in agreement with previously published data showing that, *in vivo*, IL-2 knockout and IL-2R α knockout CD8 T cells performed the same number of divisions compared to wild-type CD8 T cells in a context of viral or tumoral immunization (D'Souza and Lefrancois, 2003). Moreover, F5 CD8 T cells activated in the absence or presence of ex-IL-2 were functional and able to participate to an ongoing immune response against vaccinia virus expressing NP68. Furthermore, they gave rise to memory CD8 T cells with identical phenotypes and function.

In contrast, when we allowed the *in vitro* activated CD8 T cells to differentiate directly in memory cells by transferring them in naive host, we found that only the memory cells derived from cells activated in the presence of ex-IL-2 expressed antigen-induced associated marker NKG2D and high levels of integrins important for cell homing to lung tissue, such as CD29, CD49a and CD49d (Grau et al., 2018). Memory cells generated from cells activated in the absence of ex-IL-2 did not develop these traits. According to CD27 and CD43 markers, Hikono et al., have described three populations of CD8 T cells and showed that these markers are superior to CD62L to predict the cell capacity to mount a recall response (Hikono et al., 2007). Among these 3 subsets, CD27+/CD43- are supposed to display the strongest recall capacity. While the presence of ex-IL-2 during priming activation had no influence on the differentiation of TCM, we showed that ex-IL-2 reduced the formation of CD27+/CD43- subsets but increased the differentiation of CD27+/CD43+ subsets. We also showed that ex-IL-2 increased the ability of CD8 memory cells to produce IFN- γ and CCL5. Notably, we recovered more cells following adoptive transfer into naive host when CD8 T cells were activated in the presence of ex-IL-2. This could be due to the increased Bcl-2 expression that is observed in the presence of ex-IL-2. Overall, these results indicate that the presence of ex-IL-2 during the *in vitro* activation did not negatively impact the capacity of CD8 T cells to differentiate in memory cells *in vivo*. This is in contrast to previously published work showing that IL-2 could inhibit this capacity, however the concentration of IL-2 used was at least 50-fold higher than the one used here (Pipkin et al., 2010).

To further characterize the impact of ex-IL-2 on CD8 T cells we performed single-cell transcriptomic analyses on CD8 T cells activated in the presence or absence of ex-IL-2. Our results indicate that in the absence of ex-IL-2, a large fraction of CD8 T cells have acquired a quiescent memory precursor gene expression signature without having acquired the expression of effector genes from day 4. This is in line with the phenotype of memory cells generated when these cells are transferred in naive mice. In contrast, when ex-IL-2 is added to *in vitro* cultures, CD8 T cells acquired an effector function transcriptional signature. Moreover, they displayed a superior capacity to directly differentiate in memory cells with increased memory traits.

Overall, *in vitro*, ex-IL-2 is redundant for the initial CD8 T cell expansion, but mainly supports the acquisition of effector functions without abrogating the memory differentiation potential of activated CD8 T cells.

Acknowledgment

We acknowledge the contribution of SFR BioSciences (UAR3444/CNRS, US8/Inserm, École Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon) and of the CELPHEDIA infrastructure (<http://www.celphedia.eu/>), especially the center AniRA in Lyon (AniRA-Cytométrie and AniRA-PBES facilities). We thank Matteo Bouvier for his help and advice on RNA velocity. This work was supported by INSERM, CNRS, Université de Lyon, ENS Lyon, région Auvergne-Rhône-Alpes (Ingerence pack ambition) and ANR (MEMOIRE ANR-18-CE45-0001). Shaoying Wang has a CSC China Research Council fellowship and Margaux Prieux has a région Auvergne-Rhône-Alpes PhD fellowship.

Declaration of interest

The authors declare no competing interests.

References

- Aibar, S., Gonzalez-Blas, C.B., Moerman, T., Huynh-Thu, V.A., Imrichova, H., Hulselmans, G., Rambow, F., Marine, J.C., Geurts, P., Aerts, J., et al. (2017). SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering. *Nat Methods* 14, 1083-1086. 10.1038/nmeth.4463.
- Badovinac, V.P., Haring, J.S., and Harty, J.T. (2007). Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection. *Immunity* 26, 827-841. 10.1016/j.immuni.2007.04.013.
- Borst, J., Ahrends, T., Babala, N., Melief, C.J.M., and Kastenmuller, W. (2018). CD4(+) T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 18, 635-647. 10.1038/s41577-018-0044-0.
- Boyman, O., and Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12, 180-190. 10.1038/nri3156.
- Cheng, L.E., Ohlen, C., Nelson, B.H., and Greenberg, P.D. (2002). Enhanced signaling through the IL-2 receptor in CD8+ T cells regulated by antigen recognition results in preferential proliferation and expansion of responding CD8+ T cells rather than promotion of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3001-3006. 10.1073/pnas.052676899.
- Collinson-Pautz, M.R., Chang, W.C., Lu, A., Khalil, M., Crisostomo, J.W., Lin, P.Y., Mahendravada, A., Shinnars, N.P., Brandt, M.E., Zhang, M., et al. (2019). Constitutively active MyD88/CD40 costimulation enhances expansion and efficacy of chimeric antigen receptor T cells targeting hematological malignancies. *Leukemia* 33, 2195-2207. 10.1038/s41375-019-0417-9.

- Cousens, L.P., Orange, J.S., and Biron, C.A. (1995). Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* 155, 5690-5699.
- Crompton, J.G., Sukumar, M., and Restifo, N.P. (2014). Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy. *Immunol Rev* 257, 264-276. 10.1111/imr.12135.
- D'Souza, W.N., and Lefrancois, L. (2003). IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol* 171, 5727-5735. 10.4049/jimmunol.171.11.5727.
- Bergen, Volker, Marius Lange, Stefan Peidli, F. Alexander Wolf, and Fabian J. Theis. 2020. "Generalizing RNA Velocity to Transient Cell States through Dynamical Modeling." *Nature Biotechnology* 38(12):1408–14. doi: 10.1038/s41587-020-0591-3.
- de Brito, Christelle, Martine Tomkowiak, Raffaella Ghittoni, Christophe Caux, Yann Leverrier, and Jacqueline Marvel. 2011. "CpG Promotes Cross-Presentation of Dead Cell-Associated Antigens by Pre-CD8 α ⁺ Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* 186(3):1503–11. doi: 10.4049/jimmunol.1001022.
- Di Tommaso, P., Chatzou, M., Floden, E.W., Barja, P.P., Palumbo, E., and Notredame, C. (2017). Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nat Biotechnol* 35, 316-319. 10.1038/nbt.3820.
- Feau, S., Arens, R., Togher, S., and Schoenberger, S.P. (2011). Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells. *Nat Immunol* 12, 908-913. 10.1038/ni.2079.
- Gattinoni, L., Klebanoff, C.A., Palmer, D.C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S.E., Theoret, M.R., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2005). Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 115, 1616-1626. 10.1172/JCI24480.
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., et al. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* 17, 1290-1297. 10.1038/nm.2446.
- Grau, M., Valsesia, S., Mafille, J., Djebali, S., Tomkowiak, M., Mathieu, A.L., Laubreton, D., de Bernard, S., Jouve, P.E., Ventre, E., et al. (2018). Antigen-Induced but Not Innate Memory CD8 T Cells Express NKG2D and Are Recruited to the Lung Parenchyma upon Viral Infection. *J Immunol* 200, 3635-3646. 10.4049/jimmunol.1701698.
- Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W.M., 3rd, Zheng, S., Butler, A., Lee, M.J., Wilk, A.J., Darby, C., Zager, M., et al. (2021). Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 184, 3573-3587 e3529. 10.1016/j.cell.2021.04.048.

- Hikono, H., Kohlmeier, J.E., Takamura, S., Wittmer, S.T., Roberts, A.D., and Woodland, D.L. (2007). Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 204, 1625-1636. 10.1084/jem.20070322.
- Hinrichs, C.S., Borman, Z.A., Cassard, L., Gattinoni, L., Spolski, R., Yu, Z., Sanchez-Perez, L., Muranski, P., Kern, S.J., Logun, C., et al. (2009). Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8⁺ T cells mediate superior antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17469-17474. 10.1073/pnas.0907448106.
- Jaitin, D.A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Elefant, N., Paul, F., Zaretsky, I., Mildner, A., Cohen, N., Jung, S., Tanay, A., and Amit, I. (2014). Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* 343, 776-779. 10.1126/science.1247651.
- Kaech, S.M., and Ahmed, R. (2001). Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nat Immunol* 2, 415-422. 10.1038/87720.
- Kahan, S.M., Bakshi, R.K., Ingram, J.T., Hendrickson, R.C., Lefkowitz, E.J., Crossman, D.K., Harrington, L.E., Weaver, C.T., and Zajac, A.J. (2022). Intrinsic IL-2 production by effector CD8 T cells affects IL-2 signaling and promotes fate decisions, stemness, and protection. *Sci Immunol* 7, eabl6322. 10.1126/sciimmunol.abl6322.
- Kalia, V., and Sarkar, S. (2018). Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2-A Balancing Act. *Front Immunol* 9, 2987. 10.3389/fimmu.2018.02987.
- Kalia, V., Sarkar, S., Gourley, T.S., Rouse, B.T., and Ahmed, R. (2006). Differentiation of memory B and T cells. *Curr Opin Immunol* 18, 255-264. 10.1016/j.coi.2006.03.020.
- Kalia, V., Sarkar, S., Subramaniam, S., Haining, W.N., Smith, K.A., and Ahmed, R. (2010). Prolonged interleukin-2 α expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity* 32, 91-103. 10.1016/j.immuni.2009.11.010.
- Kanbar, J.N., Ma, S., Kim, E.S., Kurd, N.S., Tsai, M.S., Tysl, T., Widjaja, C.E., Limary, A.E., Yee, B., He, Z., Hao, Y., Fu, X.D., Yeo, G.W., Huang, W.J., Chang, J.T. (2022). The long noncoding RNA Malat1 regulates CD8⁺ T cell differentiation by mediating epigenetic repression. *J Exp Med* 219(6):e20211756. 10.1084/jem.20211756.
- Kim, M.T., Kurup, S.P., Starbeck-Miller, G.R., and Harty, J.T. (2016). Manipulating Memory CD8 T Cell Numbers by Timed Enhancement of IL-2 Signals. *J Immunol* 197, 1754-1761. 10.4049/jimmunol.1600641.

- Krämer, S., Mamalaki, C., Horak, I., Schimpl, A., Kioussis, D., and Hüng, T. (1994). Thymic selection and peptide-induced activation of T cell receptor-transgenic CD8 T cells in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* 24, 2317-2322. 10.1002/eji.1830241009.
- Marzo, A.L., Klonowski, K.D., Le Bon, A., Borrow, P., Tough, D.F., and Lefrancois, L. (2005). Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. *Nat Immunol* 6, 793-799. 10.1038/ni1227.
- McCarthy, D.J., Campbell, K.R., Lun, A.T., and Wills, Q.F. (2017). Scater: pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics* 33, 1179-1186. 10.1093/bioinformatics/btw777.
- Mercado, R., Vijh, S., Allen, S.E., Kerksiek, K., Pilip, I.M., and Pamer, E.G. (2000). Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* 165, 6833-6839. 10.4049/jimmunol.165.12.6833.
- Obar, J.J., Khanna, K.M., and Lefrancois, L. (2008). Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 28, 859-869. 10.1016/j.immuni.2008.04.010.
- Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. (2010). Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32, 79-90. 10.1016/j.immuni.2009.11.012.
- Polonsky, M., Rimer, J., Kern-Perets, A., Zaretsky, I., Miller, S., Bornstein, C., David, E., Kopelman, N.M., Stelzer, G., Porat, Z., et al. (2018). Induction of CD4 T cell memory by local cellular collectivity. *Science* 360. 10.1126/science.aaj1853.
- Redeker, A., Welten, S.P., Baert, M.R., Vloemans, S.A., Tiemessen, M.M., Staal, F.J., and Arens, R. (2015). The Quantity of Autocrine IL-2 Governs the Expansion Potential of CD8+ T Cells. *J Immunol* 195, 4792-4801. 10.4049/jimmunol.1501083.
- Saelens, W., Cannoodt, R., Todorov, H., and Saeys, Y. (2019). A comparison of single-cell trajectory inference methods. *Nat Biotechnol* 37, 547-554. 10.1038/s41587-019-0071-9.
- Sengupta, S., Katz, S.C., Sengupta, S., and Sampath, P. (2018). Glycogen synthase kinase 3 inhibition lowers PD-1 expression, promotes long-term survival and memory generation in antigen-specific CAR-T cells. *Cancer Lett* 433, 131-139. 10.1016/j.canlet.2018.06.035.
- Shourian, M., Beltra, J.C., Bourdin, B., and Decaluwe, H. (2019). Common gamma chain cytokines and CD8 T cells in cancer. *Semin Immunol* 42, 101307. 10.1016/j.smim.2019.101307.
- Smith, K.A. (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240, 1169-1176. 10.1126/science.3131876.

- Smith, T., Heger, A., and Sudbery, I. (2017). UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res* 27, 491-499. 10.1101/gr.209601.116.
- Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., 2nd, Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 352, 189-196. 10.1126/science.aad0501.
- Todorov, H., Cannoodt, R., Saelens, W., and Saeys, Y. (2020). TinGa: fast and flexible trajectory inference with Growing Neural Gas. *Bioinformatics* 36, i66-i74. 10.1093/bioinformatics/btaa463.
- van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E., and Schoenberger, S.P. (2001). Naïve CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2, 423-429. 10.1038/87730.
- Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25, 171-192. 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141548.
- Williams, M.A., Tyznik, A.J., and Bevan, M.J. (2006). Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 441, 890-893. 10.1038/nature04790.
- Yao, C., Sun, H.W., Lacey, N.E., Ji, Y., Moseman, E.A., Shih, H.Y., Heuston, E.F., Kirby, M., Anderson, S., Cheng, J., et al. (2019). Single-cell RNA-seq reveals TOX as a key regulator of CD8(+) T cell persistence in chronic infection. *Nat Immunol* 20, 890-901. 10.1038/s41590-019-0403-4.
- Yeku, O., Li, X., and Brentjens, R.J. (2017). Adoptive T-Cell Therapy for Solid Tumors. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 37, 193-204. 10.14694/EDBK_180328. 10.1200/EDBK_180328.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6J(CD45.2) mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). C57BL/10-Tg (Cd2-TcraF5, CD2-TcrbF5)1Kio/AnuApb mice were provided by Prof. D. Kioussis (National Institute of Medical Research, London, U.K.) and backcrossed on CD45.1 C57BL/6 background (Jubin et al., 2012) to obtain F5 TCR [B6/J-Tg (CD2-TcraF5, CD2-TcrbF5)1Kio/Jmar] transgenic mice. The F5 TCR recognizes the NP68 peptide from influenza A virus (ASNENMDAM) in the context of H2-Db. Mice were bred and housed under SPF conditions in our animal facility (AniRA-PBES, Lyon, France). All experiments were approved by our local ethics committee (CECCAPP, Lyon, France) and accreditations have been obtained from governmental agencies.

Virus and reagents

The recombinant vaccinia virus expressing the NP68 epitope (VV-NP68), was engineered from the Western Reserve strain by Dr. D.Y.-L. Teoh, in Prof. Sir Andrew McMichael's laboratory at the Medical Research Council (Human Immunology Unit, Institute of Molecular Medicine, Oxford, U.K.).

Murine rIL-2 produced using the myeloma clone X63-Ag8.653 cell lines transfected with the mouse IL-2 gene kind gift from Dr F. Melchers, Basel Institute of Immunology, Basel, Switzerland).

Complete RPMI and DMEM mediums consist of DMEM or RPMI medium (Life Technologies) supplemented with 10% FCS, 10 mM HEPES, 50 mg/ml gentamicin, 2 mM L-glutamine (Life Technologies).

Bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) cultures

Mice were sacrificed by cervical dislocation and bone marrow progenitors were washed out from bones (femurs and tibias). 2×10^6 cells /ml were incubated in complete RPMI medium with 100 ng/ml Flt-3L (Amgen) in 6 well-plates as described in de Brito et al, (de Brito et al. 2011). After 7 days, NP68 peptide (20 nM) with or without CpG 1826 (2 μ g/ml, InvivoGen) was added and cells were cultured overnight. The fraction of cDC (CD11c+, B220+) was measured by flow cytometry and was always > 65%.

In vitro stimulation

CD44- naive F5 CD8 T cells CD8 T cells were magnetically isolated from splenocytes of F5 TCR transgenic mice by negative selection using a specific CD8a+ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, # 130-104-075) and autoMACS[®] Pro Separator, according to the manufacturer instructions. Anti-CD44-Biotine antibody (IM7.8.1, 1ul/ 1.5×10^8 cells) was added to the cocktail of biotin-conjugated monoclonal antibodies. Naive CD8 T cells purity was analysed on FACS LSR Fortessa 4L and was always > 97%.

Purified CD8 T cells were stained with CTV (2,5 mM, Thermofisher) according to manufacturer's instruction. 1.5×10^4 to 1.5×10^5 CTV labelled-naive CD8 T cells were cultured in 250 μ L complete DMEM medium with respectively 1.5×10^3 to 1.5×10^4 NP68-loaded matured BMDCs (ratio DC:CD8 = 1:10) for up to 6 days at 37°C in 96 well plate-U bottom plates, in the presence or absence of 5% murine rIL-2 supernatant (corresponding to a final concentration of 11.5 ng/mL). In some experiment, 3×10^5 C57BL/6J splenocytes were added or recombinant IL-2 (Miltenyi Biotec) was used.

For some adoptive transfer experiment, 1.8×10^7 CTV labelled-F5 were activated with 1.8×10^6 NP68-loaded matured BMDCs in the presence or absence of 5% murine rIL-2 supernatant, in 30 ml in complete DMEM medium T25 flasks for 4 days.

Naive CD8 T cells (CD44 negative) were isolated from C57BL/6J spleen and stained with CTV as described above. 1.5×10^5 CTV labelled-naive CD8 T cells were cultured in 250 μ L complete DMEM medium with anti-CD3/CD28 coated beads at a 1 bead: 4 CD8 T cell ratio for 4 days, at 37°C in 96 well plate-U bottom plates, in the presence or absence of 5% supernatant containing IL-2.

In vivo Memory CD8 T cell generation and Restimulation

Purified naive CD8 T cells were activated in vitro for 4 days. The divided cells 4-days CD8 were sorted by flow cytometry (FACS Aria I, BD biosciences) according to their CD44 expression and CTV dilution (see figure S1A). Purity after sorting was >98%. 1×10^6 or 2×10^4 sorted cells were adoptively transferred by intravenous injection (i.v.) in VV-NP68 infected mice or uninfected mice. For immunization, mice were first anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of Ketamine (1.5 mg)/ Xylazine (0.3 mg) in 150 μ L PBS (Phosphate Buffer Saline) and then the VV-NP68 (2×10^5 PFU) was intranasally (i.n.) administrated in 20 μ L of PBS. Blood was collected after 4 days. After 28 days, mice were sacrificed by cervical dislocation. Spleen was harvested, mechanically disrupted, and filtered through a sterile 100-mm nylon mesh filter (BD Biosciences). Single cell suspensions were then stained for flow cytometry analysis.

For cytokine production that was detected by flow cytometry, 3×10^6 splenocytes were incubated with 10 nM NP68 peptide for 4h at 37°C in the presence of GolgiStop™ (BD Biosciences), according to manufacturer's instructions.

Flow cytometry

In order to count cells, 100 μ L of Flow-count fluorospheres (Beckman Coulter) were added before staining steps. Cells were first stained with efluor780-coupled Fixable Viability Dye (Thermo Scientific) for 15 minutes at 4°C. Cells were then incubated with an Fc receptor blocking antibody (2.4G2 hybridoma supernatant) for 10 minutes at 4°C followed by surface staining for 30min at 4°C with the appropriate mixture of mAbs diluted in staining buffer (PBS supplemented with 1% FCS [Life Technologies] and 0.09% NaN₃ [Sigma-Aldrich]). For biotin-coupled antibody, streptavidin staining was performed for 10min at 4°C. In some experiments, cells were incubated in 100 μ L RPMI containing 100 μ M 2-NBDG (ThermoFisher) for 10 minutes at 37°C before staining, to analyze glucose uptake. Intracellular staining was performed using eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set kit

(Thermofisher) for the analysis of cytokines and transcription factors, or Lyse/Fix and PermIII buffers (BD Biosciences) for the analysis of phosphorylated proteins, according to manufacturer's instructions.

The following antibodies were used: CD8 (53.6.7), CD62L (MEL-14), CD45.1 (A20), CD45.2 (104), CD11b (M1/70), CD11c (HL3), CD19 (1D3), EOMES (Dan11mag), STAT5 (47/stat5(pY694)), AKT (55/PKBa/Akt), CD27 (LG.7F9), CD29 (eBioHMb1-1), CD49a (Ha31/8), CD49d (R1-2), NKG2D (CX5), TCR V β 11(RR3-15), IFN- γ (XMG1.2) from BD Biosciences and CD25 (PC61), CD44 (IM7.8.1), Bcl2 (BCL/10C4), CCL5 (2E9) from Biolegend.

All analyses were performed on a BD Biosciences FACS Fortessa and analyzed with FlowJo software 10.7.1 (Tree Star, Ashland, OR).

Cytokines production measurement (ELISA)

IFN- γ and IL-2 were measured on culture supernatants using IFN- γ or IL-2 ELISA MAXTM Standard Set mouse kit (Biolegend), according to manufacturer instructions.

Single cell sorting and RNA sequencing

The scRNA-seq library was generated using Chromium Next GEM Single Cell 3' reagent v.3.1 with feature barcode technology (10x Genomics) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 5×10^4 naive F5 CD8 T cells were activated *in vitro* for 3, 4 and 5 days in the presence or absence of 5% IL-2. Cells of each experimental conditions were barcoded with hashtag oligonucleotides (HTO) antibodies (**TotalSeqTM-B – Biolegend**), were FACS-sorted on an FACS Aria I (BD biosciences) and used to generate single-cell gel beads-in-emulsion (GEM). After reverse transcription, gel-beads in emulsion were disrupted, amplified by PCR and cDNA molecules were size-selected for separate 3' gene expression and cell surface protein (HTO) library construction. On one hand, the gene expression library was fragmented, end repaired and sample indexes were added by PCR. On the other hand, sample indexes were added by PCR for the HTO library. The purified libraries were pooled at a ratio of 1 HTO library for 4 3'-gene-expression library and sequenced on a HiSeq X (Illumina) with 1% of PhiX.

Single cell RNA-seq preprocessing

Quality control of raw data was performed using FastQC. The TSO, poly-A sequences and low-quality bases were trimmed using cutadapt. Transcript expression quantification was performed using the alevin-fry pipeline and version M31 of GENCODE mouse genome and annotations. The gene/count matrix was generated with fishpond.

Cells with more than 7% mitochondrial counts were filtered-out. The HTO was demultiplexed using the Seurat pipeline and the RNA counts were normalized using the *sctransform* function (v2).

Single-cell RNA-seq analysis

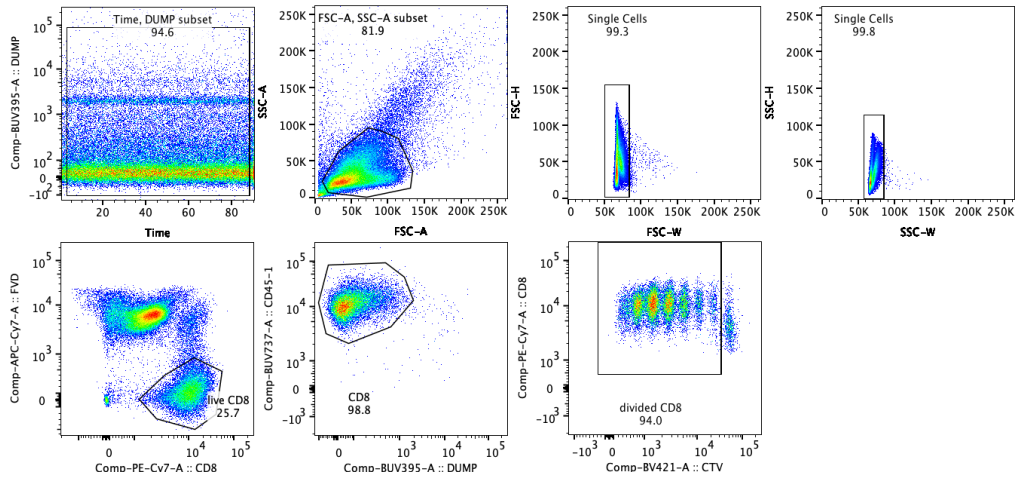
To cluster the cells, the principal component analysis dimensions were first selected and the Louvain algorithm include in the Seurat package was applied to the data. The clusters were projected onto the UMAP dimension reduction using the same principal component as input to the clustering analysis. Differential expression analysis was made using the Seurat function *FindAllMarkers*. Heatmap and dot plot were generated using the Seurat function *DoHeatmap* and *DotPlot* respectively. The Seurat R package was used to classify cells into G1, S or G2/M phases of the cell cycle. The classifier, relying on a list of genes from Tirosh et al. (Tirosh et al., 2016) contains markers of the G2/M and S phase. A score was attributed to each cell with a certain probability to belong to the S or G2/M phases. Cells expressing no S, G2/M markers are assigned to the G1 class. The AUCell R package (Aibar et al., 2017) was used in order to identify cells with active gene signature. The memory precursor signature was downloaded from Yao et al. paper (Yao *et al.*, 2019) and the T effector signature from Kanbar, et al. paper (Kanbar, et al., 2022). To infer RNA velocities and predict cell-specific trajectories, scVelo was used (Bergen et al., 2020). As described in Bergen et al. (2020), RNA velocity was estimated using the scVelo dynamical pipeline.

Statistical analysis

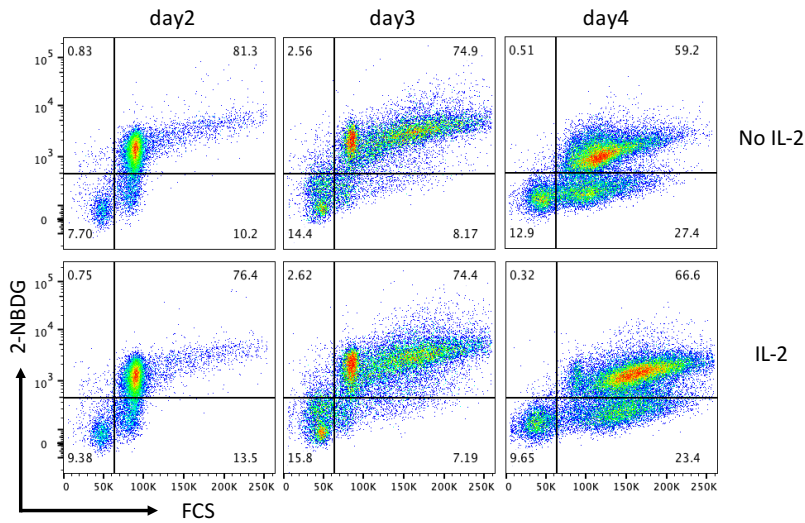
Statistical analyses were performed using Graph-pad software Prism 5. Two tailed unpaired t-test and one-way ANOVA Friedman test were used as indicated in the figure legend.

Supplementary figures

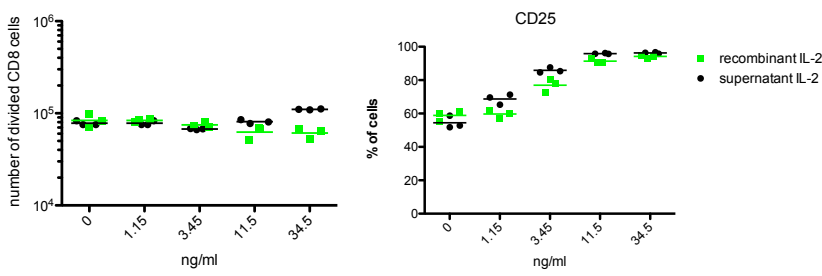
A



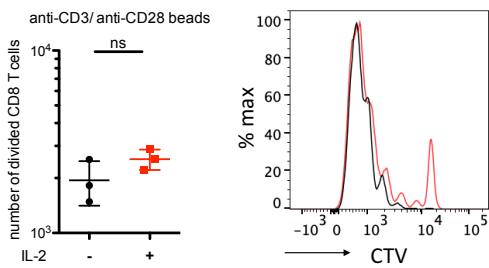
B



C



D



E

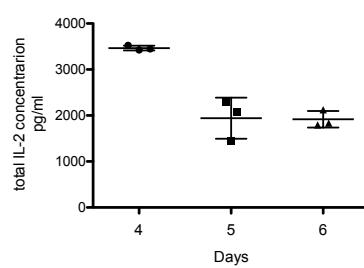


Figure S1. Extended data for figure 1.

A-B. 1.5×10^5 magnetically purified naive F5 CD8 T cells labelled with CTV were cultured with CpG-matured, peptide-loaded cDC at a ratio of cDC:CD8 = 1:10, in the presence or absence of ex-IL-2.

A. Gating strategy of divided CD8 T cells was shown.

B. 2-NBDG (glucose uptake indicator) was analyzed on divided CD8. Representative dot plots are shown.

C. 1.5×10^5 magnetically purified naive F5 CD8 T cells labelled with CTV were cultured with CpG-matured, peptide-loaded cDC at a ratio of cDC:CD8 = 1:10, in the presence of various concentrations of supernatant-containing-IL-2 or recombinant-IL-2 for 4 days. Equivalent concentrations of supernatant IL-2 and recombinant IL-2 were used (0.5, 1.5, 5 or 15% equivalent to 1.15, 3.45, 11.5 and 34.5ng/ml respectively). The number of divided CD8 T cells (left panel) and CD25 expression by divided CD8 T cells (right panel) are shown.

The results are expressed as the mean of triplicates \pm SD from one experiment.

D. 1.5×10^5 magnetically purified naive C57BL/6J CD8 T cells labelled with CTV were cultured with anti-CD3/CD28 coated beads at a ratio of beads:CD8 = 1:4, in the presence or absence of ex-IL-2 for 4 days. The number of divided CD8 T cells (left panel) and CTV dilution in the presence (red) or absence (black) of ex-IL-2 are shown. CTV fluorescent intensity of the overlay between CD8 T cells activated with and without 5% supernatant IL-2 (right). The results are expressed as the mean of triplicates \pm SD and are representative of 3 independent experiments.

E. Secretion of IL-2 by CD8 T cells activated in the absence of ex-IL-2 as described in A-B was measured by ELISA in the culture supernatant at the indicated days. The results are expressed as the mean triplicates \pm SD and are representative of 3 independent experiments.

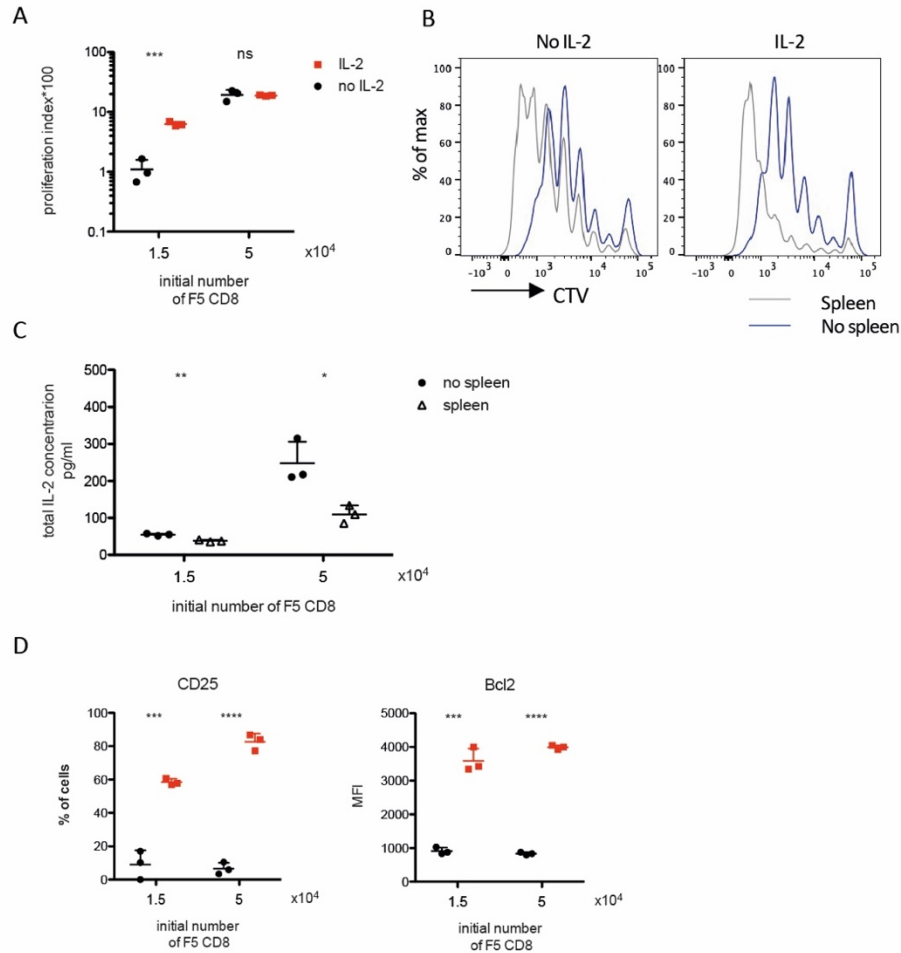


Figure S2. Extended data for figure 2.

5×10^4 or 1.5×10^4 magnetically purified naive F5 CD8 T cells labelled with CTV were cultured with CpG-matured, peptide-loaded cDC at a ratio of DC:CD8 = 1:10, in the presence or absence of ex-IL-2 for 4 days. And 3×10^5 splenocytes from C57BL/6J mice were added to sustain cell viability.

A. The number of divided cells was measured on CD8 activated in the presence of C57BL/6J splenocytes and the proliferation index was determined as [(the number of divided cells/ the initial number of CD8 T cells) * 100].

B. CD8 proliferation was analyzed after 4 days by CTV dilution in the presence (grey) or absence (blue) of splenocytes and represented as overlay histograms.

C. Secretion of IL-2 by CD8 T cells activated in the absence of ex-IL-2 was measured by ELISA in supernatant after 4 days, in the presence (empty triangles) or absence (full circles) of splenocytes.

D. Expression of CD25 and Bcl2 by divided CD8 T cells activated in the presence of C57BL/6J splenocytes.

The results are expressed as the mean of triplicates \pm SD and are representative of 2 independent experiments. The statistical significance of differences was determined by the student t-test (ns: $p \geq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

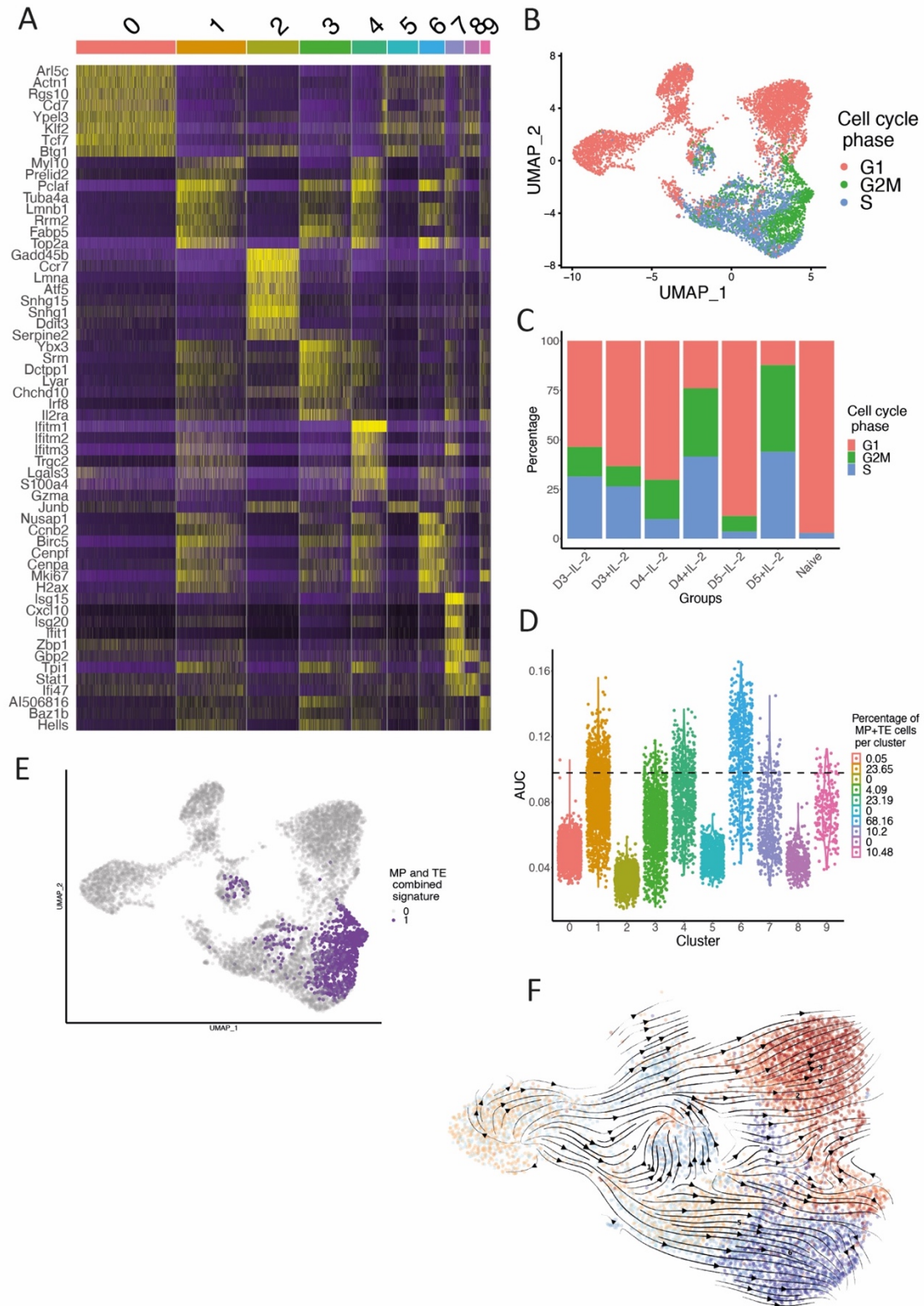


Figure S3. Extended data for figure 5.

A. Heatmap representing the top 8 differentially expressed marker genes for each cluster defined in Figure 5A.

B-C. Classification of cells into one of the cell-cycle phases (G1, S or G2/M) and colored accordingly using the Seurat package. **B.** Cell-cycle position was projected onto the UMAP.

- C.** Percentages of cells from each cell cycle phase for each experimental condition were plotted.
- D.** Enrichment per cluster of combined memory precursor (MP) and terminal effector (TE) signatures. The dotted line represents the threshold above which, cells are considered as memory precursors + T effector cells. The legend indicates the percentage of memory precursor and effector cells in each cluster. AUC: area under the curve.
- E.** The cells with a memory precursor and a terminal effector (TE) signature were represented on the UMAP.
- F.** RNA velocities are projected onto the UMAP excluding naive cells.

II. CARACTERISATION DE L'HETEROGENEITE FONCTIONNELLE DE LA MEMOIRE PAR DES APPROCHES EN CELLULE UNIQUE

1. Article – Impact d'une stimulation transitoire par une tumeur sur la qualité fonctionnelle des LT CD8 mémoires

Pour ce deuxième axe de ma thèse, mon travail de recherche visait à caractériser la qualité fonctionnelle des LT CD8 mémoires générés après un challenge tumoral en comparaison d'une infection virale aiguë. En effet, le contexte d'immunisation influence le devenir des LT CD8 les menant vers une voie générant des mémoires fonctionnelles ou épuisées lorsque l'antigène persiste. Nous nous sommes demandés si un LT CD8 ayant été activé par la tumeur qu'elle a réussi à rejeter, présentait déjà des marques d'épuisement. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de souris infecté par le virus de la Vaccine présentant l'antigène NP68 (VV-NP68) et un modèle de souris dans lequel des cellules EL4, des lymphoblastes dérivés d'un lymphome de souris, sont transférées en sous-cutané. Ces cellules forment une tumeur au site d'injection et présentant l'antigène NP68 (EL4-NP58). Nous avons ainsi étudié et caractérisé le phénotype et la fonctionnalité des F5 TCR-transgénique T CD8 mémoires reconnaissant l'antigène NP68 qui ont été transférés aux préalables.

Nos résultats ont montré que les LT mémoires induits par la tumeur avaient une capacité de protection diminuées. Le phénotype de ces mémoires a ensuite été caractérisé par cytométrie en flux et a mis en évidence des différences d'expression des intégrines et de la forme glycosylée de CD43. Afin d'identifier une signature transcriptomique associée à des sous-ensembles de cellules mémoire de meilleure qualité, nous avons réalisé du single-cell RNA-seq sur les LT mémoires induits par la tumeur et le virus dans un contexte basal ou après restimulation par l'antigène. Bien que les profils transcriptomiques soient similaires entre les mémoires générées dans ces deux contextes, celles induites par la tumeur exprimaient davantage des gènes codant pour des récepteurs inhibiteurs ce qui a été vérifié par cytométrie en flux dans un second temps. De plus, l'analyse bio-informatique a mis en évidence une augmentation de l'expression du gène codant pour la Galectine-3 dont nous avons observé une production plus importante de la protéine en intracellulaire dans les mémoires induites par la tumeur. Cette protéine peut altérer les capacités fonctionnelles des cellules et nous avons montré que les mémoires induites par la tumeur disposaient d'une capacité diminuée à produire et sécréter les cytokines effectrices. Ainsi, une stimulation transitoire par une tumeur est suffisante pour induire des marques d'épuisement et altérer la qualité fonctionnelle des LT CD8 mémoires.

Il est à noter que des résultats préliminaires sont introduits dans cette première version de papier et que des expérimentations sont en cours afin de les valider.

Transient tumoral challenge is sufficient to alter the functionality of memory CD8 T cells

Authors

Margaux Prioux^{1,2}, Daphné Laubretton¹, Sophia Djebali¹, Simon De Bernard³, Olivier Gandrillon^{2,4}, Laurent Modolo², Christophe Arpin¹ and Jacqueline Marvel¹

Affiliations

¹ Centre International de recherche en Infectiologie, Université de Lyon, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

² Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la cellule, Université de Lyon, ENS de Lyon, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, Lyon, France

³ AltraBio, Lyon, France

⁴ Inria, Villeurbanne, France

* Correspondence: jacqueline.marvel@inserm.fr

Abstract

Memory CD8 T cell populations display improved effector functions compared to naïve cells. However, following certain activation contexts, such as chronic viral infection or tumors stimulation, they may present functional defects broadly referred to as exhaustion. Here, we investigated the functional quality of CD8 T memory cells generated under a transient tumoral challenge in comparison to a viral acute infection. Tumor-induced memory cells showed diminished expression of integrins and reduced protective capacity compared to viral-induced memory cells. Single-cell RNA-seq analysis revealed that tumor-induced memory cells highly expressed genes encoding inhibitory receptors (PD1 and Tim3) and Galectin-3 (Gal3) following antigenic stimulation. Tumor-induced memory were shown to express elevated level of intracellular Gal3 protein and had reduced ability to produce effector cytokines. Together, these data suggest that transient stimulation by a tumor is sufficient to imprint an exhausted profile in memory CD8 T cells.

Introduction

During an infection, naive CD8 T cells respond to the pathogen. This leads to massive proliferation and differentiation into cytotoxic effector cells which will control and clear the infection and give rise to a small population of memory CD8 T cells that can persist for long periods of time through cytokine-mediated homeostatic proliferation (Becker et al. 2002; Goldrath et al. 2002; Tanchot et al. 1997). Memory T cells differ from their naive counterpart by an enhanced responsiveness following antigen stimulation (Cho et al. 1999; Jameson 2021). This state of hyper-responsiveness results from epigenetic modifications established during the transcriptional and epigenetic modification program induced by their activation during the primary response and which is maintained thereafter (Fitzpatrick, Shirley, and Kelso 1999; Marçais et al. 2006; Youngblood, Hale, and Ahmed 2015). Indeed, numerous properties of CD8 T cells are thereby memorized and include immediate proliferation, rapid acquisition of effector functions such as cytotoxicity or cytokine production, and modified trafficking potential and homing patterns (Barber, Wherry, and Ahmed 2003; Lalvani et al. 1997; Mackay, Marston, and Dudler 1990; Masopust et al. 2001; Pihlgren et al. n.d.; Walzer et al. 2003).

The heterogeneity of the memory cell pool has long been recognized and reflects the various functional and migratory properties of the memory T cell subsets. The first characterized subsets are the TCM (central-memory T cells) and the TEM (effector-memory T cells) (Sallusto, Lenig, and Lanzavecchia 1999; Wherry et al. 2003). TCM expressing CD62L and CCR7 localize to lymphoid tissues and have robust recall proliferation and IL-2 production capacities. Conversely, TEM, which lack CD62L and CCR7 expression, are located in peripheral non-lymphoid tissues and can rapidly become cytotoxic. Many alternative subsets have been described, some of which do not seem to overlap with the TCM/TEM subdivision. Indeed, Hikono, et al., used CD27 and activation-associated glycoform of CD43 to defined 3 populations which are independent of the TCM/TEM classification and offers a refinement of the functional properties within the memory cells pool (Hikono et al. 2007). Indeed, they demonstrated that the CD27⁺ CD43⁻ subset displays greater proliferative capacity following recall stimulation and therefore defined them as functionally superior to CD27⁺ CD43⁺ and CD27⁻ CD43⁻ subtypes. Similarly, in a model where the control by these CD8 T cells subsets of bacterial and viral pathogens was assessed, Olson, et al. showed that the CD27⁻ CD43⁻ population, exhibiting effector-like traits, was optimal (Olson et al. 2013). Overall, these studies showed that the absence of CD43 expression by memory cells correlates with a better quality.

However, under certain circumstances, the response of memory T cells is altered and is no longer a guarantee of protection. Indeed, in the context of chronic infections marked by antigen persistence, memory CD8 T cells enter a state of decreased responsiveness referred to as exhaustion (Thommen and Schumacher 2018; Wherry 2011). This state is characterized by upregulation of multiple cell-surface inhibitory receptors such as PD1, Tim3 or Lag3 that inhibit cellular functions induced following TCR engagement including cytokine production,

proliferative capacity and cytotoxicity (Blackburn et al. 2009; Wherry et al. 2007). A similar process takes place when CD8 T cells respond against a tumor. Indeed, the immune system is able to reject a tumor (cancer immunosurveillance) and can control it for long periods of time through an equilibrium state (Dunn et al. 2002; Koebel et al. 2007). CD8 T cells are considered to be major drivers of anti-tumor immunity due to their strong capacity for cytotoxicity (Raskov et al. 2021; Shankaran et al. 2001). However, when a tumor is able to escape the immune system, the intratumoral CD8 T cells show a broad spectrum of dysfunctions which are similar to the one described for virus induced exhausted T cells (Jiang, Li, and Zhu 2015; Thommen and Schumacher 2018).

The developmental pathways and regulation of exhausted T cell populations heterogeneity in chronic versus acute infections have been widely studied (Beltra et al. 2020; Chen et al. 2019; Hudson et al. 2019; Yao et al. 2019). However, few comparative acute viral infections versus tumor studies exist, whereas the phenotypic and transcriptomic profiles of exhausted cells, although similar, show some differences between a chronic infection and a tumor (Thommen and Schumacher 2018). To address this question, we took advantage of the EL4 tumoral model which is rejected within 2 weeks following graft, in order to examine the impact of a transient rather than a chronic tumoral challenge on the memory CD8 T cells generation. We used F5 TCR-transgenic CD8 T cells recognizing the NP68 epitope to compare the memory cells induced by immunization with vaccinia virus or EL4 tumor cells that both express the NP68 peptide (respectively VV-NP68 and EL4-NP68). This system avoids the selection of CD8 T cell clones with different affinities in the two experimental models. We showed that EL4-induced memory CD8 T cells exhibit a phenotype associated with a decreased expression of integrins and elevated inhibitory receptors expression as well as a decreased protective capacity in response to a lethal viral challenge. Although single-cell RNA-seq analysis revealed only few differences in the transcriptomic profiles between EL4- and VV-induced memory cells, we found that EL4-induced memory cells upregulated *Lgals3* encoding galectin-3 (Gal3) known to mediate T cell suppression. Further cell characterization revealed increased intracellular Gal3 production by activated EL4-induced memory cells which correlated with a defect in effector cytokine production. Thus, these data suggest that transient stimulation by a tumor is sufficient to imprint an exhausted profile in memory CD8 T cells.

Results

The protection capacity differs between virus- and tumor-induced memory CD8 T cells

In order to compare the quality of memory CD8 T cells generated in the context on an acute viral infection or a tumor challenge, we used NP68-epitope specific F5 TCR transgenic cells. Naïve F5 CD8 were transferred into a C57Bl/6 recipient host that either received an intranasal instillation of vaccinia virus or a subcutaneous injection of EL4 tumor cells that both express the NP68-epitope (VV-NP68 and EL4-NP68 respectively). We first compared the generation kinetics of the effector and memory populations in the blood of mice by flow cytometry, using

Ki67 and Bcl2 labelling, in order to define early effector cells (EE, Ki67⁺ Bcl2⁻) from late effectors (LE, Ki67⁻ Bcl2⁻) as well as memory cells (Ki67⁻ Bcl2⁺), as previously described (Crauste et al. 2017) (**Figure 1A-B**). We showed that the kinetic of EE cells generation is similar between VV- and EL4-induced CD8 T cells while EL4-induced LE cells were maintained for a longer time as compared to VV-induced LE cells (**Figure 1A-B**). However, the absolute LE numbers were comparable over time. This delayed contraction of LE correlated with a delayed appearance of memory cells (Figure 1A) although in the memory phase (28 days post-treatment (dpt)), similar number of memory cells were induced by both immunization protocols (**Figure 1B**). Moreover, the numbers of total F5 over time were similar between VV- and EL4-immunized mice (**Figure 1C**).

Next, we compared the protection ability of memory cells generated after viral infection or tumor challenge. VV- and EL4-induced memory cells were FACS-sorted 30 dpt and transferred into naïve C57Bl/6J host. The day after, mice received a lethal dose of Flu-NP68 and survival rates were followed for 10 days (**Figure 1D**). The survival rate of mice receiving the EL4-induced memory cells dropped drastically at 8 dpt to reach 30% of survival at 10 dpt while mice that received VV-induced memory cells still display 80% of survival. Hence, these results showed that memory cells induced in the context of a viral infection confer a better protection than the memory cells generated in the context of a transient tumoral challenge.

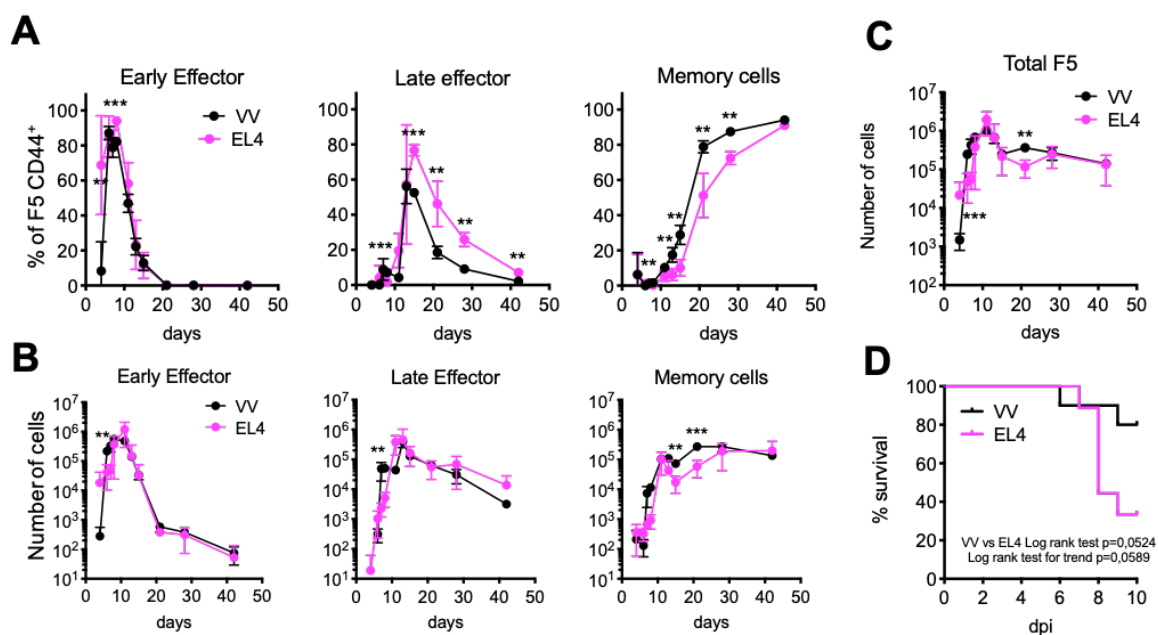


Figure 1: Memory CD8 T cells generated after viral infection or tumor challenge are of different quality (A-C) Naïve F5 x CD45.1 cells ($2 \cdot 10^5$) were intravenously (i.v.) transferred in C57Bl/6J one day prior intranasal (i.n.) infection with VV-NP68 ($2 \cdot 10^5$ pfu) or subcutaneous (s.c.) injection of EL4-NP68 tumor cells ($2,5 \cdot 10^6$). (A) The percentages and (B) numbers of Early effector, Late effector or Memory phenotype F5 cells and (C) numbers of total F5 were determined over time in the blood by flow cytometry using Ki67 and Bcl2 labelling. (D) Naïve F5 x CD45.1 cells ($2 \cdot 10^5$) were i.v. transferred in C57Bl/6J one day prior i.n. infection with VV-NP68 ($2 \cdot 10^5$ pfu) or s.c. injection of EL4-NP68 tumor cells ($2,5 \cdot 10^6$). 30 days post-treatment, VV-induced F5 and EL4-induced F5 memory cells were FACS-sorted and transferred into naïve C57Bl/6J host ($1,2 \cdot 10^5$ cells, iv route). One day after transfer, mice received a lethal dose of Flu-NP68 ($2 \cdot 10^6$ TCID₅₀) and survival was

followed for 10 days (n= 10 mice per group). *p <0.05, ** p <0.01, *** p <0/001 (Mann-Whitney test). Data are represented as mean ± SD and are representative of 3 independent experiments.

VV- and EL4-induced effector and memory CD8 T cells exhibit a different phenotype

We then compared the phenotype of F5 effectors cells generated in the blood and F5 memory cells generated in the spleen after a viral or a tumoral challenge (**Figure 2 and supplementary figure 1**). We first compared the expression of CD27 and CD43 markers as they were associated with the quality potential of CD8 memory cells (Hikono et al. 2007). CD43 was highly expressed by EL4-induced and VV-induced effector cells at 7 dpt (**Figure 2A**) with a higher expression observed for EL4-induced cells. Furthermore, while CD43 expression is maintained over time in EL4-induced cells with 80% of expression at the memory phase, its expression on VV-induced cells decreased over time to reach 35% on VV-induced memory cells (**Figure 2A**). The majority of memory cells being CD27⁺ (data not shown), the VV-induced memory cells mainly adopted a CD27⁺ CD43⁻ phenotype while the EL4-induced memory cells were CD27⁺ CD43⁺ (**Figure 2A**). Based on Hikono, et al. observations, the CD27⁺ CD43⁻ memory subset mediates stronger recall response in terms of accumulation at the infection site (Hikono et al. 2007). This accumulation is dependent of the migration properties of memory cells allowed by the expression of integrins (Grau et al. 2018). We thus looked at CD29, CD49a and CD49d expression (**Figure 2B-C and supplementary figure 1B**). The vast majority of VV-induced effector T cells expressed all three integrins while only 20 to 30% of EL4-induced effector cells expressed these markers. This higher integrins expression by VV-induced memory cells was maintained at the memory stage (**Figure 2B-C and supplementary figure 1B – right panel**). We also evaluated the expression of the anti-apoptotic protein Bcl2 and the inhibitory receptor PD1 that regulates the T cell response during the expansion phase (**Figure 2D-E**). Bcl2 was downregulated following activation and re-expressed starting from day 7 (**Figure 2D**) and we showed that EL4-induced effector and memory cells expressed lower level of Bcl2 than VV-induced cells (**Figure 1A**). Conversely, EL4-induced CD8 T cells expressed higher level of PD1 during the effector and memory stage. Finally, EL4-induced memory cells were enriched in TCM both at the effector and the memory stage as compared to VV-induced cells (**supplementary figure 1C**). Similar observations were made in the draining lymph node (dLN) (**Supplementary figure 2**).

Overall, these results demonstrated that VV-induced cells have higher survival and migration potential compared to EL4-induced memory cells.

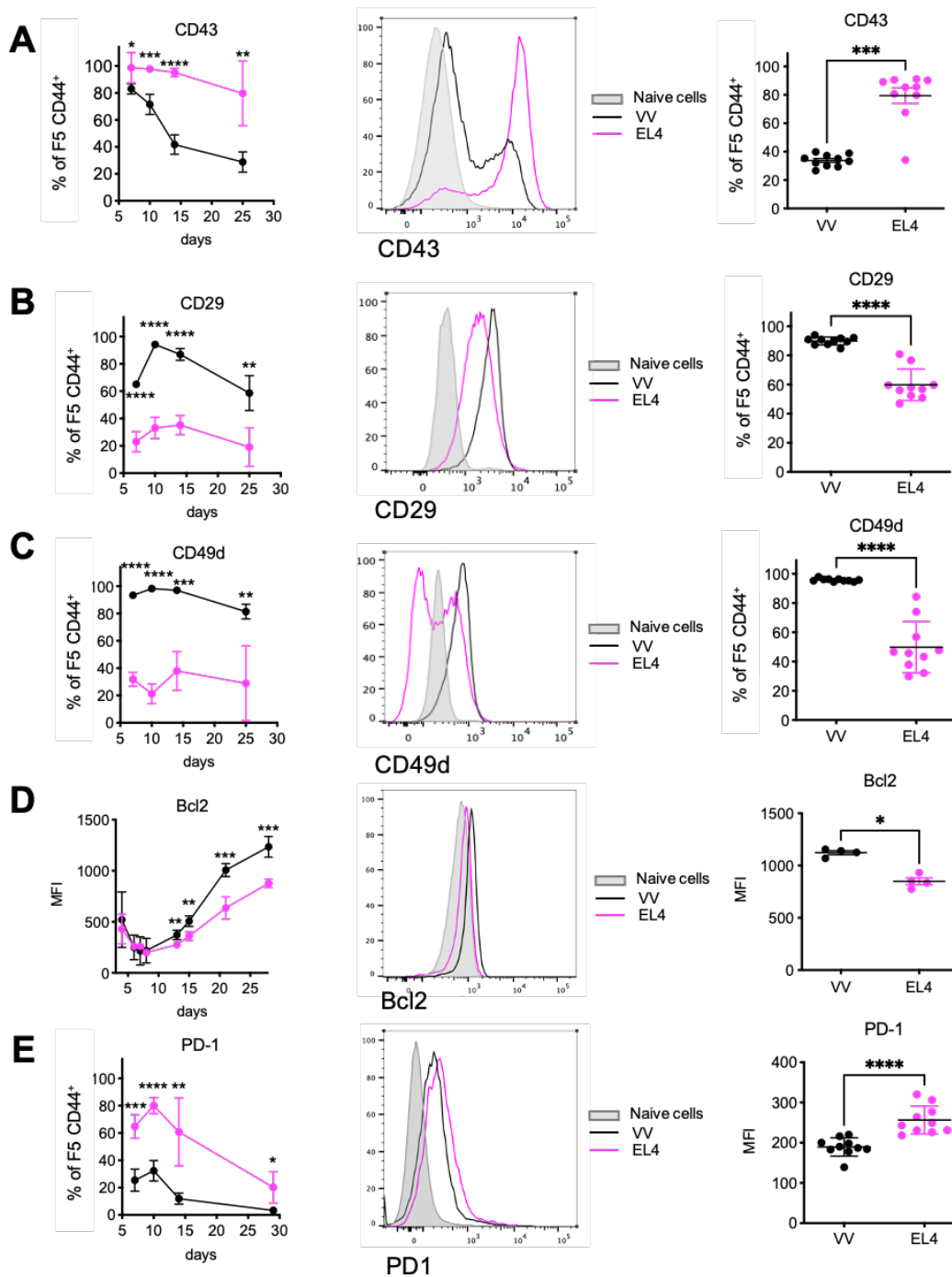


Figure 2: Effector and memory CD8 T cells generated after viral infection or tumor challenge have a different phenotype

Naive F5 x CD45.1 (2.10^5) cells were i.v. transferred in C57Bl/6J one day prior i.n. infection with VV-NP68 (2.10^5 pfu) or s.c. injection of EL4-NP68 tumor cells ($2.5.10^6$). (A-E left panel) F5 phenotype was analysed over time on blood by flow cytometry. (A-E middle and right panel) 30 days after infection, F5 phenotype was analysed by flow cytometry on spleen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (Mann-Whitney test). Data are represented as mean \pm SD and are representative of 2 or 3 independent experiments.

Comparative analysis of single-cell transcriptomic profile reveals few differences between VV- and EL4-induced memory cells

Next, we further characterized the memory cells generated after viral or tumor challenge at the transcriptomic level. We performed single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) on VV-induced and EL4-induced F5 memory cells that were FACS-sorted ex-vivo (respectively “quiescent” VV and EL4) or following a brief restimulation with NP68 peptide (respectively “restimulated” VVR and EL4R). Naive F5 cells (referred as Naive and NaiveR) were used as a control. We performed a clustering analysis and projected cells on a UMAP (**Figure 3A**). We identified 6 clusters that memory cells cluster together as well as those after restimulation or even Naive and NaiveR cells. However, clusters were mainly defined by the experimental conditions (**Figure 3A-B**). We next analyzed the top 20 marker genes defining the clusters (**Figure 3C**). As expected, naive cells had a distinct transcriptomic profile from quiescent or restimulated memory cells and expressed genes that are characteristic of them like the chemokine receptor *Ccr9*. Following stimulation with NP68, naive and memory cells upregulated genes associated with activation (respectively *Ikzf2* and *Xcl1*, *Furin*) or cell division (respectively *Tubb2a*, *Tnf* and *Egr2*, *Zbtb32*, *Il-2ra*). Transcriptomic profiles of VV- and EL4-induced memory cells appeared very similar (**Figure 3C**). Nevertheless, as observed at the protein level, VV cells expressed higher levels of *Bcl2*, *Itgb1* (CD29) and *Itga4* (CD49d) genes (**Supplementary Figure 3A**). Furthermore, *Pdcd1* encoding PD1, whose expression was upregulated following stimulation, was expressed at a greater level in EL4R cells compared to VVR cells. However, no differences in *Sell* (CD62L) and *Itga1* (CD49a) expression were found between EL4 and VV or EL4R and VVR (**Supplementary Figure 3A**). We then performed a differential expression analysis and compared transcriptomic signature of VV- versus EL4-induced memory cells and VVR- versus EL4R-induced memory cells (**Figure 3 D-E ; Supplementary figure 3B**). While VV cells were enriched in several genes such as (*Itga4*, *Stat1*, *Ltb*), EL4 cells upregulated only 2 genes: *Capg* (macrophage capping protein) that cap ends of actin filaments and *Lgals3* coding for the Galectin-3 (Gal3) protein. After *in vitro* restimulation, 12 genes were found upregulated by EL4R cells including again *Capg* and *Lgals3*, some genes involved in effector and immune responses (*Icos*, *Ccr7*, *Prf1*) and inhibitory receptors (*Pdcd1*, *Havcr2*) that could negatively impact cells response while 130 genes were upregulated in VVR cells .

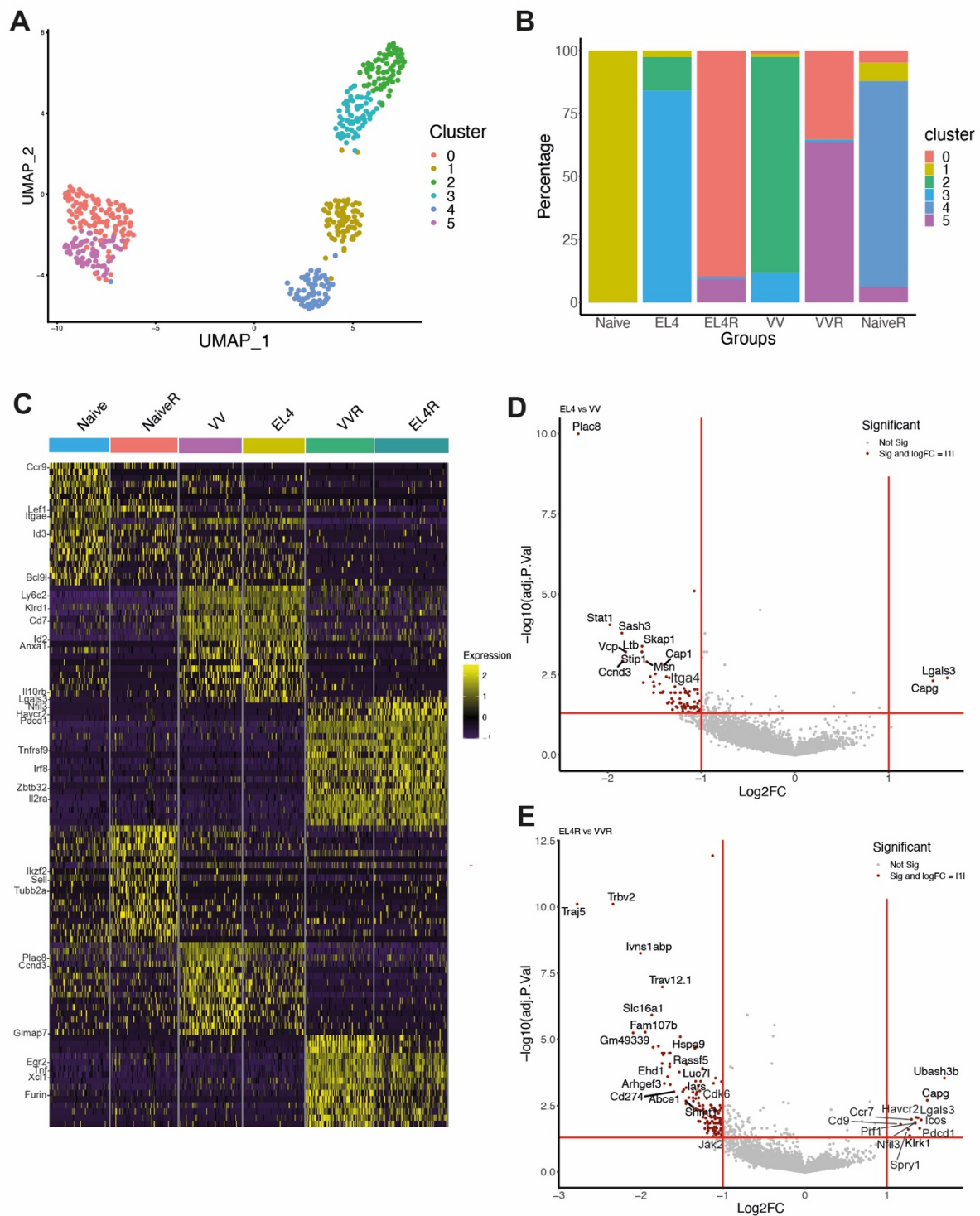


Figure 3: Single-cell RNA-seq analysis of memory CD8 T cells generated after viral infection or tumor challenge reveals a similar transcriptomic profile

Naive F5 x CD45.1 (2.10^5) cells were i.v. transferred in C57Bl/6J one day prior i.n. infection with VV-NP68 (2.10^5 pfu) or s.c. injection of EL4-NP68 tumor cells ($2.5.10^6$). 60 days after infection, EL4- and VV-induced memory cells were single-cell sorted ex vivo or following a 2h stimulation with NP68 peptide (10 nM). Naive F5 cells were used as control. N = 476 cells were used for the scRNA-seq analyses. **(A)** Clustering of F5 CD8 T cells projected on the UMAP. **(B)** Percentages of cells from each cluster in each sample. **(C)** Heatmap representing the top 20 genes expressed in each group. **(D-E)** Volcano plot of differentially expressed genes

between EL4 and VV cells (D) or EL4R and VVR cells (E). EL4R/ VVR: restimulated anti-EL4/VV memory cells; NaiveR: restimulated naive cells.

Galectin-3 is highly expressed intracellularly by EL4-induced memory cells after restimulation

We identified *Lgals3*, encoding for Gal3, as one of the main overexpressed gene in quiescent EL4-induced memory cells. Gal3 is secreted into the extracellular space by a number of different cell types, including T cells and thus could act in an autocrine or paracrine manner (Kouo et al. 2015; Smith et al. 2018). Gal3 binds carbohydrates and therefore can binds on glycosylated proteins at the cell surface (Gilson et al. 2019). As the glycol-form CD43 was highly expressed by EL4-induced memory cells, we assessed the expression of Gal3 in VV- or EL4-induced memory at the surface. No surface protein expression was observed on VV- or EL4-memory cells (**Figure 4A**). There was a low Gal3 expression at the surface of the cells upon stimulation, which is higher for VV-induced cells (**Figure 4D**). Some studies showed that the Gal3 can also act intracellularly (Chen et al. 2009; Kaur et al. 2018). We found that EL4-induced memory cells display a strong intracellular Gal3 expression both in percentage and level of expression compared to VV-induced memory cells (**Figure 4B**). After 24h of restimulation, nearly 100% of VV- and EL4-induced memory cells expressed endogenous Gal3 (**Figure 4E – left panel**) but the level of expression remains higher for EL4-induced cells (**Figure 4E – right panel**).

We then examined the expression of Tim3 encoded by the gene *Havcr2* and PD1 encoded by *Pdcd1*, two exhaustion markers whose genes were overexpressed in EL4-induced memory cells upon restimulation (**Figure 3E**). Interestingly, we found that Tim3 was highly expressed by EL4-induced memory cells compared to those induced by VV while the gene was very poorly expressed in scRNA-seq data (**Figure 4C; Figure 3C-D**). The expression of PD1 and Tim3 was upregulated following peptide stimulation, in a greater extend in EL4-induced memory cells (**Figure 4F**).

Overall, we confirmed that resting and stimulated EL4-induced memory cells exhibited higher expression of inhibitory receptors (PD1 and Tim3) and endogenous Gal3 than VV-induced cells.

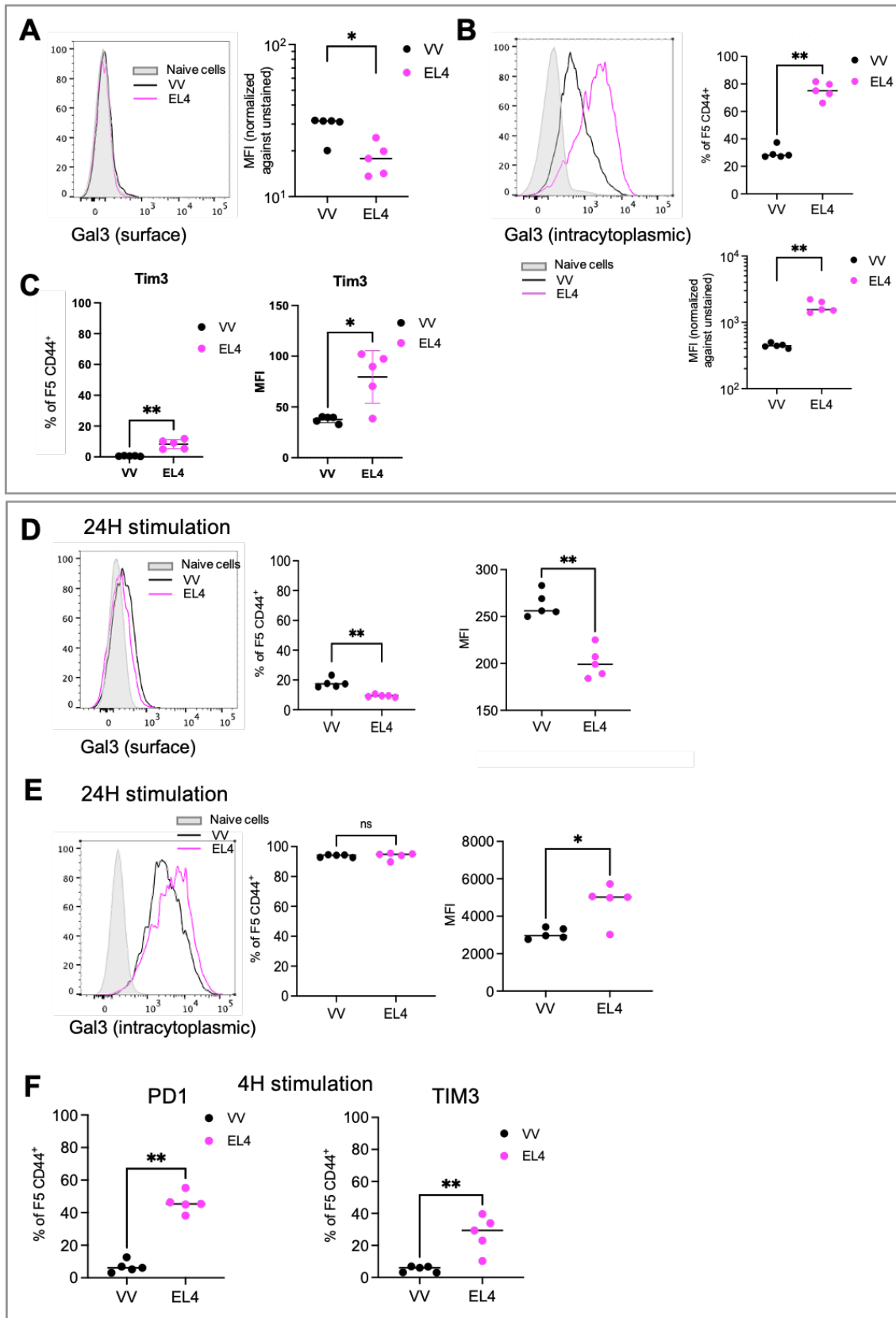


Figure 4: EL4-induced memory cells express more inhibitory receptors and produce increased amount of galectin-3 intracellularly

Naive F5 x CD45.1 (2.10^5) were i.v. transferred in C57Bl/6J one day prior i.n. infection with VV-NP68 (2.10^5 pfu) or s.c. injection of EL4-NP68 tumor cells ($2.5.10^6$). (A-B) More than 70 days after infection, the expression of Gal3 on F5 memory cells was assessed in surface (A) or intracytoplasmic (B). (C) 35 days after

infection, the percentage (left panel) and the mean of fluorescence intensity (MFI) (right panel) of Tim3 F5 memory cells was analysed by flow cytometry on spleen. (D-E) The expression of Gal3 on F5 memory cells restimulated for 24h with NP-68 peptide (10 nM) was assessed in surface (D) or intracytoplasmic (E). (F) The percentage of PD1+ (left panel) or Tim3+ (right panel) F5 memory cells restimulated for 4h. ns: non-significant, *p <0.05, ** p <0.01 (Mann-Whitney test). Data are represented as mean \pm SD; (C) are representative of 2 independent experiments and (A-B-D-E-F) are preliminary results.

Impairment of cytokines production and secretion by EL4-induced memory cells

A number of studies have demonstrated that the expression of Gal3 can alter the TCR signaling leading to a defect in the production and/or secretion of cytokines (Demotte et al. 2010; Kaur et al. 2018; Kouo et al. 2015; Petit et al. 2016; Smith et al. 2018). We thus addressed the ability of VV- and EL4-induced memory cells to produce cytokines following stimulation with NP68 peptide. We found that slightly more VV-induced memory cells produced IFN γ and TNF α but no significant difference was observed for IL-2 (**Figure 5A**). However, the amount of IFN γ and TNF α produced was largely higher in VV-induced memory cells (**Figure 5B**). Furthermore, more IFN γ was detected in the supernatant of VV-induced splenocytes following 4 or 24h of stimulation with NP68 (Figure 5D). We then determined the number of cytokines produced by the memory cells to address their polyfunctionality. Similar proportions of VV- and EL4-induced cells were able to produce 3 cytokines. However, there were more cells producing only 1 cytokine and less cells producing 2 cytokines among the EL4-induced memory cells (**Figure 5C**). Thus, we showed an increased endogenous Gal3 expression by EL4-induced memory cells that exhibit a defect in the production and secretion of IFN γ and TNF α cytokines.

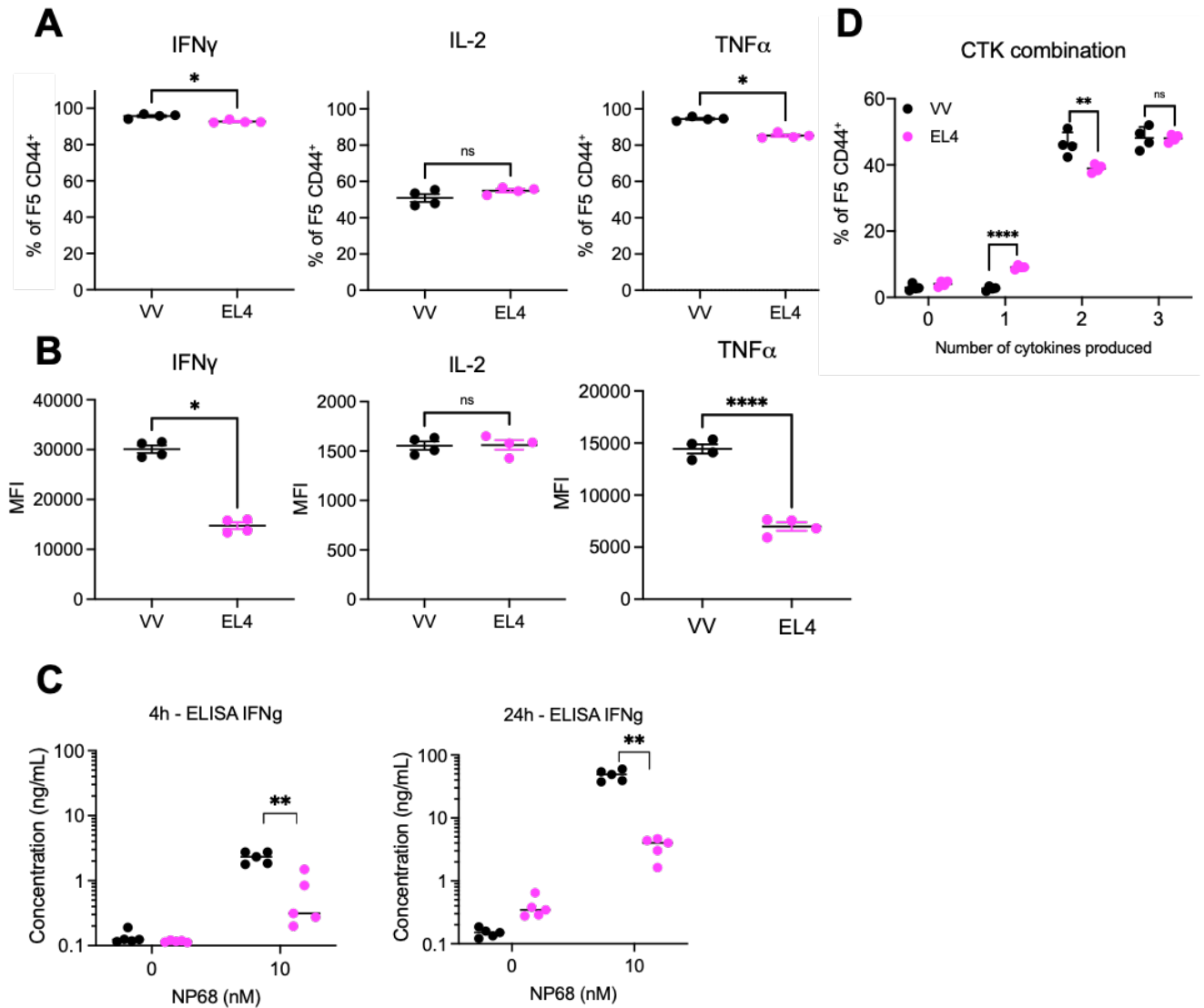


Figure 5: Memory CD8 T cells generated after viral infection are more polyfunctional than after tumor challenge

Naive F5 x CD45.1 (2.10^5) cells were i.v. transferred in C57Bl/6J one day prior i.n. infection with VV-NP68 (2.10^5 pfu) or s.c. injection of EL4-NP68 tumor cells ($2.5.10^6$). (**A-C**) 48 days after infection, splenocytes were stimulated for 4h with NP-68 peptide (10 nM) in the presence of GolgiStop. (**A**) The percentage of IFN γ ⁺, IL-2⁺ and TNF α ⁺ F5 memory CD8 T cells was measured by flow cytometry. (**B**) MFI for IFN γ , IL-2 and TNF α in the indicated F5 memory subsets. (**C**) Secretion of IFN γ in the supernatant measured by ELISA after 4 or 24h of stimulation with NP68. (**D**) The proportion of F5 memory cells expressing 1, 2 or 3 cytokines. ns: non-significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (Mann-Whitney test). Data are represented as mean \pm SD and (**A-C**) are representative of 3 independent experiments and (**D**) are preliminary results.

Discussion

In this study, we compared the CD8 memory cells generated after an acute viral infection with VV-NP68 or a transient tumoral challenge with EL4 cells. We showed that EL4-induced memory cells generation was delayed as compared to VV-memory cells and that they were less protective in a secondary challenge. EL4-induced memory cells were enriched in the

glycosylated form of CD43 and lacked the expression of integrins (CD29, CD49a, CD49d) as compared to VV-induced cells. Single cell analysis identified *Lgals3* as one of the main differentially expressed gene by EL4-induced memory cells. Indeed, we showed that Gal3 protein encoded by *Lgals3* gene is highly expressed by EL4-induced memory cells compared to VV-induced cells. Finally, we demonstrated that EL4-induced memory cells have a defect in cytokine expression and upregulated Gal3, PD1 and TIM-3 exhaustion markers upon restimulation.

According to CD27 and an activation-associated glycoform of CD43, Hikono et al., described three populations of memory CD8 T cells and showed that the CD27⁺ CD43⁻ cells have the strongest ability to accumulate in the lungs upon a respiratory virus challenge. Our results demonstrated that VV-induced memory cells acquired a CD27⁺ CD43⁻ phenotype and expressed CD29, CD49a and CD49d integrins which were shown to be important for cell homing to the lung tissue (Grau et al. 2018), while EL4-induced memory cells mainly adopted a CD27⁺ CD43⁺ phenotype and were defective in integrins expression. T-inflammatory memory cells (T_{IM}) that are generated in a context of sterile inflammation similar to EL4-induced memory cells were mainly CD27⁺ CD43⁻ like VV-induced memory cells, suggesting that the EL4-induced memory cells phenotype is not dependent on the inflammatory context induced by the viral infection (Jubin et al. 2012). These phenotypic characteristics could partly explain the lower protection conferred by EL4-induced memory cells against flu infection.

Single-cell RNA-seq revealed similar transcriptomic profiles of VV and EL4-induced memory cells. The few cells analyzed (approximately 80 per experimental conditions) may not be representative of the diversity of the subpopulations that could exist. Indeed, more cells can provide a broader view of the biological variability of the cell population while having reasonable sequencing depth (M. J. Zhang, Ntranos, and Tse 2020). The differential expression analysis showed that few genes were highly expressed by the EL4-induced memory cells. Indeed, two genes were upregulated in these memory cells both ex-vivo or upon restimulation: *Capg* and *Lgals3*. *Capg* belongs to the gelsolin family and have roles in actin filament remodeling, cell motility, apoptosis control and gene expression regulation (Silacci et al. 2004). Its overexpression was observed in tumor and was positively correlated with levels of infiltrating T exhausted cells, regulatory T cells and tumor-associated macrophages (Jiang et al. 2022). *Capg* was also upregulated in lung CD8 T cells with an exhaustion-like state generated after infection with human metapneumovirus infection (Erickson et al. 2015).

Gal3 belongs to the lectin family and is involved in many mechanisms like T cell apoptosis, suppression, regulation of proliferation, impairment of T cell signaling and blockade of cytokine function (Gilson et al. 2019). Gal3 can be expressed in the extracellular space through its binding to glycosylated protein such as CD45 or CD43 at the cell surface (Gilson et al. 2019) or within the intracellular space where it is recruited to the immunological synapse upon viral infection or TCR stimulation (Chen et al. 2009; Kaur et al. 2018).

Gal3 surface binding or intracellular expression alters cell functions and particularly cytokine production via the destabilization of the secretory synapse formation or the alteration of TCR sensitivity (Petit et al. 2016; Smith et al. 2018). Despite their strong CD43 expression, no Gal3 expression was observed at the surface of EL4-induced cells, neither on VV-induced cells. However, we observed a strong Gal3 expression within quiescent memory cells, that was higher for EL4- than for VV-induced memory cells. Its intracellular expression drastically increased following peptide stimulation, but remains higher in EL4-induced memory cells. Moreover, expression of Gal3 was found in memory cells at basal state while Gal3 is normally expressed in activated T cells (Chen et al. 2009; Joo et al. 2001; Kaur et al. 2018; Smith et al. 2018). Functional capacity assays showed that EL4-induced memory cells have a decreased ability to secrete cytokines and especially IFN γ .

Exhaustion has been well studied in chronic infections and several studies highlighted a number of actors (transcription factors, epigenetic factor,...) involved in the regulation of T cell dysfunction or exhaustion (Wherry et al. 2007; Z. Zhang et al. 2020). Moreover, in cancer, many studies investigated cancer immunotherapy treatment in order to reverse exhausted T cells (Hashimoto et al. 2018; Jiang et al. 2015; Nguyen and Ohashi 2015). However, little is known about the impact of transient tumor stimulation on the development and function of memory CD8 T cells. In our model, tumor growth was maximal between 6 and 8 days until disappearance of the mass 12 days post-transplantation (Supplementary figure 4A). Although some tumor cells may remain at the injection site, there is no regrowth of tumors. Transcriptomic analysis demonstrates that *Pdcd1* and *Havcr2* coding for the inhibitory receptors PD1 and Tim3 were expressed at higher level in restimulated EL4-induced memory cells. We confirmed the higher expression of PD1 and Tim3 proteins in EL4-induced memory at basal and restimulated state. These genes are marker of exhausted T cells as it has been shown in several studies in a context of chronic infection or tumor (Chen et al. 2019; Fourcade et al. 2010; Hudson et al. 2019). Moreover, *Nfil3*, whose expression is greater in CD8 T cells generated after infection with the chronic LCMV clone-13 compared to those generated with acute LCMV Armstrong infection (Zhu et al. 2015) was found overexpressed in EL4-induced memory cells upon restimulation (**Figure 3E**). The upregulation of all these genes would therefore be in favor of an exhausted-like phenotype. However, gene set enrichment analysis (GSEA) showed no enrichment in the exhausted T cells signature (Supplementary figure 4B). This could be link to the very low number of genes that discriminate EL4-induced memory cells from VV-induced memory cells or because they were just not fully exhausted.

In conclusion, we showed that a transient tumoral challenge is sufficient to imprint an exhausted phenotype thus altering phenotype and function of memory cells.

Acknowledgment

We acknowledge the contribution of SFR BioSciences (UAR3444/CNRS, US8/Inserm, École Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon) and of the CELPHEDIA infrastructure

(<http://www.celphedia.eu/>), especially the center AniRA in Lyon (AniRA-Cytométrie and AniRA-PBES facilities). This work was supported by INSERM, CNRS, Université de Lyon, ENS Lyon, région Auvergne-Rhône-Alpes (Ingerence pack ambition) and ANR (MEMOIRE ANR-18-CE45-0001). Margaux Prieux has a région Auvergne-Rhône-Alpes PhD fellowship.

Declaration of interest

The authors declare no competing interests.

Materiel and methods

Mice

C57BL/6J mice were purchased from the Charles River Laboratories. F5 TCR-transgenic mice [B6/J-Tg(CD2-TcraF5,CD2-TcrbF5) 1Kio/Jmar] recognizing the NP68 peptide from influenza A virus (ASNENMDAM), were provided by Prof. D. Kioussis (National Institute of Medical Research, London, U.K.) and backcrossed on CD45.1 C57BL/6 background (Jubin et al. 2012). Mice were bred and housed under specific pathogen-free conditions in the (AniRA-PBES animal facility (Lyon, France). All experiments were approved by our local ethics committee (CECCAPP, Lyon, France) and accreditations have been obtained from governmental agencies.

Virus infection and tumor challenge

The recombinant vaccinia virus (VV) expressing the NP68 epitope (VV-NP68) was engineered from vaccinia virus (strain Western Reserve) by Dr. Denise Yu-Lin Teoh in Pr. Sir Andrew McMichael's laboratory at the MRC (Human Immunology Unit, Institute of Molecular Medicine, Oxford, UK). The recombinant influenza virus strain WSN encoding the NP68 epitope (Flu-NP68) was produced by reverse genetics from the A/WSN/33 H1N1 strain (Jubin et al., 2012). EL4 lymphoma cell line expressing the NP68 epitope (EL4-NP68) was provided by Dr. T.N.M. Schumacher (de Brito et al. 2011). Naive CD45.1 F5-Tg CD8 T cells (2×10^5 under 200 μ L) were transferred by intravenous (i.v.) injection. The day after, C57BL/6 recipient mice were inoculated intranasally (i.n.) with VV-NP68 (2×10^5 pfu under 20 μ L) or subcutaneously (s.c) with EL4-NP68 cells (2.5×10^6 under 200 μ L) and tumor growth was followed over a period of 10 days.

Protection assay

At least 4 weeks after immunization, F5 memory cells were FACS sorted from the spleen of VV or EL4-immunized mice and 2×10^5 VV- or EL4-induced memory cells were transferred in C57BL/6 J recipient mice by i.v. route. One day after, mice were infected i.n. with a lethal dose of Flu-NP68 virus (2×10^6 TCID50 under 20 μ L). Illness and weight loss was followed daily for 10 days after infection. Mice losing more than 20% of their initial body weight were euthanized.

Cytokine production after *in vitro* stimulation

To assess the cytokine production, 3×10^6 splenocytes were stimulated *in vitro* with NP68 peptide (10 nM) for 4h at 37°C in the presence of GolgiStop™ (BD Biosciences) according to

manufacturer's instructions. The production of cytokines was evaluated by flow cytometry using intracellular staining.

Alternatively, 1×10^6 splenocytes were stimulated with NP68 peptide (10 nM) and supernatant were collected after 4 of 24h for measurement of IFN γ production by ELISA (ELISA MAX™ Standard Set Mouse - Biolegend).

Cell preparation and flow cytometry analysis

Blood samples were collected on days 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 21, 28, 24 and 42 post-treatments. The volume of blood was precisely measured and FlowCount fluorospheres (Beckman Coulter) were added to each sample for cell enumeration.

Mice were sacrificed by cervical dislocation and spleen and draining lymph nodes (cervical and mediastinal) (dLN) were collected at least for 4 weeks after treatment. Tissues were mechanically disrupted and filtered through a sterile 100 μ m nylon mesh filter.

Single cell suspension was first incubated with efluor780-coupled Fixable Viability Dye (TFS) for 15 min at 4°C. Cells were then incubated with an Fc receptor blocking antibody (2.4G2 hybridoma supernatant) for 10 minutes at 4°C and surface staining was performed for 30 min at 4°C with the appropriate mixture of monoclonal antibodies (mAbs) diluted in staining buffer (PBS supplemented with 1% FBS and 0.09% NaN₃ [Sigma-Aldrich]). Intracellular staining was performed using eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set kit (TFS) according to manufacturer's instructions for the analysis of cytokines, cytoplasmic proteins and transcription factor (TF).

The following mAbs (clones) were used: CD8 (53.6.7), CD45.1 (A20), CD49a (Ha31/8), IFN γ (XMG1.2), TNF α (MP6-XT22) from BD Biosciences, CD44 (IM7.8.1), CD62L (MEL-14), CD43 (1B11), Gal3 (M3/38), PD1 (RMP1-30), Bcl2 (BCL/10C4) from Biolegend, CD27 (LG.7F9), CD29 (eBioHMb1-1), CD49d (R1-2), Ki67 (SolA15), IL-2 (JES6-5H4) from TFS and TIM3 (215008) from R&D systems. Samples were acquired on a FACS LSR Fortessa (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR).

Single-cell RNA sequencing

CD8 T cells were enriched from the spleen of VV- or EL4-immunized mice as well as naive F5 x CD45.1 mice with an autoMACS® Pro Separator using the CD8a+ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, #130-104-075) according manufacturer's instructions. A portion of enriched CD8 T cells was stimulated with NP68 peptide (10 nM) for 2h at 37°C. The 6 populations (VV, EL4, Naive, VVR, EL4R, naiveR) were index sorted on an FACS Aria II (BD Biosciences) according to their viability and their expression of CD44 into a 96-well plate containing 4 μ L of lysis solution (PBS, Triton 0,4%, RNaseOut [TFS] 0,05X, poly(T) reverse-transcription (RT) primers and dNTPs) for single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq). Plates were stored at -80°C until processed.

Library construction was performed following Smart-seq2 protocol (Picelli et al. 2014). Briefly, mRNAs were reverse transcribed into cDNAs and were pre-amplified by PCR. Then, cDNAs were fragmented by tagmentation. Illumina sequencing adaptors containing indexes allowing to identify each cell were added and cDNAs were amplified by PCR. All 96-cells libraries were

pooled and quality and quantity were tested using DNA high sensitivity D1000 ScreenTape on TapeStation 4200 (Agilent). Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq in paired-end (2x150 bp) at an average sequencing depth of ~1M reads/cells.

Computational analysis of single-cell RNA sequencing

Data pre-processing

Quality control of raw data was performed using FastQC. The Nextera Transposase Sequence and low-quality bases were trimmed using Trim Galore. Transcript expression quantification was performed using Salmon and version M23 of GENCODE mouse genome and transcriptome. The gene/count matrix was generated with tximport. Cells filtering were performed using the *metric_sample_filter* function implemented in SCONE package (Cole et al. 2017). Thus, cells were filtered based on 3 criteria, namely the number of reads, the number of detected genes and the areas under the false negative rate (FNR) curve employing housekeeping genes. For each criterion, the cut-off value of 3 was applied, i.e., values greater than 3 median absolute deviations from the median were excluded, leading to the analysis of 476 cells. Moreover, genes expressed in less than 3 cells were removed. Then, the dataset was normalized using SCnorm (Bacher et al. 2017) and variable features (HVG) were selected based on variance modeling statistics from the *modelGeneVar* function in Scran (Lun, McCarthy, and Marioni 2016). The top 10% of genes with positive biological components were used for advanced analysis. The log-normalized expression values of the 570 HVGs were used for advanced analysis.

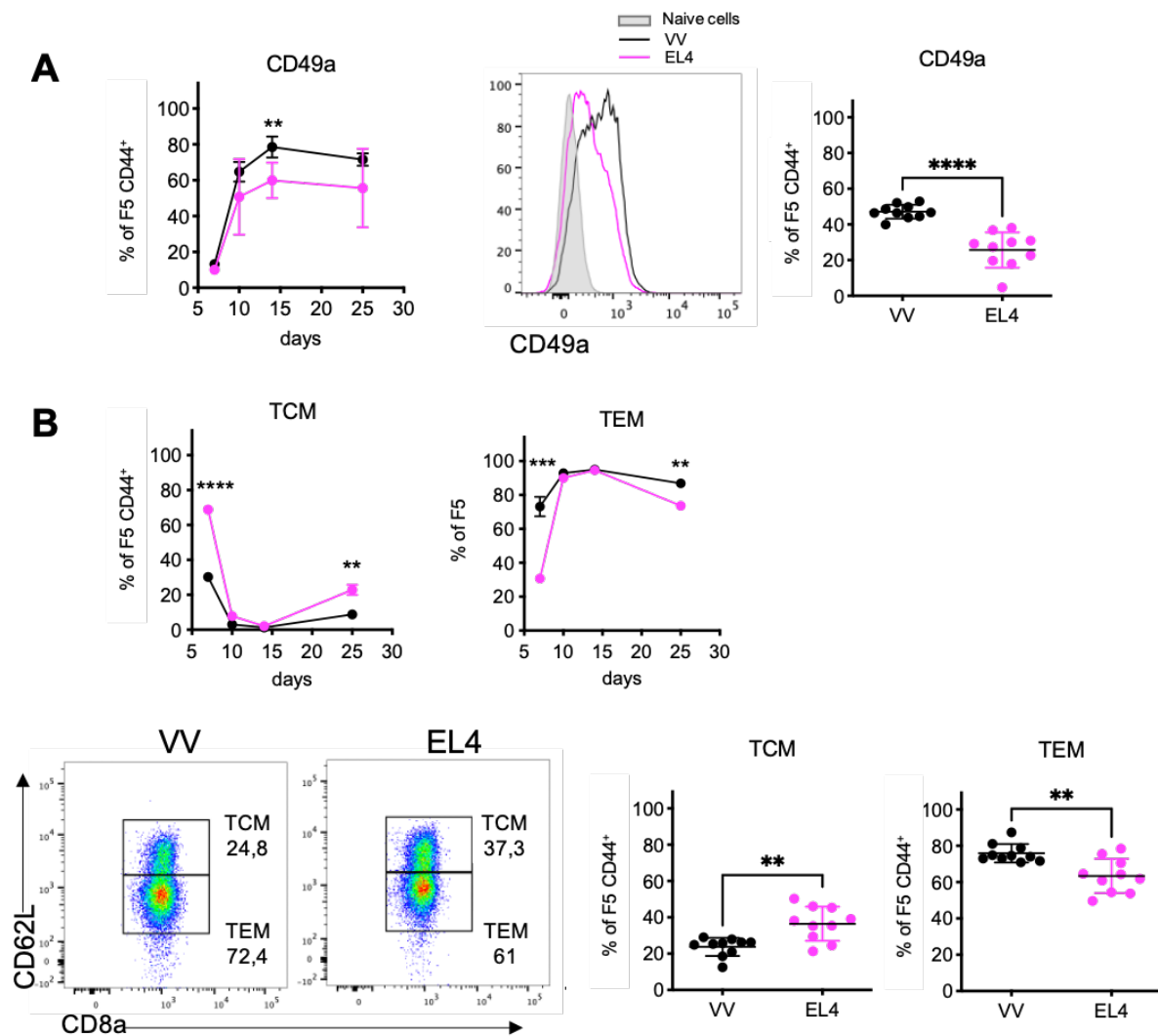
Advanced analysis

Clustering was made by selecting the principal component dimensions and applying the Louvain algorithm included in the Seurat package V4. The clusters were projected onto the UMAP dimension reduction using the same principal component as input to the clustering analysis. The top 15 markers for each subset were found using the *FindAllMarkers* function from the Seurat package. Differential expression analysis was performed using Limma and applied to all genes and not just on HVGs (Phipson et al. 2016). Heatmap, dot plot and violin plot were generated using the Seurat function *DoHeatmap*, *DotPlot* and *VlnPlot* respectively. The AUCell R package (Aibar et al. 2017) was used in order to identify cells with active gene signature. The exhausted CD8 signatures was downloaded from Yao et al. paper (Yao et al. 2019) from Sade-Feldman, et al. paper (Sade-Feldman et al. 2018).

Quantification and statistical analysis

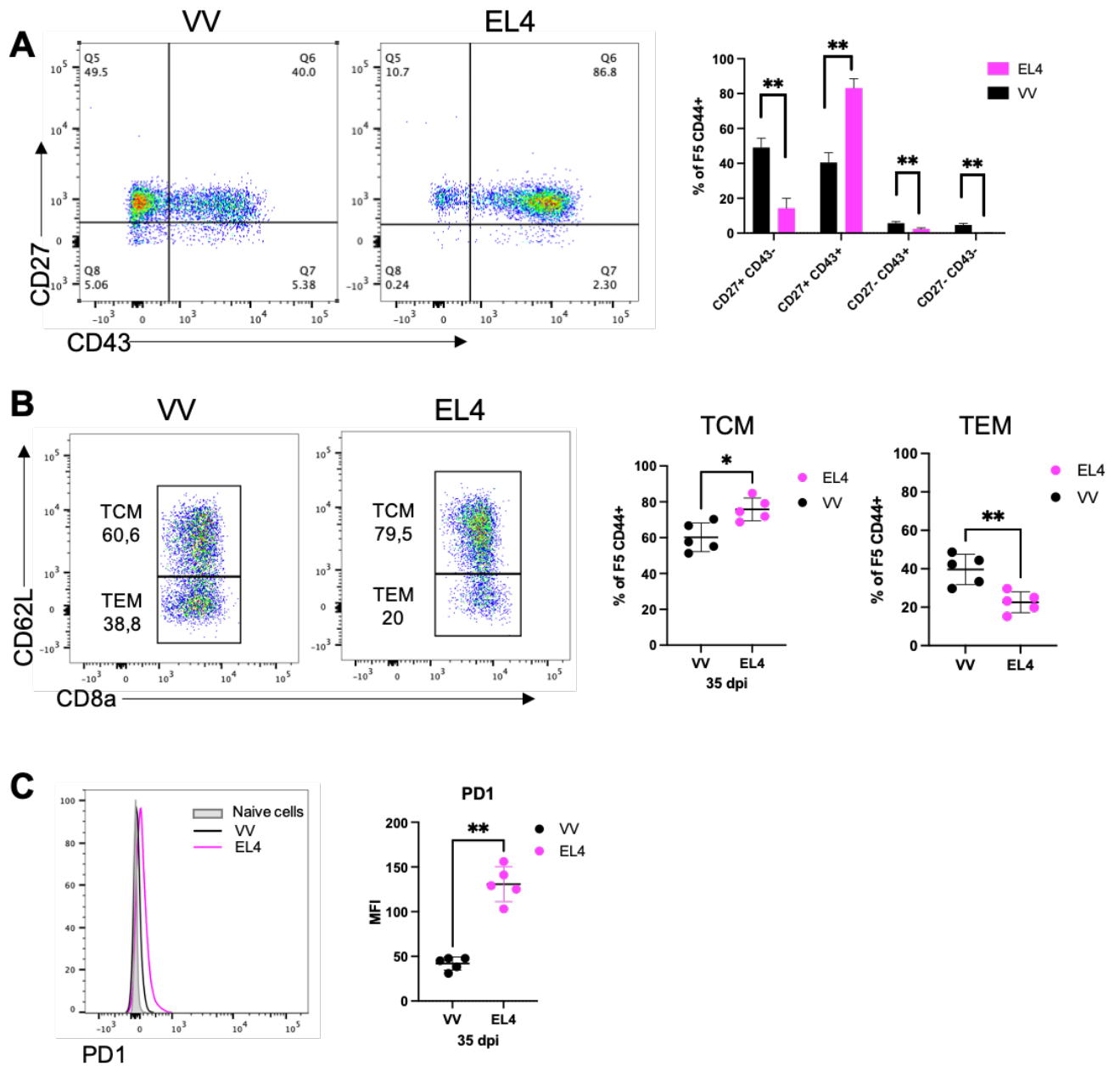
Data were analyzed with FlowJo and GraphPad Prism software. The tests used to determine statistical significance are indicated in each figure legend. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Supplementary figures



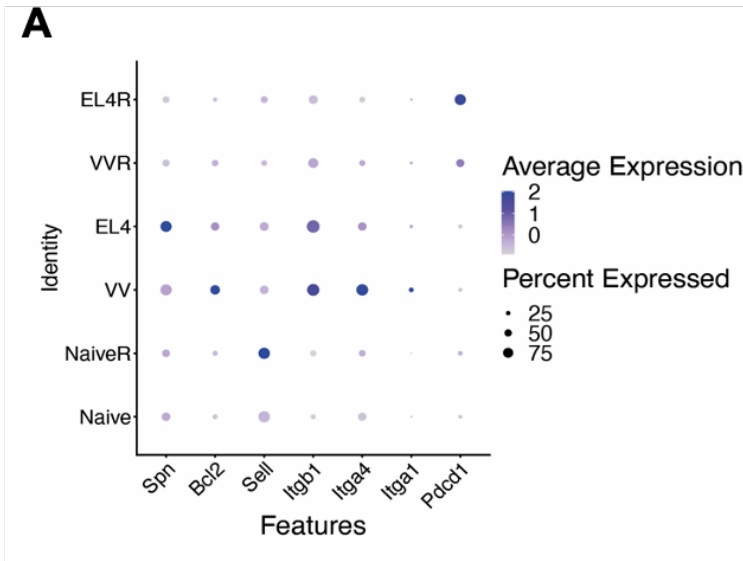
Supplementary figure 1: Effector and memory CD8 T cells generated after viral infection or tumor challenge differ in their phenotype

Naive F5 x CD45.1 ($2 \cdot 10^5$) cells were i.v. transferred in C57Bl/6J one day prior i.n. infection with VV-NP68 ($2 \cdot 10^5$ pfu) or s.c. injection of EL4-NP68 tumor cells ($2,5 \cdot 10^6$). CD49a (**A**) and CD62L (**B**) expression by VV- or EL4- induced F5 cells was analysed over time on blood (**A – left panel and B – top panel**) and 30 days after infection on the spleen (**A – right panel and B – bottom panel**). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (Mann-Whitney test). Data are represented as mean \pm SD and are representative of 2 or 3 independent experiments.

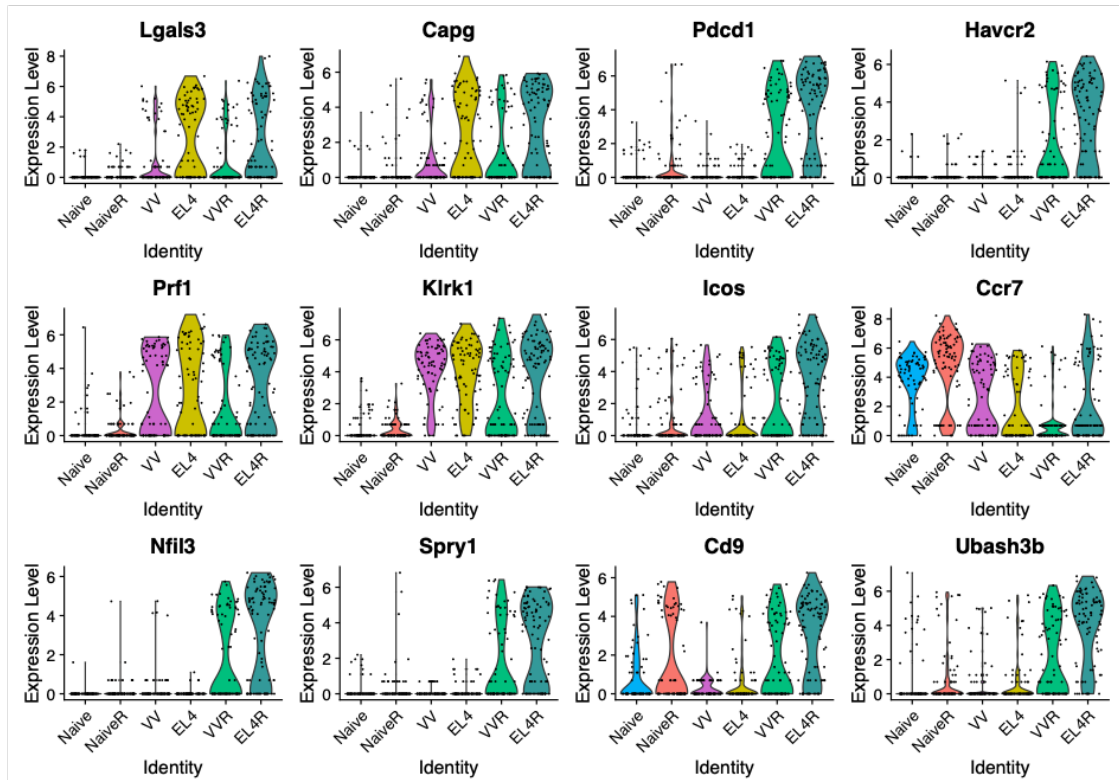


Supplementary figure 2: Memory CD8 T cells generated after viral infection or tumor challenge have a different phenotype in draining lymph node (dLN)

(A-C) Naive F5 x CD45.1 cells ($2 \cdot 10^5$) were i.v. transferred in C57Bl/6J one day prior i.n. infection with VV-NP68 ($2 \cdot 10^5$ pfu) or s.c. injection of EL4-NP68 tumor cells ($2,5 \cdot 10^6$). 35 days after infection, CD43/CD27 phenotype (A) as well as CD62L (B) and PD-1 (C) expression by VV- or EL4-induced F5 memory cells was analysed by flow cytometry on dLN. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney test). Data are represented as mean \pm SD and are representative of 2 independent experiments.

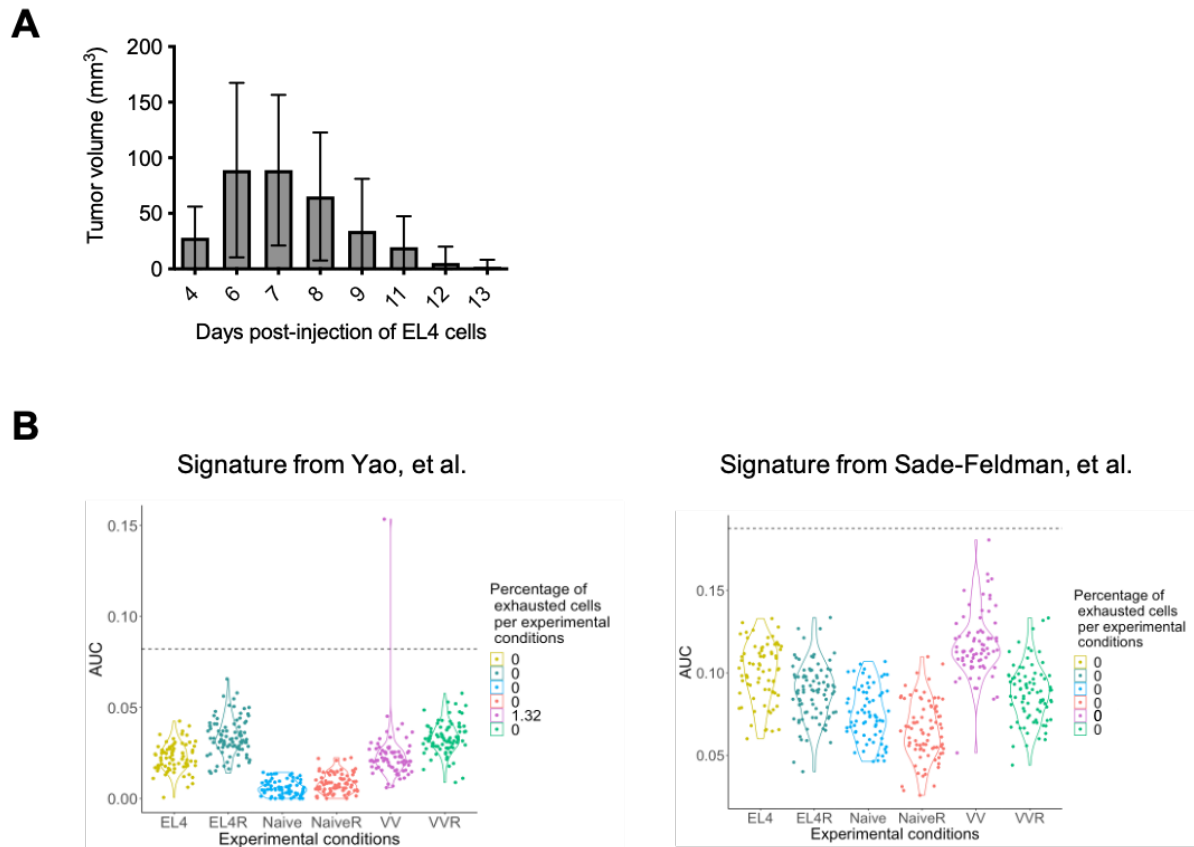


B



Supplementary figure 3: Single-cell RNA-seq analysis indicates differences in gene expression between F5 memory subsets.

(A) Expression of some representative genes across groups. The dot size reflects the percentage of cells within a group and the color represents the average expression level across all cells within a group (blue is high). (B) Violin plot showing the expression the genes differentially expressed by EL4 and EL4R cells across all groups.



Supplementary figure 4: (A) Naive F5 x CD45.1 (2.10^5) were i.v. transferred in C57Bl/6J one day prior s.c. injection of EL4-NP68 tumor cells ($2.5.10^6$). Tumor volume (mm^3) was assessed from 4 to 13 days post-injection of EL4 cells. $N = 20$ mice. Data are represented as mean \pm SD and are representative of 4 independent experiments. (B) GSEA analysis from scRNA-seq data. Enrichment of the exhausted CD8 signature from Yao, et al. (**left panel**) or Sade-Feldman, et al. (**right panel**) per experimental conditions (Sade-Feldman et al. 2018; Yao et al. 2019). The dotted line represents the threshold above which, cells are considered as exhausted. The legend indicates the percentage of exhausted cells in each experimental condition. AUC: area under the curve.

References

Aibar, Sara, Carmen Bravo González-Blas, Thomas Moerman, Vân Anh Huynh-Thu, Hana Imrichova, Gert Hulselmans, Florian Rambow, Jean-Christophe Marine, Pierre Geurts, Jan Aerts, Joost van den Oord, Zeynep Kalender Atak, Jasper Wouters, and Stein Aerts. 2017. "SCENIC: Single-Cell Regulatory Network Inference and Clustering." *Nature Methods* 14(11):1083–86. doi: 10.1038/nmeth.4463.

Bacher, Rhonda, Li-Fang Chu, Ning Leng, Audrey P. Gasch, James A. Thomson, Ron M. Stewart, Michael Newton, and Christina Kendzierski. 2017. "SCnorm: Robust Normalization of Single-Cell RNA-Seq Data." *Nature Methods* 14(6):584–86. doi: 10.1038/nmeth.4263.

Barber, Daniel L., E. John Wherry, and Rafi Ahmed. 2003. "Cutting Edge: Rapid In Vivo Killing by Memory CD8 T Cells." *The Journal of Immunology* 171(1):27–31. doi:

10.4049/jimmunol.171.1.27.

Becker, Todd C., E. John Wherry, David Boone, Kaja Murali-Krishna, Rustom Antia, Averil Ma, and Rafi Ahmed. 2002. "Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-Specific Memory CD8 T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 195(12):1541–48. doi: 10.1084/jem.20020369.

Beltra, Jean-Christophe, Sasikanth Manne, Mohamed S. Abdel-Hakeem, Makoto Kurachi, Josephine R. Giles, Zeyu Chen, Valentina Casella, Shin Foong Ngiow, Omar Khan, Yinghui Jane Huang, Patrick Yan, Kito Nzingha, Wei Xu, Ravi K. Amaravadi, Xiaowei Xu, Giorgos C. Karakousis, Tara C. Mitchell, Lynn M. Schuchter, Alexander C. Huang, and E. John Wherry. 2020. "Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms." *Immunity* 52(5):825-841.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.014.

Blackburn, Shawn D., Haina Shin, W. Nicholas Haining, Tao Zou, Creg J. Workman, Antonio Polley, Michael R. Betts, Gordon J. Freeman, Dario A. A. Vignali, and E. John Wherry. 2009. "Coregulation of CD8+ T Cell Exhaustion by Multiple Inhibitory Receptors during Chronic Viral Infection." *Nature Immunology* 10(1):29–37. doi: 10.1038/ni.1679.

de Brito, Christelle, Martine Tomkowiak, Raffaella Ghittoni, Christophe Caux, Yann Leverrier, and Jacqueline Marvel. 2011. "CpG Promotes Cross-Presentation of Dead Cell-Associated Antigens by Pre-CD8 α + Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* 186(3):1503–11. doi: 10.4049/jimmunol.1001022.

Chen, Huan-Yuan, Agnes Fermin, Santosh Vardhana, I.-Chun Weng, Kin Fong Robin Lo, En-Yuh Chang, Emanuel Maverakis, Ri-Yao Yang, Daniel K. Hsu, Michael L. Dustin, and Fu-Tong Liu. 2009. "Galectin-3 Negatively Regulates TCR-Mediated CD4 + T-Cell Activation at the Immunological Synapse." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(34):14496–501. doi: 10.1073/pnas.0903497106.

Chen, Zeyu, Zhicheng Ji, Shin Foong Ngiow, Sasikanth Manne, Zhangying Cai, Alexander C. Huang, John Johnson, Ryan P. Staube, Bertram Bengsch, Caiyue Xu, Sixiang Yu, Makoto Kurachi, Ramin S. Herati, Laura A. Vella, Amy E. Baxter, Jennifer E. Wu, Omar Khan, Jean-Christophe Beltra, Josephine R. Giles, Erietta Stelekati, Laura M. McLane, Chi Wai Lau, Xiaolu Yang, Shelley L. Berger, Golnaz Vahedi, Hongkai Ji, and E. John Wherry. 2019. "TCF-1-Centered Transcriptional Network Drives an Effector versus Exhausted CD8 T Cell-Fate Decision." *Immunity* 51(5):840-855.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2019.09.013.

Cho, Bryan K., Changyu Wang, Satoshi Sugawa, Herman N. Eisen, and Jianzhu Chen. 1999. "Functional Differences between Memory and Naive CD8 T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(6):2976–81. doi: 10.1073/pnas.96.6.2976.

Cole, Michael B., Davide Risso, Allon Wagner, David DeTomaso, John Ngai, Elizabeth Purdom, Sandrine Dudoit, and Nir Yosef. 2017. Performance Assessment and Selection of Normalization Procedures for Single-Cell RNA-Seq. preprint. *Genomics*. doi: 10.1101/235382.

Crauste, Fabien, Julien Mafille, Lilia Boucinha, Sophia Djebali, Olivier Gandrillon, Jacqueline Marvel, and Christophe Arpin. 2017. "Identification of Nascent Memory CD8 T Cells and Modeling of Their Ontogeny." *Cell Systems* 4(3):306-317.e4. doi:

10.1016/j.cels.2017.01.014.

Demotte, Nathalie, Grégoire Wieërs, Patrick Van Der Smissen, Muriel Moser, Christopher Schmidt, Kris Thielemans, Jean-Luc Squifflet, Birgit Weynand, Javier Carrasco, Christophe Lurquin, Pierre J. Courtoy, and Pierre van der Bruggen. 2010. "A Galectin-3 Ligand Corrects the Impaired Function of Human CD4 and CD8 Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Favors Tumor Rejection in Mice." *Cancer Research* 70(19):7476–88. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0761.

Dunn, Gavin P., Allen T. Bruce, Hiroaki Ikeda, Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2002. "Cancer Immunoediting: From Immunosurveillance to Tumor Escape." *Nature Immunology* 3(11):991–98. doi: 10.1038/ni1102-991.

Erickson, John J., Pengcheng Lu, Sherry Wen, Andrew K. Hastings, Pavlo Gilchuk, Sebastian Joyce, Yu Shyr, and John V. Williams. 2015. "Acute Viral Respiratory Infection Rapidly Induces a CD8+ T Cell Exhaustion-like Phenotype." *The Journal of Immunology* 195(9):4319–30. doi: 10.4049/jimmunol.1403004.

Fitzpatrick, David R., Kym M. Shirley, and Anne Kelso. 1999. "Cutting Edge: Stable Epigenetic Inheritance of Regional IFN- γ Promoter Demethylation in CD44^{high}CD8+ T Lymphocytes." *The Journal of Immunology* 162(9):5053–57. doi: 10.4049/jimmunol.162.9.5053.

Fourcade, Julien, Zhaojun Sun, Mourad Benallaoua, Philippe Guillaume, Immanuel F. Luescher, Cindy Sander, John M. Kirkwood, Vijay Kuchroo, and Hassane M. Zarour. 2010. "Upregulation of Tim-3 and PD-1 Expression Is Associated with Tumor Antigen-Specific CD8+ T Cell Dysfunction in Melanoma Patients." *Journal of Experimental Medicine* 207(10):2175–86. doi: 10.1084/jem.20100637.

Gilson, Rebecca C., Sachith D. Gunasinghe, Ludger Johannes, and Katharina Gaus. 2019. "Galectin-3 Modulation of T-Cell Activation: Mechanisms of Membrane Remodelling." *Progress in Lipid Research* 76:101010. doi: 10.1016/j.plipres.2019.101010.

Goldrath, Ananda W., Pallavur V. Sivakumar, Moira Glaccum, Mary K. Kennedy, Michael J. Bevan, Christophe Benoist, Diane Mathis, and Eric A. Butz. 2002. "Cytokine Requirements for Acute and Basal Homeostatic Proliferation of Naive and Memory CD8+ T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 195(12):1515–22. doi: 10.1084/jem.20020033.

Grau, Morgan, Séverine Valsesia, Julien Mafille, Sophia Djebali, Martine Tomkowiak, Anne-Laure Mathieu, Daphné Laubretton, Simon de Bernard, Pierre-Emmanuel Jouve, Erwan Ventre, Laurent Buffat, Thierry Walzer, Yann Leverrier, and Jacqueline Marvel. 2018. "Antigen-Induced but Not Innate Memory CD8 T Cells Express NKG2D and Are Recruited to the Lung Parenchyma upon Viral Infection." *The Journal of Immunology* 200(10):3635–46. doi: 10.4049/jimmunol.1701698.

Hashimoto, Masao, Alice O. Kamphorst, Se Jin Im, Haydn T. Kissick, Rathi N. Pillai, Suresh S. Ramalingam, Koichi Araki, and Rafi Ahmed. 2018. "CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions." *Annual Review of Medicine* 69(1):301–18. doi: 10.1146/annurev-med-012017-043208.

Hikono, Hirokazu, Jacob E. Kohlmeier, Shiki Takamura, Susan T. Wittmer, Alan D.

Roberts, and David L. Woodland. 2007. "Activation Phenotype, Rather than Central- or Effector-Memory Phenotype, Predicts the Recall Efficacy of Memory CD8+ T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 204(7):1625–36. doi: 10.1084/jem.20070322.

Hudson, William H., Julia Gensheimer, Masao Hashimoto, Andreas Wieland, Rajesh M. Valanparambil, Peng Li, Jian-Xin Lin, Bogumila T. Konieczny, Se Jin Im, Gordon J. Freeman, Warren J. Leonard, Haydn T. Kissick, and Rafi Ahmed. 2019. "Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1+ Stem-like CD8+ T Cells during Chronic Infection." *Immunity* 51(6):1043-1058.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2019.11.002.

Jameson, Stephen C. 2021. "The Naming of Memory T-Cell Subsets." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 13(1):a037788. doi: 10.1101/cshperspect.a037788.

Jiang, Senwei, Yuebo Yang, Yu Zhang, Qingjian Ye, Jiao Song, Min Zheng, and Xiaomao Li. 2022. "Overexpression of CAPG Is Associated with Poor Prognosis and Immunosuppressive Cell Infiltration in Ovarian Cancer" edited by Z. Shi. *Disease Markers* 2022:1–18. doi: 10.1155/2022/9719671.

Jiang, Y., Y. Li, and B. Zhu. 2015. "T-Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment." *Cell Death & Disease* 6(6):e1792–e1792. doi: 10.1038/cddis.2015.162.

Joo, Hong-Gu, Peter S. Goedegebuure, Noriaki Sadanaga, Makoto Nagoshi, Wolfram von Bernstorff, and Timothy J. Eberlein. 2001. "Expression and Function of Galectin-3, a B-galactoside-binding Protein in Activated T Lymphocytes." *Journal of Leukocyte Biology* 69(4):555–64. doi: 10.1189/jlb.69.4.555.

Jubin, Virginie, Erwan Ventre, Yann Leverrier, Sophia Djebali, Katia Mayol, Martine Tomkowiak, Julien Mafille, Marie Teixeira, Denise Y. L. Teoh, Bruno Lina, Thierry Walzer, Christophe Arpin, and Jacqueline Marvel. 2012. "T Inflammatory Memory CD8 T Cells Participate to Antiviral Response and Generate Secondary Memory Cells with an Advantage in XCL1 Production." *Immunologic Research* 52(3):284–93. doi: 10.1007/s12026-012-8340-4.

Kaur, Manpreet, Dhaneshwar Kumar, Vincent Butty, Sudhakar Singh, Alexandre Esteban, Gerald R. Fink, Hidde L. Ploegh, and Sharvan Sehrawat. 2018. "Galectin-3 Regulates γ -Herpesvirus Specific CD8 T Cell Immunity." *IScience* 9:101–19. doi: 10.1016/j.isci.2018.10.013.

Koebel, Catherine M., William Vermi, Jeremy B. Swann, Nadeen Zerafa, Scott J. Rodig, Lloyd J. Old, Mark J. Smyth, and Robert D. Schreiber. 2007. "Adaptive Immunity Maintains Occult Cancer in an Equilibrium State." *Nature* 450(7171):903–7. doi: 10.1038/nature06309.

Kouo, Theodore, Lanqing Huang, Alexandra B. Pucsek, Minwei Cao, Sara Solt, Todd Armstrong, and Elizabeth Jaffee. 2015. "Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells." *Cancer Immunology Research* 3(4):412–23. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0150.

Lalvani, Ajit, Roger Brookes, Sophie Hambleton, Warwick J. Britton, Adrian V. S. Hill, and Andrew J. McMichael. 1997. "Rapid Effector Function in CD8 α Memory T Cells." *J. Exp. Med* 859–65.

Lun, Aaron T. L., Davis J. McCarthy, and John C. Marioni. 2016. "A Step-by-Step Workflow for Low-Level Analysis of Singlecell RNA-Seq Data with Bioconductor." *F1000*

Research, 5:2122.

Mackay, C. R., W. L. Marston, and L. Dudler. 1990. "Naive and Memory T Cells Show Distinct Pathways of Lymphocyte Recirculation." *Journal of Experimental Medicine* 171(3):801–17. doi: 10.1084/jem.171.3.801.

Marçais, Antoine, Charles-Antoine Coupet, Thierry Walzer, Martine Tomkowiak, Raffaella Ghittoni, and Jacqueline Marvel. 2006. "Cell-Autonomous CCL5 Transcription by Memory CD8 T Cells Is Regulated by IL-4." *The Journal of Immunology* 177(7):4451–57. doi: 10.4049/jimmunol.177.7.4451.

Masopust, David, Vaiva Vezys, Amanda L. Marzo, and Leo Lefrançois. 2001. "Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue." *Science* 291(5512):2413–17. doi: 10.1126/science.1058867.

Nguyen, Linh T., and Pamela S. Ohashi. 2015. "Clinical Blockade of PD1 and LAG3 — Potential Mechanisms of Action." *Nature Reviews Immunology* 15(1):45–56. doi: 10.1038/nri3790.

Olson, Janelle A., Cameron McDonald-Hyman, Stephen C. Jameson, and Sara E. Hamilton. 2013. "Effector-like CD8+ T Cells in the Memory Population Mediate Potent Protective Immunity." *Immunity* 38(6):1250–60. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.009.

Petit, Anne-Elisabeth, Nathalie Demotte, Benoît Scheid, Claude Wildmann, René Bigirimana, Monica Gordon-Alonso, Javier Carrasco, Salvatore Valitutti, Danièle Godelaine, and Pierre van der Bruggen. 2016. "A Major Secretory Defect of Tumour-Infiltrating T Lymphocytes Due to Galectin Impairing LFA-1-Mediated Synapse Completion." *Nature Communications* 7(1):12242. doi: 10.1038/ncomms12242.

Phipson, Belinda, Stanley Lee, Ian J. Majewski, Warren S. Alexander, and Gordon K. Smyth. 2016. "Robust Hyperparameter Estimation Protects against Hypervariable Genes and Improves Power to Detect Differential Expression." *The Annals of Applied Statistics* 10(2). doi: 10.1214/16-AOAS920.

Picelli, Simone, Omid R. Faridani, Åsa K. Björklund, Gösta Winberg, Sven Sagasser, and Rickard Sandberg. 2014. "Full-Length RNA-Seq from Single Cells Using Smart-Seq2." *Nature Protocols* 9(1):171–81. doi: 10.1038/nprot.2014.006.

Pihlgren, Maria, Patrice M. Dubois, Martine Tomkowiak, Tove Sjögren, and Jacqueline Marvel. n.d. "Resting Memory CD8 α T Cells Are Hyperreactive to Antigenic Challenge In Vitro."

Raskov, Hans, Adile Orhan, Jan Pravsgaard Christensen, and Ismail Gögenur. 2021. "Cytotoxic CD8+ T Cells in Cancer and Cancer Immunotherapy." *British Journal of Cancer* 124(2):359–67. doi: 10.1038/s41416-020-01048-4.

Sade-Feldman, Moshe, Keren Yizhak, Stacey L. Bjorgaard, John P. Ray, Carl G. de Boer, Russell W. Jenkins, David J. Lieb, Jonathan H. Chen, Dennie T. Frederick, Michal Barzily-Rokni, Samuel S. Freeman, Alexandre Reuben, Paul J. Hoover, Alexandra-Chloé Villani, Elena Ivanova, Andrew Portell, Patrick H. Lizotte, Amir R. Aref, Jean-Pierre Eliane, Marc R. Hammond, Hans Vitzthum, Shauna M. Blackmon, Bo Li, Vancheswaran Gopalakrishnan, Sangeetha M. Reddy, Zachary A. Cooper, Cloud P. Paweletz, David A. Barbie, Anat Stemmer-Rachamimov, Keith T. Flaherty, Jennifer A. Wargo, Genevieve M. Boland, Ryan J. Sullivan, Gad Getz, and Nir Hacohen.

2018. "Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma." *Cell* 175(4):998-1013.e20. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.038.

Sallusto, Federica, Danielle Lenig, and Antonio Lanzavecchia. 1999. "Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions." 401.

Shankaran, Vijay, Hiroaki Ikeda, Allen T. Bruce, J. Michael White, Paul E. Swanson, Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2001. "IFN γ and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity." 410.

Silacci, P., L. Mazzolai, C. Gauci, N. Stergiopoulos, H. L. Yin, and D. Hayoz. 2004. "Gelsolin Superfamily Proteins: Key Regulators of Cellular Functions." *Cellular and Molecular Life Sciences* 61(19-20):2614-23. doi: 10.1007/s00018-004-4225-6.

Smith, Logan K., Giselle M. Boukhaled, Stephanie A. Condotta, Sabrina Mazouz, Jenna J. Guthmiller, Rahul Vijay, Noah S. Butler, Julie Bruneau, Naglaa H. Shoukry, Connie M. Krawczyk, and Martin J. Richer. 2018. "Interleukin-10 Directly Inhibits CD8 $^{+}$ T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity." *Immunity* 48(2):299-312.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.006.

Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Pérarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. "Differential Requirements for Survival and Proliferation of CD8 Naïve or Memory T Cells." *Science (New York, N.Y.)* 276(5321):2057-62. doi: 10.1126/science.276.5321.2057.

Thommen, Daniela S., and Ton N. Schumacher. 2018. "T Cell Dysfunction in Cancer." *Cancer Cell* 33(4):547-62. doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.012.

Walzer, Thierry, Antoine Marçais, Frédéric Saltel, Chantal Bella, Pierre Jurdic, and Jacqueline Marvel. 2003. "Cutting Edge: Immediate RANTES Secretion by Resting Memory CD8 T Cells Following Antigenic Stimulation." *The Journal of Immunology* 170(4):1615-19. doi: 10.4049/jimmunol.170.4.1615.

Wherry, E. John. 2011. "T Cell Exhaustion." *Nature Immunology* 12(6):492-99. doi: 10.1038/ni.2035.

Wherry, E. John, Sang-Jun Ha, Susan M. Kaech, W. Nicholas Haining, Surojit Sarkar, Vandana Kalia, Shruti Subramaniam, Joseph N. Blattman, Daniel L. Barber, and Rafi Ahmed. 2007. "Molecular Signature of CD8 $^{+}$ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection." *Immunity* 27(4):670-84. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.006.

Wherry, E. John, Volker Teichgräber, Todd C. Becker, David Masopust, Susan M. Kaech, Rustom Antia, Ulrich H. von Andrian, and Rafi Ahmed. 2003. "Lineage Relationship and Protective Immunity of Memory CD8 T Cell Subsets." *Nature Immunology* 4(3):225-34. doi: 10.1038/ni889.

Yao, Chen, Hong-Wei Sun, Neal E. Lacey, Yun Ji, E. Ashley Moseman, Han-Yu Shih, Elisabeth F. Heuston, Martha Kirby, Stacie Anderson, Jun Cheng, Omar Khan, Robin Handon, Julie Reilly, Jessica Fioravanti, Jinhui Hu, Selamawit Gossa, E. John Wherry, Luca Gattinoni, Dorian B. McGavern, John J. O'Shea, Pamela L. Schwartzberg, and Tuoqi Wu. 2019. "Single-Cell RNA-Seq Reveals TOX as a Key Regulator of CD8 $^{+}$ T Cell Persistence in Chronic Infection." *Nature Immunology* 20(7):890-901. doi: 10.1038/s41590-019-0403-4.

Youngblood, Ben, J. Scott Hale, and Rafi Ahmed. 2015. "Memory CD8 T Cell

Transcriptional Plasticity.” F1000Prime Reports 7. doi: 10.12703/P7-38.

Zhang, Martin Jinye, Vasilis Ntranos, and David Tse. 2020. “Determining Sequencing Depth in a Single-Cell RNA-Seq Experiment.” *Nature Communications* 11(1):774. doi: 10.1038/s41467-020-14482-y.

Zhang, Zhen, Shasha Liu, Bin Zhang, Liang Qiao, Yi Zhang, and Yi Zhang. 2020. “T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8:17. doi: 10.3389/fcell.2020.00017.

Zhu, Chen, Kaori Sakuishi, Sheng Xiao, Zhiyi Sun, Sarah Zaghouani, Guangxiang Gu, Chao Wang, Dewar J. Tan, Chuan Wu, Manu Rangachari, Thomas Pertel, Hyun-Tak Jin, Rafi Ahmed, Ana C. Anderson, and Vijay K. Kuchroo. 2015. “An IL-27/NFIL3 Signalling Axis Drives Tim-3 and IL-10 Expression and T-Cell Dysfunction.” *Nature Communications* 6(1):6072. doi: 10.1038/ncomms7072.

Discussion

Les voies de différenciation des LT CD8 et la diversité des populations résultantes sont très largement étudiées depuis des années. Les questions scientifiques portent à la fois sur le stade auquel les cellules précurseurs de la mémoire sont générées, sur les acteurs moléculaires pouvant influencer le devenir des cellules vers le destin effecteur ou mémoire ou encore sur la qualité des mémoires générées. La grande majorité des modèles de différenciation ont été établis sur la base d'analyses phénotypiques et transfert de cellules parfois en association avec des analyses de transcriptomique en population (Beltra et al. 2020; Hudson et al. 2019; Joshi et al. 2007; Kaech et al. 2003; Opferman et al. 1999; Plumlee et al. 2015). L'essor de la transcriptomique en cellule unique (scRNA-seq) a permis de suivre les changements transcriptomiques dans les cellules individuelles et ainsi raffiner les populations, dévoiler les transitions entre celles-ci ou encore révéler des régulateurs de la différenciation pouvant mener à différentes qualités de mémoires T CD8 (Chen et al. 2019; Johnnidis et al. 2021; Kakaradov et al. 2017; Yao et al. 2019).

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier la différenciation des LT CD8 mémoires à l'échelle de la cellule unique.

Dans un premier temps, je me suis intéressée au stade auquel les LT CD8 précurseurs de la mémoire sont générés *in vivo* et également *in vitro*.

Dans un second temps, j'ai étudié la qualité des LT CD8 mémoires générées soit dans un contexte d'infection virale ou après un challenge tumoral transitoire.

I. LA DIFFERENCIATION DES LT CD8 *IN VIVO* ET *IN VITRO*

1. Identification du stade auquel les précurseurs de la mémoire sont générés

Pour la première partie de mon travail, nous avons souhaité revisiter la question concernant les étapes auxquels sont générées les précurseurs de la mémoire après une infection en utilisant des approches de single-cell RNA-seq et des outils de *machine learning*. Pour cela, nous avons réanalysé un jeu de données de scRNA-seq existant comprenant des LT CD8 effecteurs triés à partir de rate de souris 4,5 et 7 jours après une infection par LCMV-Armstrong (LCMV-A), générant une infection aigue (Yao et al. 2019). Nous avons utilisé des outils d'inférence de trajectoire et de vélocité d'ARN qui ont permis de reconstruire la dynamique de différenciation des LT CD8 activés. Ces résultats ont montré que la trajectoire était définie par la variation d'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et de la réponse immunitaire. En effet, les LT CD8 après 4,5 jours correspondaient à des cellules en cycle exprimant des gènes liés à l'activation et commençant à exprimer ceux associés aux fonctions effectrices. Au pic de l'infection, soit 7 jours après l'infection, les LT CD8 exprimant pleinement les gènes des fonctions effectrices

peuvent être scindés en 2 populations sur la base du cycle cellulaire. En effet, certaines continuaient de proliférer alors que d'autres étaient entrées en quiescence. Nous pouvons faire le parallèle avec l'étude de Crauste, et al. qui a démontré que le stade effecteur était composé de deux populations : une population d'effecteurs précoces exprimant le marqueur de prolifération Ki67, puis une population de cellules effectrices apparaissant plus tardivement qui perd l'expression de cette protéine. Nos données montrent que les cellules effectrices quiescentes n'expriment plus le gène Mki67, de ce fait pouvant les définir comme des effecteurs tardifs (**Figure 21**).

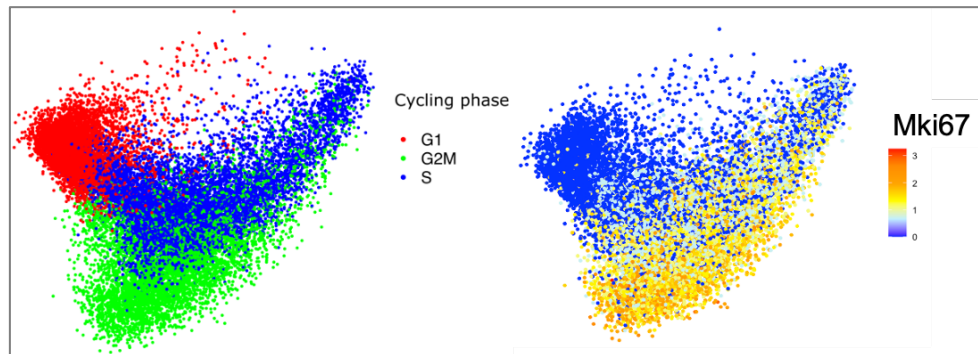


FIGURE 21 : CLASSIFICATION DES CELLULES DANS LES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE ET EXPRESSION DE MKI67

A gauche : classification par bio-informatique des LT CD8 dans une des phases du cycle cellulaire. Les cellules sont projetées sur une réduction de dimension par MDS (multidimensional scaling). A droite : expression du gène Mki67 sur cette réduction de dimension.

Le réseau de corrélation des gènes trouvés dans les données a permis de mettre en évidence un module dont l'un des principaux FT était Tcf7 codant pour la protéine TCF1. Des études ont montré que la persistance de ce FT était associée à des cellules précurseurs de la mémoire (Lin et al. 2016; Pais Ferreira et al. 2020). L'analyse d'enrichissement a confirmé la présence de cellules avec un profil transcriptomique associé aux précurseurs de la mémoire. Nos résultats ont montré que la génération des cellules précurseurs de la mémoire était un processus continu. En effet, des précurseurs de la mémoire étaient détectés précocement c'est-à-dire 4,5 jours après l'infection mais également plus tardivement soit 7 jours après l'infection. Ces résultats ont été également confirmés avec un deuxième jeu de données de scRNA-seq dans lequel les précurseurs de la mémoire étaient trouvés 4, 5, 6, 7 et 10 jours après une infection par LCMV-A (Kurd et al. 2020).

Kinjyo, et al. ont utilisé des souris Fucci, un système intégrant des sondes fluorescentes codées génétiquement qui marquent les phases G1 et S/G2/M du cycle cellulaire (Kinjyo et al. 2015). Grâce à ce système, ils ont montré qu'une petite population de précurseurs des TCM (CD44⁺ CD62L⁺) à cycle lent, c'est-à-dire correspondant à des cellules dans la phase G1, était présente 7 jours après infection par le virus *Influenza A*. Ils démontrent ensuite que cette population de précurseurs dérive de cellules qui ont hautement proliféré. Nos analyses de scRNA-seq ont montré un nombre augmenté de précurseurs de la mémoire au cours du temps. De plus, notre

analyse quantitative à l'aide de BrdU, a démontré qu'une proportion plus importante de cellules mémoires était générée à partir de cellules qui ont largement proliféré. Ainsi, les précurseurs de la mémoire dérivent de LT CD8 ayant hautement proliférés en accord avec l'étude de Kinjyo, et al. (Kinjyo et al. 2015).

Nos données montrent que les cellules précurseurs de la mémoire qui se sont divisées entre les jours 4 et 7 puis qui sont devenues quiescentes ont acquis l'expression des gènes des fonctions effectrices contrairement aux précurseurs de la mémoire quiescentes au jour 4. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par les études de Lin, et al. et de Bresser, et al., (Bresser et al. 2022; Lin et al. 2016). En effet, l'étude de Lin, et al. montre que les cellules précurseurs TCF1⁺ peuvent devenir quiescentes après 3 ou 4 divisions ou continuer à proliférer tout en gardant l'expression de TCF1 (Lin et al. 2016). Les précurseurs TCF1⁺ les plus divisées présentent alors un phénotype semblable aux effecteurs et expriment notamment de plus fort niveau de T-bet et d'IFN γ à la différence des précurseurs les moins divisées. Bresser, et al. ont étudié le passé réplicatif des LT CD8 mémoires à l'aide d'un système Cre-Lox permettant « d'enregistrer » en continu la prolifération des cellules (Bresser et al. 2022). Ce système est basé sur de courtes répétitions en tandem (STR) synthétiques qui accumulent des mutations d'insertion par glissement de l'ADN polymérase au cours de la division cellulaire. Ces mutations peuvent induire un changement du cadre de lecture permettant l'expression de la Cre recombinase initialement positionnée dans un mauvais cadre de lecture. L'expression de la Cre entraîne dans un second temps l'expression du gène de la RFP (red fluorescent protein) dont l'expression était inhibée par un codon stop « loxer ». Ils ont montré par des analyses de scRNA-seq que le pool de mémoires TCM se distinguait par l'expression de 2 signatures ainsi qu'un passé prolifératif différent : un des sous-ensembles de TCM exprimait davantage les gènes associés à la multipotence et s'était moins divisé alors que le 2^e sous-ensemble avait davantage proliféré et était enrichi en gènes effecteurs.

Notre étude *in vivo* à l'aide de BrdU a permis de mettre en évidence que les cellules précurseurs de la mémoire qui arrêtaient de cycliser au cours de la phase effectrice, persistaient et contribuaient au pool de LT mémoires puisqu'elles maintenaient leur marquage BrdU. Avec cette méthode, nous avons pu caractériser par cytométrie en flux les mémoires générées 4 et 7 jours après infection et avons trouvé uniquement une différence d'expression de CCL5. Toutefois, notre étude protéomique est limitée par le nombre de paramètres mesurables en cytométrie en flux. De plus, les données de scRNA-seq montraient que les précurseurs de la mémoire quiescents tardifs exprimaient davantage le gène *Gzmb*. Cependant, l'expression du *Gzmb* n'était pas détectable après 2H de stimulation *in vitro* des LT mémoires BrdU⁺ dérivés des jour 4 et 7 (**Figure 22**).

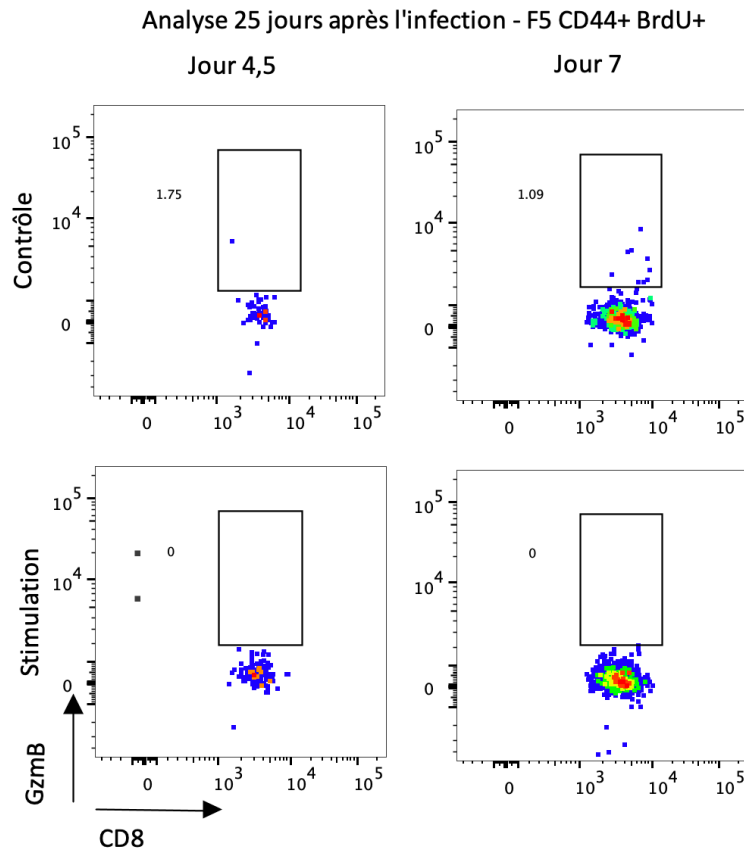


FIGURE 22 : ANALYSE PAR FACS DE L'EXPRESSION DU GZMB PAR LES MEMOIRES BRDU⁺

Panel du haut : analyse de l'expression du Gzmb par les mémoires F5 CD44+ BrdU+ après 2h après du milieu de culture.

Panel du bas : analyse de l'expression du Gzmb par les mémoires F5 CD44+ BrdU+ après 2h de stimulation avec le peptide NP68 (10nM).

A gauche : expression du Gzmb par les mémoires BrdU+ dérivés du jour 4.

A droite : expression du Gzmb par les mémoires BrdU+ dérivés du jour 7.

Il serait intéressant de réaliser un scRNA-seq afin de comparer le transcriptome de ces LT CD8 mémoires dérivés précocement ou tardivement. Cependant, le marquage au BrdU implique la perméabilisation des cellules ce qui est incompatible avec les protocoles de scRNA-seq réalisés dans l'équipe. Cependant, de nouveaux protocoles ont été développés notamment le INS-seq intégrant une étape de fixation et perméabilisation des cellules afin de mesurer l'expression de protéines intracellulaires (cytoplasmiques et nucléaires) tout en ayant accès au transcriptome au niveau de la cellule unique (Katzenelenbogen et al. 2020). Nous pourrions tester ce protocole avec un marquage au BrdU en s'assurant que la méthode de perméabilisation du protocole INS-Seq soit suffisante pour une lecture optimale de la fluorescence du BrdU.

Les résultats montrant que les précurseurs de la mémoire dérivant de LT ayant hautement proliférés et acquérant les fonctions effectrices suggèrent une acquisition progressive de modifications épigénétiques qui conduisent à un état de transcription

« poised » au niveau des locus des gènes effecteurs dans les LT CD8 mémoires. Ces changements d'état de la chromatine pourraient ainsi refléter la nécessité que les cellules se divisent. Pace, et al. ont mis en évidence par scRNA-seq sur des LT CD8 7 jours après infection par *L. monocytogenes*, une sous-population de cellules en cycle exprimant à la fois des gènes associés au cycle, aux précurseurs de la mémoire et aux effecteurs (Pace et al. 2018). Leur hypothèse est que ces cellules pourraient représenter des intermédiaires bipotents pouvant réprimer les gènes effecteurs ou précurseurs de la mémoire. Ils ont montré que la répression des gènes précurseurs de mémoires était sous le contrôle de Suv39h1 induisant ainsi le développement de LT CD8 effecteurs terminaux. Ainsi, les cellules effectrices dérivent de cellules en cycle qui modifient leur programme épigénétique et répriment les gènes associés au développement des cellules mémoires.

Dans notre analyse, nous avons observé que les cellules précurseurs de la mémoire, en cours de cycle, exprimaient des gènes tels que *Zbtb32* et *Ezh2*. Comme déjà évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, *Ezh2* est une enzyme appartenant au complexe PRC2 (Polycomb repressive complex 2). Elle induit le dépôt de marque de méthylation au niveau des histones H3K27 et réprime les gènes pro-mémoires favorisant la différenciation en LT effecteurs (Gray et al. 2017). *Zbtb32* est un facteur de transcription qui est transitoirement exprimé dans les LT CD8 après une infection aiguë (Shin et al. 2017). Il agit comme un régulateur de l'ampleur des réponses T effectrices ainsi que la génération de mémoire par répression de gènes tels que *Eomes* et *CD27*. Ainsi, les précurseurs de la mémoire quiescents ayant acquis les gènes des fonctions effectrices pourraient dériver de ces précurseurs. Ces cellules pourraient donc être des cellules bipotentes permettant la génération de cellules gardant un caractère souche n'activant pas complètement les fonctions effectrices, et de cellules perdant ce caractère et activant pleinement les fonctions effectrices.

D'autres études ont montré qu'il existerait des cellules possédant des caractéristiques bipotentes. Notamment, Kinjyo, et al. ont montré qu'il existait précocement (jour 4 après infection par le virus Influenza) une population exprimant à des niveaux intermédiaires la protéine CD62L (CD62L^{int}) (Kinjyo et al. 2015). Le transfert de ces cellules dans des hôtes infectés montre qu'elles continuaient de proliférer et pouvaient générer à la fois des cellules CD62L⁻ et CD62L⁺.

Ces études suggèrent alors que les cellules perdent leur bipotentiel lorsqu'elles continuent de se diviser. Toutefois, bien que les précurseurs de la mémoire perdent leur capacité à devenir des effecteurs terminaux, elles gardent leur capacité d'auto-renouvellement et à réactiver les fonctions effectrices. Soerens, et al. ont examiné si les LT CD8 étaient limités dans leur potentiel de division cellulaire au fil de stimulations successives (Soerens et al. 2023). Pour cela, les auteurs ont activé des LT avec trois immunisations de rappels hétérologues à des intervalles supérieurs à 60 jours puis cette 3^e population de mémoires a été transféré dans des hôtes qui ont reçu de nouveau 3 immunisations successives. Ils ont ainsi répété ce processus pendant 10 ans, totalisant 51 événements de vaccinations cumulées. Ils ont montré que la population de départ pouvait s'expandre au moins 10⁴⁰ fois sans perte de capacité de

prolifération. Cette étude démontre donc que les cellules T gardent une certaine multipotence par leur potentiel à s'auto-renouveler et à rappeler les fonctions effectrices. En conséquence, la présence de cellules bipotentes n'est pas en faveur d'un engagement précoce vers un destin effecteur ou mémoire.

2. L'IL-2 : régulateur du processus de génération de précurseurs de la mémoire

Pour la seconde partie, nous avons souhaité étudier l'impact de l'IL-2 sur la différenciation des LT CD8. Cette cytokine agit aux étapes précoces d'activation et de différenciation des cellules T CD8. Shaoying Wang, étudiante en thèse dans l'équipe a mis au point un modèle d'activation des T CD8 *in vitro*. Pour cela, les LT CD8 naïfs ont été activés en présence de cellules dendritiques maturées avec du CpG et présentant le complexe CMH-I/peptide NP68-(366-374) aux LT avec ou sans ajout d'IL-2 exogène (IL-2ex). Les cellules ont été ainsi analysées après 3 jours d'activation et jusqu'à 5 jours, au-delà, la population décroît et meurt par apoptose.

Avec ce modèle, nous avons ainsi étudié l'impact de l'IL-2ex sans s'affranchir de l'IL-2 produit intrinsèquement par les LT CD8. L'IL-2 intrinsèque (IL-2int) est surtout requise pour l'expansion secondaire des LT CD8 mémoires comme l'ont démontré plusieurs études (Feau et al. 2011; Redeker et al. 2015; Toumi et al. 2022). Le dosage de l'IL-2 dans le surnageant de culture montrent que les LT CD8 cultivées sans IL-2ex produisaient de l'IL-2 et l'utilisaient puisque la concentration diminuait au cours du temps. Toutefois, ce signal autocrine ne suffisait pas à maintenir l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2, CD25, qui décroissait au cours du temps. Kahan, et al. ont montré qu'une fraction des LT CD8 était capable de produire de l'IL-2 et que celle-ci avait une capacité diminuée à activer la voie STAT5 dépendante de l'IL-2 induisant notamment la surexpression de CD25 à la surface des cellules (Kahan et al. 2022). Ces cellules adoptaient ainsi plus rapidement un phénotype mémoire.

In vivo, l'IL-2ex est majoritairement produit par les LT CD4 et agit ainsi de manière paracrine sur les LT CD8. Toumi, et al. ont montré que l'IL-2 paracrine permettait d'induire l'expansion et la différenciation en effecteurs (Toumi et al. 2022). Nous avons réalisé un scRNA-seq sur les cellules naïves et activées après 3, 4 ou 5 jours *in vitro* en présence ou absence d'IL-2ex. Nous avons pu observer une séparation des cellules avec et sans IL-2ex après 4 jours d'activation avec une superposition des cellules du jour 4 et 5. Au 3^e jour après activation, le transcriptome des cellules avec et sans IL-2ex était encore similaire. Cependant, les cellules de ce jour étaient réparties dans 2 clusters. L'analyse d'enrichissement à l'aide de signatures a montré que les cellules cultivées sans IL-2ex après 4 et 5 jours d'activation étaient enrichies en cellules précurseurs de la mémoire quiescentes. A l'inverse, celles cultivées avec l'IL-2ex étaient associées à des cellules effectrices en cycle. Toutefois, un des clusters composés de cellules du jour 3 était également enrichi en T effecteurs. Ainsi, même en absence d'IL-2ex, les cellules peuvent passer par un stade effecteur avant une quiescence précoce et l'acquisition rapide d'un phénotype précurseur de la mémoire comme l'a démontré l'analyse de vitesses des ARN. Il semblerait qu'elles puissent néanmoins contourner ce stade effecteur. Au contraire,

au jour 3, les cellules cultivées avec de l'IL-2ex se différencient en direction des cellules effectrices des jours 4 et 5. Ces résultats ont été confirmés par cytométrie en flux (**Figure 23**). L'IL-2ex favorisait ainsi la différenciation en cellules effectrices (augmentation de Gzmb, augmentation de la capacité de lyse et diminution du marqueur de pro-mémoire TCF1) en accord avec les études de Toumi, et al. et Kalia, et al., (Kalia et al. 2010; Toumi et al. 2022). L'IL-2ex est également capable de générer de meilleurs sous-ensembles d'effecteurs T CD8 dans un contexte d'infection chronique ou de tumeurs ressemblant aux LT CD8 effecteurs d'une infection aiguë. En effet, Hashimoto, et al. ainsi que Codarri Deak, et al. ont montré qu'une thérapie IL-2 combinée au blocage de PD1 lors d'une infection chronique ou dans un contexte tumoral modifie le programme de différenciation des précurseurs de LT épuisés. Ceux-ci augmentent en nombre et acquièrent de meilleures fonctions effectrices (Gzmb, TNF α , IFN γ) permettant une réponse antivirale et antitumorale améliorée (Codarri Deak et al. 2022; Hashimoto et al. 2022).

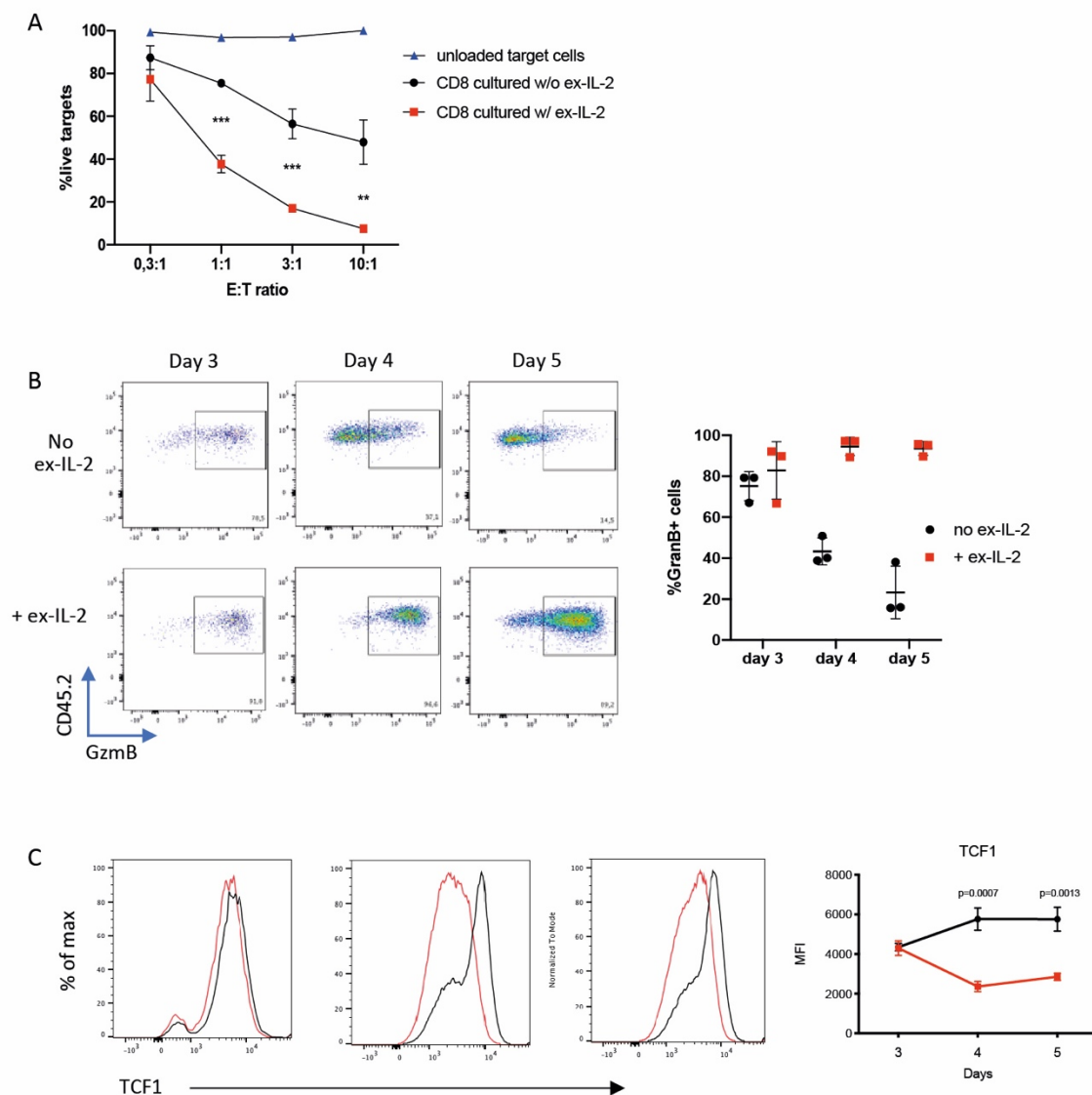


FIGURE 23 : EVALUATION DES FONCTIONS EFFECTRICES ENTRE LES LT CD8 ACTIVES EN PRESENCE OU ABSENCE D'IL-2EX

1.5×10^5 LT CD8 naïfs ont été activés avec des DC maturés avec du CpG et chargés de peptide NP68 (ratio DC:CD8 = 1:10), en présence et absence d'IL-2ex. **A.** Pourcentages de cellules cibles EL4 vivantes, chargées (points noirs et rouges) ou non (triangles bleus, « unloaded ») en peptide NP68, après 4h de coculture avec des LT CD8 effecteurs activés pendant 5 jours. w/o = sans IL-2ex, w/ = avec IL-2ex ; ratio E:T = LT effecteurs/cellules cibles EL4. La signification statistique des différences a été déterminée par le test de comparaison multiple de Sidak entre les LT F5 CD8 cultivées avec ou sans IL-2ex à chaque rapport E:T (** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$).

B. Expression de granzyme B (GzmB) par les LT F5 CD8 après 3, 4 et 5 jours d'activation. Les résultats représentent la moyenne des triplicats \pm SD et sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. **C.** Expression de TCF1 par les LT F5 CD8 divisés après 3, 4 et 5 jours d'activation. La signification statistique des différences a été déterminée par un test de student.

Toumi, et al. ont également observé que l'IL-2 paracrine était suffisante pour la formation de cellules mémoires (Toumi et al. 2022). Nous avons observé que les cellules cultivées avec ou sans IL-2ex étaient capables de générer des cellules mémoires après transfert dans des hôtes naïfs. Les deux conditions de culture permettent donc de générer des précurseurs de la mémoire. En effet, basé sur l'expression de la signature de précurseur de la mémoire et les analyses de vélocités des ARN, nous avons observé qu'une fraction des cellules activées après 4 et 5 jours avec de l'IL-2ex « remontaient » en direction des cellules précurseurs de la mémoire. A l'inverse, les cellules sans IL-2ex généraient des cellules précurseurs de la mémoire dès 4 jours après activation. Nos résultats suggèrent ainsi que *in vitro*, cette différenciation en cellules précurseurs de la mémoire est plus rapide en absence d'IL-2ex. De plus, les mémoires générées par les cellules cultivées en présence d'IL-2ex, après transfert *in vivo*, généraient un plus grand nombre de cellules mémoires et présentaient une augmentation de l'expression des intégrines ainsi que des fonctions effectrices après restimulation. Ces résultats sont en accord avec notre réanalyse des données de Yao, et al. montrant que les précurseurs de la mémoire identifiés à un stade plus avancé de la réponse et ayant probablement reçu davantage de signaux activateurs et/ou inflammatoires, exprimaient davantage les fonctions effectrices (Todorov et al. 2022; Yao et al. 2019). Les cellules cultivées avec et sans IL-2ex après 4 jours d'activation et transférées dans des hôtes infectés par VV ont générées autant de LT effecteurs pendant la phase effectrice ainsi que de LT mémoires. De plus, ces cellules mémoires présentaient un phénotype similaire et disposaient de capacités effectrices identiques. Ceci suggère que les cellules cultivées sans IL-2ex étaient capables de recevoir et répondre aux signaux inflammatoires et que le destin des cellules n'est pas déterminé précocement.

Nous avons remarqué que certaines cellules pourraient représenter des cellules aux capacités bipotentes. En effet, en combinant les signatures de précurseurs de la mémoire et de T effecteurs, certaines cellules étaient enrichies dans cette nouvelle signature. Ces cellules étaient en cycle et exprimaient à la fois des gènes des fonctions effectrices ainsi que des gènes précurseurs de la mémoire en accord avec nos précédentes observations. Fait intéressant, ces cellules bipotentes sembleraient être générées qu'elles soient cultivées en présence et en absence d'IL-2ex.

Nous souhaitons par la suite identifier des régulateurs responsables de la différenciation précurseurs de mémoire / effecteurs. Pour cela, les réseaux de gènes candidats seront inférés à partir des données de transcriptomique des cellules activées après 3, 4 et 5 jours en présence et absence d'IL-2ex.

3. Identification des cellules précurseurs de la mémoire dans nos modèles

Il serait intéressant d'identifier les cellules précurseurs de la mémoire sur la base de marqueurs phénotypiques dans nos modèles pour pouvoir les trier et les caractériser. En effet, nous pourrions par exemple après une infection par VV caractériser le phénotype et la fonctionnalité des précurseurs générés précocement et plus tardivement mais également analyser les marques épigénétiques les distinguant par ChIP-seq.

Nous avons démontré qu'il existait des cellules précurseurs de la mémoire après une infection par LCMV-A ou par VV. La majorité des études se base sur le phénotype KLRG1/ IL7R pour identifier les MPEC (KLRG1⁻ IL7R⁺) ou encore KLRG1/ IL7R et CD62L pour l'identification d'une sous-population parmi les MPEC (Herndler-Brandstetter et al. 2018; Johnnidis et al. 2021; Joshi et al. 2007). Or, avec notre modèle d'infection par VV, la majorité des LT CD8 F5 sont KLRG1⁻ ne permettant pas de trier les précurseurs de la mémoire sur la base de ce phénotype (**Figure 24**).

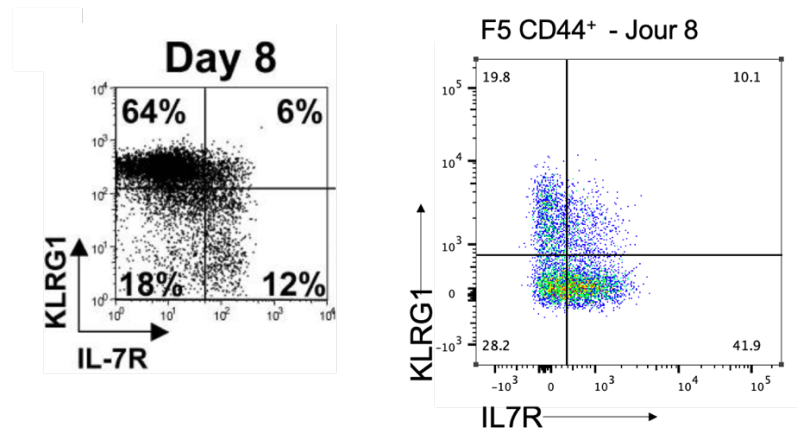


FIGURE 24 : PHENOTYPE KLRG1/ IL7R DES LT CD8 P14 VS LT CD8 F5

A gauche : Expression des marqueurs KLRG1 et IL7R par les LT CD8 P14 dans le sang 8 jours après une infection par LCMV-A. Graphe issu de Joshi, et al. (Joshi et al. 2007). A droite : Expression des marqueurs KLRG1 et IL7R par les LT CD8 F5 dans le sang 8 jours après une infection par VV.

D'autres études ont identifié des cellules précurseurs de la mémoire sur la base de l'expression de TCF1 (Lin et al. 2016; Pais Ferreira et al. 2020). Après 8 jours d'infection par VV, environ 40 à 50% des cellules F5 sont toujours positives pour TCF1 dans la rate alors que 3% des cellules P14 sont Tcf7^{GFP} (sachant que 95% de ces cellules expriment la protéine TCF1) au même temps dans le même tissu après une infection par LCMV-A dans l'étude de Pais-Ferreira, et al. (Pais Ferreira et al. 2020). De plus, TCF1 est un facteur de transcription et ne permet pas de trier des cellules vivantes afin de réaliser des transferts. Plusieurs études utilisent le marqueur de surface Ly108 dont l'expression corrèle avec TCF1 (Beltra et al. 2020; Chen et al. 2019). Cependant, avec nos modèles *in vivo* ou *in vitro*, nous ne retrouvons pas cette corrélation, 50% des cellules sont positives pour Ly108 mais négative pour TCF1.

II. QUALITE DES LT CD8 MEMOIRES GENEREES

Pour la dernière partie de mon travail, nous avons étudié la qualité des LT CD8 mémoires. Dans un contexte d'infection chronique virale ou tumorale, la persistance de l'antigène induit une différenciation progressive des LT CD8 épuisés qui expriment des récepteurs inhibiteurs et présentent un défaut de fonctionnalité. Nous avons souhaité savoir

si une stimulation transitoire par une tumeur suffisait pour induire des marques d'épuisement sur les mémoires générées. Pour cela, nous avons utilisé des cellules EL4 qui sont des lymphoblastes T établies à partir d'un lymphome chez la souris C57Bl/6N par le DMBA (9,10-Dimethyl-1,2-Benz-Anthracene) et expriment le peptide NP68. Ainsi, nous avons généré un modèle de souris dans lequel des LT CD8 F5 sont injectés, reconnaissent et éliminent la tumeur formée par les EL4-NP68 en sous-cutané. La croissance tumorale est maximale entre 6 et 8 jours après transplantation et décroît jusqu'à absence de masse palpable après 12 jours. Ainsi, la stimulation des cellules T CD8 par la tumeur est transitoire bien qu'il puisse rester des cellules EL4 au site d'injection sans qu'il y ait néanmoins de repousse de tumeur. Nous avons en parallèle comparé les mémoires induites par la tumeur à des mémoires générées en réponse à une infection virale aigue (VV) qui nous sert de référence pour la qualité fonctionnelle des cellules.

Nos résultats ont mis en évidence que les LT CD8 mémoires induits par la tumeur confèrent une protection diminuée vis-à-vis d'une infection virale à une dose létale, reflétant ainsi une qualité fonctionnelle altérée. Nous avons observé que ces mémoires présentaient des niveaux diminués d'intégrines (CD29, CD49a, CD49d) nécessaire notamment pour l'entrée dans les tissus tels que les poumons (Grau et al. 2018). De plus, la majorité des mémoires induites par la tumeur expriment à la hausse la forme glycosylée de CD43. Hikono, et al. ont montré que les LT CD8 mémoires CD43⁺ avaient une capacité réduite à s'accumuler dans le poumon lors d'une réinfection (Hikono et al. 2007). Des expériences comparant la capacité de migration des LT mémoires dans les poumons après une nouvelle infection par VV avaient été réalisées (**Figure 25**). Ces résultats montrent que les LT CD8 induits par la tumeur ont une capacité diminuée à migrer au site d'infection en accord avec leur phénotype. La répétition de cette expérience a montré une même tendance avec des différences moins marquées. Toutefois, le nombre de cellules triées et transférées était plus faible (5 fois moins). Il serait intéressant de réaliser une nouvelle fois cette expérience.

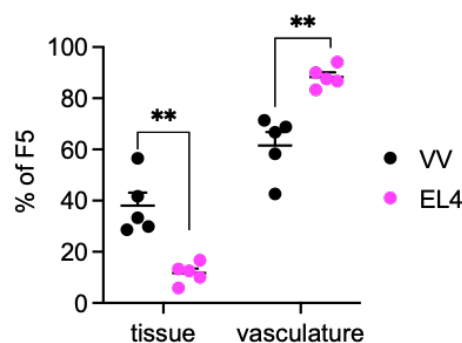


FIGURE 25 : CAPACITE DE MIGRATION DES LT MEMOIRES APRES RECHALLENGE VIRALE

Les LT CD8 F5 mémoires ont été triés et 2.10^5 cellules ont été transférés dans des hôtes naïfs puis infectés par VV-NP68. La capacité de migration dans les poumons a été évalué 4 jours après infection.

Nous avons constaté une hétérogénéité des populations de cellules mémoires induites par la tumeur et par VV. Toutefois, la cytométrie est limitée par le nombre de marqueurs mesurables simultanément. Ainsi, le single-cell RNAseq permet une étude plus exhaustive des

différences pouvant exister entre les cellules mémoires générées et permet l'identification de sous-populations. Notre analyse de scRNA-seq n'a pas permis de mettre en évidence de sous-populations. Au contraire, les transcriptomes des LT mémoires induits par les EL4 et par VV étaient relativement similaires. Toutefois, environ 80 cellules par conditions ont été analysées ce qui peut être un point limitant pour identifier des sous-populations qui pourraient être transcriptionnellement différentes. Il pourrait être intéressant de réaliser un scRNA-seq avec davantage de cellules. L'analyse de différentiel d'expression a tout de même mis en évidence quelques gènes différentiellement exprimés et ont fait l'objet d'une validation par cytométrie en flux.

Les cellules mémoires induites par la tumeur exprimaient davantage PD1 et TIM3 en comparaison des celles induites par VV et la différence étaient maintenues après restimulation. L'expression de ces récepteurs inhibiteurs a été largement caractérisée dans des contextes d'infection chronique et de cancer et leur maintenance au stade mémoire a permis de les définir comme des marqueurs d'épuisement (Chen et al. 2019; Fourcade et al. 2010; Hudson et al. 2019).

Suite aux résultats de scRNA-seq, nous avons orienté nos recherches sur la galectine-3 (Gal3) qui a de nombreuses fonctions dans la modulation de l'activation et la fonctionnalité des LT (Gilson et al. 2019). La Gal3 peut agir de manière paracrine en particulier dans un contexte tumoral mais également en autocrine. Il a été montré à la fois dans un contexte d'infection virale chronique ou sur les lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL) que la galectine-3 pouvait se fixer en surface des cellules sur les groupements glycosylés des protéines (Gilson et al. 2019; Petit et al. 2016; Smith et al. 2018). Cependant, dans notre modèle, l'expression de la galectine-3 à la surface des cellules était très faible après 24H de stimulation. D'autres études ont montré un rôle de la galectine-3 en intracellulaire (Chen et al. 2009; Kaur et al. 2018). Après 24H de stimulation, toutes les cellules mémoires qu'elles soient induites par la tumeur ou par VV exprimaient la Gal3 en intracellulaire. Néanmoins, la quantité produite par les LT mémoires induits par la tumeur était plus importante. Bien que l'expression de la Gal3 a été investiguée sur des cellules activées (Chen et al. 2009; Kaur et al. 2018; Smith et al. 2018), les mémoires induites par la tumeur à l'état basal exprimaient et produisaient davantage de Gal3 endogène que celles générées en réponse au VV. Les études de Chen, et al. et de Kaur, et al. ont montré qu'une déficience en Gal3 conduisait à l'augmentation respectivement de la sécrétion ou l'expression de l'IFN γ (Chen et al. 2009; Kaur et al. 2018). Bien que nous ayons observé une très faible différence de cellules IFN γ ⁺ et TNF α ⁺, les LT mémoires induits par VV en produisaient et en sécrétaient davantage après stimulation. Ainsi, sur la base de la littérature, nous pouvons supposer que la gal3 pourrait être responsable de la diminution de production et sécrétion des cytokines chez les LT mémoires induites par les EL4. Afin de démontrer ce lien, nous pourrions inhiber la Gal3 en générant des LT CD8 F5 KO pour la Gal3 en croisant des souris Gal3^{-/-} avec des souris F5xCD45.1. Néanmoins, le temps de génération de ces souris est d'environ 3 ans à raison de 10 croisements. Ce temps peut être réduit à 1 an environ en utilisant le système CRISPR/Cas9. Une autre alternative serait d'utiliser des drogues pouvant agir en intracellulaire telle que l'olitigaltin (ou TD-139), un inhibiteur du domaine de

liaison aux glucides de la Gal3 (Stegmayr et al. 2019). A la suite de l'inhibition de la Gal3, nous pourrions regarder l'expression de l'IFN γ et du TNF α et ainsi voir une potentielle restauration de leur production et sécrétion par les LT mémoires induites par les EL4. D'autre part, plusieurs études mentionnent que la Gal3 est recrutée du côté cytoplasmique de la synapse immunitaire après activation des cellules (Chen et al. 2009; Kaur et al. 2018). Il serait ainsi intéressant de regarder où se localise la Gal3 après restimulation des LT CD8 mémoires par marquage immuno-fluorescent. Enfin, dans l'hypothèse que la Gal3 serait recrutée au niveau de la synapse immunitaire, elle pourrait interagir avec des protéines au niveau de la synapse et déstabiliser celle-ci ou inhiber certaines protéines impliquées dans la signalisation en aval du TCR telle que Zap70. Nous pourrions ainsi regarder par exemple l'expression de la forme phosphorylée (forme activée) de Zap70.

Nos résultats ont ainsi montré qu'une stimulation transitoire par une tumeur était suffisante pour induire un défaut de qualité fonctionnelle des LT CD8 mémoires. Cependant, les LT mémoires induits par la tumeur ne sont pas dans état d'épuisement terminal étant donné que le pourcentage de cellules exprimant les récepteurs inhibiteurs (PD1, TIM3) était peu élevé en comparaison d'une infection chronique (Chen et al. 2019; Hudson et al. 2019). Ces cellules pourraient néanmoins être dans un état intermédiaire tel que décrit pour des populations de progéniteurs et intermédiaires lors d'une infection chronique (Beltra et al. 2020; Chen et al. 2019; Hudson et al. 2019). Nous pourrions alors investiguer l'expression de marqueurs tels que TCF1, CD69, CD39 ou encore CD101. Nous avons regardé l'expression des gènes codant pour ces protéines dans nos données de scRNA-seq (**Figure 26**). Le gène *Entpd1* codant pour CD39 et Cd101 n'étaient pas ou peu exprimés dans nos données, bien que les mémoires induites par le virus semblaient exprimer plus fortement le gène Cd101. Le gène Cd69 est largement exprimé par les mémoires restimulées ce qui est en accord avec le fait que ce soit un marqueur d'activation. De même, *Tcf7* est un marqueur des cellules naïves et mémoires. Cependant, nous n'observons pas de différence d'expression de Cd69 et *Tcf7* entre les mémoires induites par VV et par la tumeur à l'état basal. Ces résultats ne sont ainsi pas en faveur d'un état intermédiaire des cellules mémoires induites par la tumeur. Toutefois, l'expression du gène n'est pas toujours corrélée à celle de la protéine (Albayrak et al. 2016).

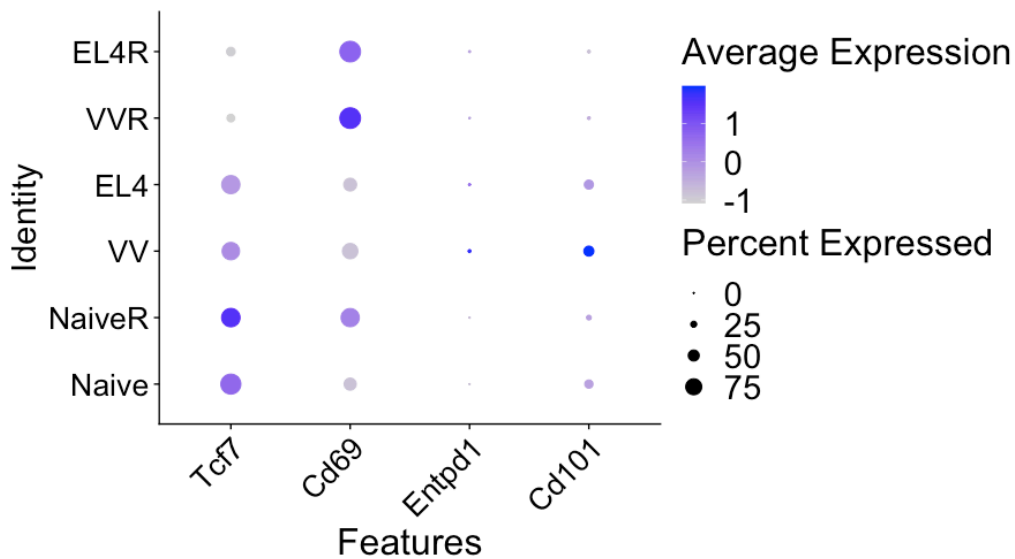


FIGURE 26 : EXPRESSION DES GENES CODANT POUR LES PROTEINES MARQUEURS DES CELLULES EPUISEES PROGENITRICES ET INTERMEDIAIRES

Dot plot montrant l'expression des gènes indiqués par condition expérimentale (axes X et Y respectivement). La taille du point représente le pourcentage de cellules de la condition expérimentale en ordonnée exprimant les gènes indiqués en abscisse ; la couleur indique le niveau d'expression moyen dans les cellules dans lesquelles le gène est détecté.

Notre étude est principalement axée sur la qualité des cellules au stade mémoire. Nous pourrions nous demander à quel moment de la réponse la divergence fonctionnelle a lieu. Plusieurs études ont mis en évidence que la divergence entre les LT CD8 mémoires développés après une infection aiguë par rapport à une infection chronique se produisait dès 8 jours après l'infection (Chen et al. 2019; Doering et al. 2012). Nos données de suivi de marqueurs dans le sang ont montré que les différences d'expression de CD43, de PD1 et des intégrines étaient marquées dès 7 jours après l'infection par VV ou transplantation de la tumeur. Nous pourrions ainsi évaluer l'expression de ces marqueurs ainsi que de TIM3, Gal3 (intracellulaire et en surface) et des cytokines dans la rate après 7 jours. De plus, il serait intéressant de réaliser un scRNA-seq à différent temps de la réponse après infection par VV ou challenge tumoral et ainsi potentiellement observer une divergence transcriptomique entre les deux populations. Nous pourrions également grâce à cette expérience, inférer les réseaux de gènes pouvant permettre de mettre en évidence des régulateurs responsables de la différence de qualité entre les populations de cellules mémoires induites par VV ou par la tumeur. Étant capable d'identifier les précurseurs de la mémoire sur la base de la signature de gènes, nous pourrions inférer les réseaux de gènes uniquement sur les précurseurs de la mémoire induits par VV ou par la tumeur.

En conclusion, les techniques de single-cell RNA-seq et les approches de bio-informatiques nous ont permis de mieux comprendre la différenciation des LT CD8.

Annexes

I. ARTICLES

1. Institut des Sciences Biologiques du CNRS (INSB) : « A quelle(s) étape(s) après infection les cellules T CD8 mémoires sont-elles générées ? »



© Margaux Prioux et Jacqueline Marvel

Accueil > Actualités

A quelle(s) étape(s) après infection les cellules T CD8 mémoires sont-elles générées ?

22 septembre 2022

RÉSULTATS SCIENTIFIQUES IMMUNOLOGIE,
INFECTIOLOGIE

Le stade auquel les cellules T CD8 mémoires divergent après une infection virale reste discuté. Ces cellules sont essentielles pour une protection efficace de l'individu lors d'une infection ultérieure. L'identification de l'étape à laquelle elles sont générées peut impacter les choix stratégiques pour la modulation de leur génération dans un but thérapeutique. Les résultats publiés dans la revue *iScience* permettent de reconstruire leur trajectoire à partir de données de transcriptomique en cellule unique en utilisant des outils de *machine learning*.

Les lymphocytes T CD8 sont des cellules immunitaires dites tueuses jouant un rôle essentiel dans la lutte contre les pathogènes viraux émergents. Les cellules T naïves n'ayant jamais été activées, se différencient en cellules effectrices suite à la rencontre du pathogène. Elles acquièrent ainsi des fonctions effectrices leur permettant d'éliminer les cellules infectées. Après l'infection virale ou une vaccination, une partie de ces cellules activées se différencie en lymphocytes T CD8 mémoires. La génération de ces cellules mémoires spécifiques d'un pathogène, est d'une importance cruciale puisqu'elles vont conférer une protection efficace et durable à leur hôte en cas de réinfection par le même pathogène.

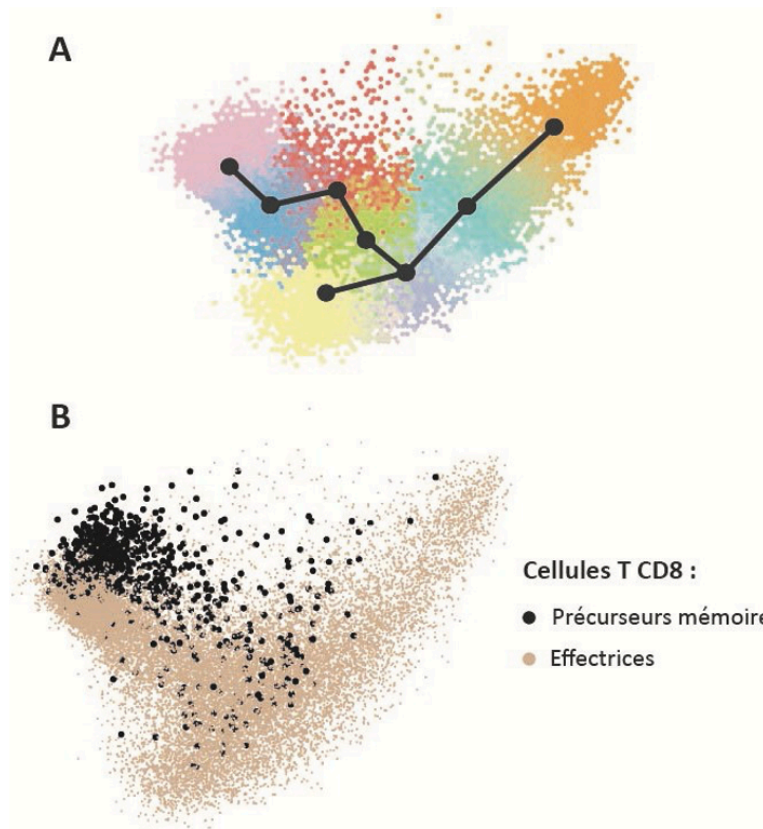
Lors de la primo-infection, l'ontogénie des cellules CD8 mémoires reste controversée. Certaines études suggèrent une bifurcation précoce de ces cellules avant l'acquisition des

fonctions effectrices. D'autres résultats suggèrent une bifurcation plus tardive accompagnée par une dédifférenciation des cellules effectrices en cellules mémoires.

Afin de découvrir les différentes trajectoires suivies par les lymphocytes T CD8 naïfs pour se différencier en cellules mémoires, les scientifiques ont utilisé de nouveaux outils informatiques d'inférence et d'analyse de trajectoires. Ces méthodes d'inférence visent à aligner les cellules le long des trajectoires de développement, permettant aux scientifiques d'avoir un aperçu des processus biologiques dynamiques tels que la différenciation cellulaire. L'objectif était de mieux caractériser la dynamique d'apparition des précurseurs de cellules mémoires au cours d'une primo-infection virale.

Cette étude utilise des approches à la fois qualitatives et quantitatives appliquées à des données de transcriptomiques en cellule unique collectée à différent temps au cours d'une primo-infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire chez la souris. A l'aide de nouveaux outils bio-informatiques permettant d'organiser les cellules en fonction de leur transcriptome, les scientifiques ont pu définir la trajectoire de différenciation des cellules naïves en cellules effectrices. Les données collectées indiquent que la génération des précurseurs de cellules mémoires est un phénomène continu qui accompagne la phase de prolifération induite par la primo-infection, le nombre de cellules générées augmentant avec le temps. De plus, elles montrent que les cellules générées tardivement acquièrent davantage de fonctions effectrices que les cellules précoces. Ces résultats *in silico* ont été ensuite validés *in vivo* chez la souris infectée par le virus de la vaccine. L'analyse numérique indique que la grande majorité des cellules mémoires est générée plus tardivement à partir de cellules qui se sont largement divisées.

Ce travail réconcilie les modèles contradictoires précédemment proposés en ajoutant cette compréhension numérique de la génération de lymphocytes T CD8 mémoire en réponse à une infection virale aiguë. Outre l'intérêt du modèle proposé, l'identification de l'étape à laquelle les lymphocytes T mémoires sont générés peut avoir un impact considérable sur les choix stratégiques effectués afin de moduler leur génération dans un but thérapeutique.



© Margaux Prieux et Jacqueline Marvel

Figure : Visualisation des lymphocytes T CD8 effecteurs et mémoires dans un espace en 2D. Un point correspond à une cellule T CD8. A. Trajectoire suivie par les lymphocytes T CD8 obtenue par informatique et représentée par la ligne noire. Les couleurs définissent des sous-groupes de cellules similaires. B. Identification le long de la trajectoire, des précurseurs de cellules mémoires (en noir) et des effectrices (en marron).

2. Science Pour tous de l'UCBL : « la bio-informatique, des données au sens biologique »



La bio-informatique, des données au sens biologique

Par Margaux Prieux. Publié le 18/11/2022

Margaux Prieux en thèse au CIRI, nous parle de sa double compétence en biologie et bio-informatique développée au cours de son doctorat.

Au cours de mes études de biologie, je me suis spécialisée en génomique. Ce que je n'avais pas prévu en commençant une thèse, c'est que ce domaine requiert des compétences en biologie mais pas seulement. Alors, lorsqu'on me demande sur quel domaine portent mes recherches, je réponds que je suis doctorante biologiste en Immunologie, une discipline qui s'intéresse au système immunitaire, et je dispose également d'une double compétence en bio-informatique.

Souvent, les questions qui suivent sont « C'est quoi la bio-informatique ? » et « à quoi ça sert ? ». Moi-même, il y a encore quelques années, j'ignorais en quoi cela consistait et en quoi cela allait devenir un outil indispensable à la biologie.

De la biologie à la découverte de la bio- informatique

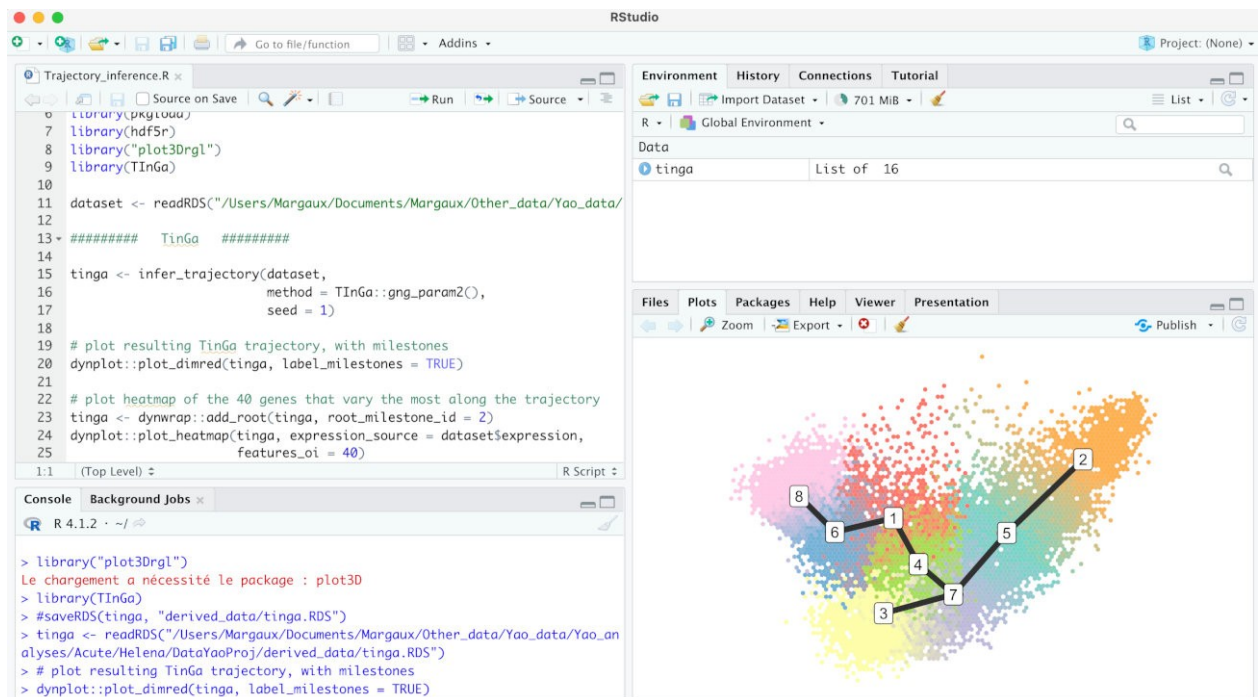
Trouver sa voie n'est pas forcément chose facile. J'ai toujours eu l'esprit plus scientifique que littéraire et j'ai été très vite intéressée par les sciences du vivant, qu'on appelle plus globalement la biologie. Au fil des années, j'ai été captivée par les mécanismes de fonctionnement des organismes vivants mais plutôt à l'échelle moléculaire, au niveau de leur génome en particulier.

Le génome, c'est l'ensemble du matériel génétique d'une espèce inscrit dans son ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Quant à lui, l'ADN est une longue chaîne composée d'une suite de bases nucléiques, représentées par quatre lettres (A, T, G et C), qui regorge d'informations. C'est assez fascinant de savoir qu'on peut y trouver des prédispositions à des pathologies (certains cancers, mucoviscidose, ...) mais aussi nos traits physiques ou encore notre origine ethnique. Mais pour dénicher ces informations, il faut pouvoir déterminer la séquence d'ADN (la suite de lettres) en question. C'est ce qu'on appelle le séquençage d'ADN.

Pour cela, les scientifiques utilisent des méthodes de séquençage nouvelle génération (NGS) qui permettent la lecture de milliards de molécules d'ADN en parallèle. On obtient alors des milliards de séquences très courtes (150 lettres environ) qui se retrouvent stockées dans des fichiers informatiques dans un format FASTQ – le type de fichier que vous n'ouvrez pas d'un simple clic sur l'ordinateur. C'est à ce moment que la bio-informatique va nous être utile. Et soit vous faites appel à un bio-informaticien, soit vous êtes curieux et vous vous lancez dans le grand bain.

Et alors la bio-informatique, quèsaco ?

La bio-informatique se définit comme une science se situant au carrefour de l'informatique, des mathématiques et de la biologie. Il s'agit d'analyser et visualiser par informatique les données biologiques obtenues expérimentalement pour leur donner du sens. Pour cela, le bio-informaticien peut à la fois créer ses propres algorithmes (logiciels) ou utiliser ceux déjà existants, développés par d'autres mathématiciens ou bio-informaticiens. Dans les deux cas, on utilise un ou des langages de programmation qu'on peut définir comme un code de communication entre humain et ordinateur. Les langages les plus populaires en bio-informatique sont Python, ou encore R, qui est intégré dans l'environnement (interface) RStudio. La puissance de calcul des ordinateurs actuels nous permet d'exploiter et analyser les fichiers comportant les milliards de séquences d'ADN obtenues après séquençage. Mais concrètement, quelles analyses peut-on faire et à quoi peuvent-elles servir ?



Interface RStudio se divisant en 4 parties. En haut à gauche, l'Editeur, servant à éditer le code. En haut à droite, l'Environnement, contenant les tables de données et les objets créés. En bas à gauche, la Console, qui permet d'exécuter les lignes de code écrite ici ou dans l'éditeur. En bas à droite, plusieurs onglets dont plots pour l'affichage des graphiques.

L'utilité de la bio-informatique pour mes recherches

La bio-informatique s'applique aussi bien au domaine de la biologie qu'à l'écologie, ou encore à la paléogénomique, discipline qui a pour but de reconstituer les génomes anciens. D'ailleurs, Svante Pääbo, le suédois pionnier de la paléogénomique, a reçu le prix Nobel de médecine 2022 pour avoir réalisé le séquençage complet du génome de l'homme de Néandertal à partir d'un os retrouvé en Sibérie. Et il a pour cela largement eu recours à la bio-informatique.

Pour ma thèse de doctorat, je m'intéresse aux lymphocytes T CD8, des cellules dites tueuses qui ont pour fonction de défendre l'organisme lors d'une infection virale ou bactérienne. Une fois l'infection éliminée, une partie de ces lymphocytes persistent et sont capables de répondre rapidement et efficacement en cas de seconde infection par le même pathogène. On appelle ces cellules des lymphocytes mémoires. Ils sont d'une importance cruciale puisqu'ils confèrent une protection efficace et durable à l'hôte. Mais comment et à quel moment de l'infection les cellules décident-elles de devenir mémoires ?

Pour répondre à cette question, je m'intéresse aux gènes (dont l'ADN est le constituant) exprimés par ces lymphocytes T CD8 en réponse à une infection virale et qui pourraient

expliquer leur choix de devenir ou non des cellules mémoires. Pour cela, j'utilise d'une part des méthodes de séquençage de l'ADN, d'autre part la bio-informatique pour analyser les données générées et leur donner un sens biologique.

La double compétence : une difficulté ou une force ?

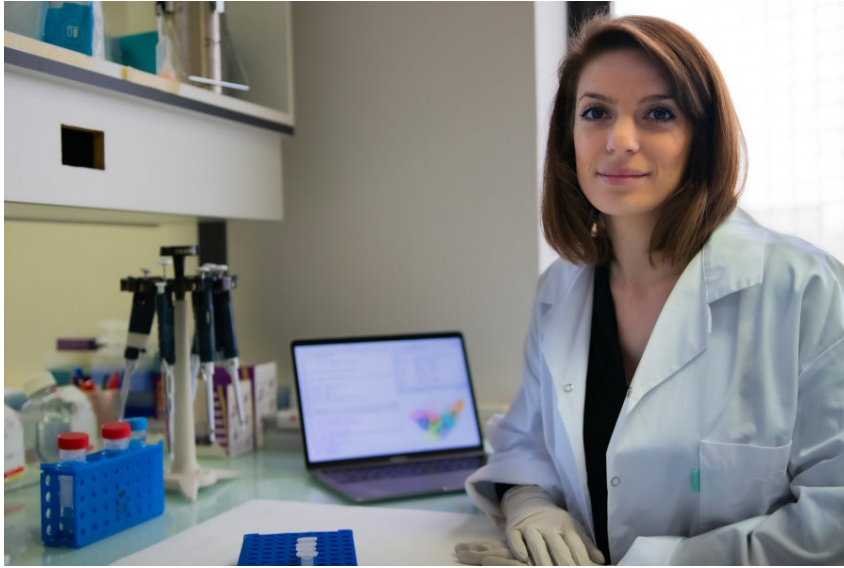
Comme je l'ai dit plus haut, le doctorat permet de devenir expert dans un domaine. Cela nécessite d'ingurgiter beaucoup de connaissances par le biais de la recherche bibliographique, mais également d'acquérir un large panel de compétences. Mon travail est double, et jongler entre la biologie et la bio-informatique n'est pas toujours facile. L'immunologie est un domaine riche, dont l'état des connaissances ne fait que croître rapidement au fil des années.

De l'autre côté, j'ai dû me former à la bio-informatique qui requiert un certain niveau en informatique que je n'avais pas initialement. Qui dit informatique, dit apprentissage de langages qui ont chacun leurs spécificités, leurs règles. J'ai très vite appris qu'en bio-informatique, il faut être rigoureux et attentif. Parfois (voire souvent), mon code ne fonctionnait pas, simplement parce que j'avais oublié ou mal placé une virgule. Et bien sûr, vous pouvez parfois chercher longtemps où est cette petite erreur. Aussi, je ne me considère pas véritablement comme une bio-informaticienne. Même si je comprends plusieurs langages, je ne sais pas les écrire moi-même, et il me manque aussi certaines bases en mathématiques pour pouvoir créer mes propres algorithmes.

En résumé, la bio-informatique est d'une grande utilité, voire indispensable, pour l'analyse de données en biologie. Son essor a notamment permis la découverte de biomarqueurs du cancer, et contribue à la recherche de nouveaux vaccins. Faire de la bio-informatique, c'est être capable d'analyser ses propres données biologiques générées expérimentalement ; c'est être à l'interface entre le biologiste et le bio-informaticien. Je sais parler bio-informatique à un biologiste et inversement, je sais parler biologie à un bio-informaticien. Comprendre la bio-informatique est un véritable atout aujourd'hui même si l'on n'est pas expert. Alors, n'ayez plus peur de la bio-informatique et lancez-vous !

Cet article a été écrit par Margaux Prioux pour Sciences pour tous.

Sa bio



Par mes études et mes stages, je me suis spécialisée dans le domaine de la génomique. C'est au cours de mon stage de master 2 que je me suis initiée à la bio-informatique. Je suis maintenant en 4ème année de thèse au CIRI (Centre Internationale de recherche en Infectiologie) en codirection avec le LBMC (Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la Cellule). Ma thèse porte sur l'étude des lymphocytes T CD8 mémoires par des approches à l'échelle de la cellule unique. Le but est de comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôle la différenciation et la qualité fonctionnelle de ces lymphocytes mémoires impliquant une part importante d'application bio-informatique.

II. POSTER

1. Congrès IRCI 2022 : « CD8 memory precursor cell generation is a continuous process »

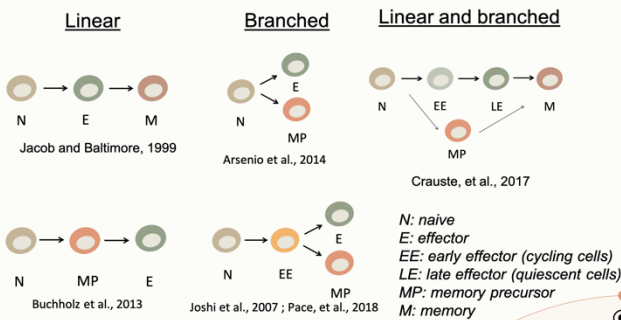
CD8 MEMORY PRECURSOR CELL GENERATION IS A CONTINUOUS PROCESS

Prieux M^{1,2}, Todorov H^{3,3}, Laubret D¹, Bouvier M^{2,5}, Wang S¹, De Bernard S⁴, Arpin C¹, Cannoodt R³, Saelens W³, Bonnaffoux A⁵, Gandrillon O², Crauste F⁶, Saey Y³, Jacqueline Marvel¹

1 Centre International de recherche en Infectiologie, Lyon – France ; 2 Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la cellule, Lyon – France ; 3 VIB Center for Inflammation Research, Ghent - Belgium ; 4 Altrabio, Lyon – France ; 5 Vidium, Lyon – France ; 6 Laboratoire MAP5, Paris – France



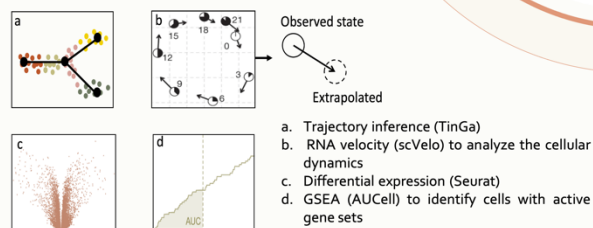
The different CD8 T cell differentiation pathway models proposed in the literature:



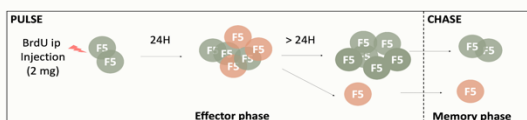
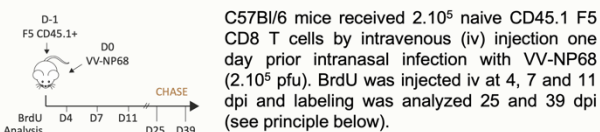
Can single-cell transcriptomic and trajectory/ RNA velocity tools determine the trajectory(ies) followed by the naive CD8 T cells to differentiate into memory cells?

Single-cell RNA-seq (10X)

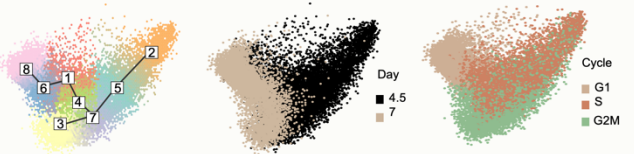
Dataset from Yao, et al. (2019) containing 20,295 splenic CD8 T cells generated following LCMV-Arm acute infection and isolated at 4.5 and 7 days post-infection (dpi) was analyzed. First, quality control (Scater), normalization (sctransform) and features selection (Scanr) were made. Then, advanced analysis tools were used:



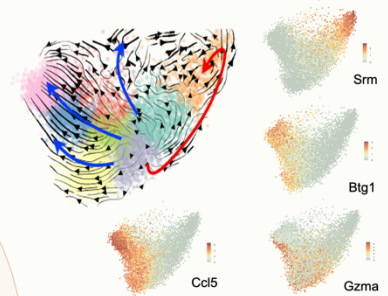
In vivo BrdU pulse/chase experiment



The inferred trajectory orders cells from day 4 to 7 going from cycling to quiescent cells

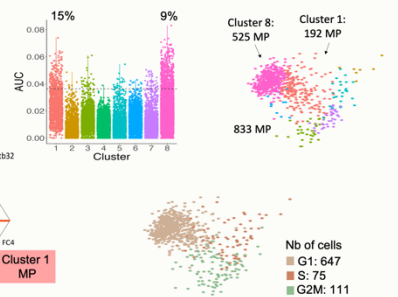


Differentiation directionality was determined by scVelo



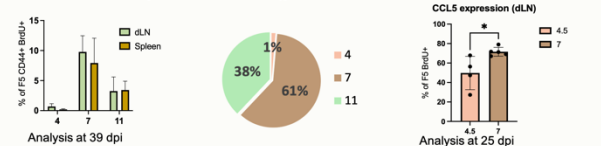
Two trajectories were identified: a circular one corresponding to cycling cells and a linear one corresponding to the slow acquisition of effector functions (Ccl5, Gzma).

Identification of MP with a gene expression signature



Cluster 1 and 8 were enriched in the MP signature. The in vivo number of MP at 7 dpi was however ~150 times higher than at 4.5 dpi. Comparison of genes expressed by MP on days 4.5/7 pi indicated that late generated MP acquired the expression of gene encoding effector functions.

In vivo validation by BrdU labeling



BrdU labeling confirmed that a larger number of memory cells derived from cells becoming quiescent on day 7 or later. CCL5 was expressed at higher level by memory cells generated at 7 dpi.



Références

Albayrak, Cem, Christian A. Jordi, Christoph Zechner, Jing Lin, Colette A. Bichsel, Mustafa Khammash, and Savaş Tay. 2016. "Digital Quantification of Proteins and mRNA in Single Mammalian Cells." *Molecular Cell* 61(6):914–24. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.030.

Alon, R., P. D. Kassner, M. W. Carr, E. B. Finger, M. E. Hemler, and T. A. Springer. 1995. "The Integrin VLA-4 Supports Tethering and Rolling in Flow on VCAM-1." *Journal of Cell Biology* 128(6):1243–53. doi: 10.1083/jcb.128.6.1243.

Amaria, Rodabe, Alexandre Reuben, Zachary Cooper, and Jennifer A. Wargo. 2015. "Update on Use of Aldesleukin for Treatment of High-Risk Metastatic Melanoma." *ImmunoTargets and Therapy* 79. doi: 10.2147/ITT.S61590.

Araki, Yasuto, Zhibin Wang, Chongzhi Zang, William H. Wood, Dustin Schones, Kairong Cui, Tae-Young Roh, Brad Lhotsky, Robert P. Wersto, Weiqun Peng, Kevin G. Becker, Keji Zhao, and Nan-ping Weng. 2009. "Genome-Wide Analysis of Histone Methylation Reveals Chromatin State-Based Regulation of Gene Transcription and Function of Memory CD8+ T Cells." *Immunity* 30(6):912–25. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.006.

Arsenio, Janilyn, Boyko Kakaradov, Patrick J. Metz, Stephanie H. Kim, Gene W. Yeo, and John T. Chang. 2014. "Early Specification of CD8+ T Lymphocyte Fates during Adaptive Immunity Revealed by Single-Cell Gene-Expression Analyses." *Nature Immunology* 15(4):365–72. doi: 10.1038/ni.2842.

Badovinac, Vladimir P., and John T. Harty. 2006. "Programming, Demarcating, and Manipulating CD8 + T-cell Memory." *Immunological Reviews* 211(1):67–80. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00384.x.

Badovinac, Vladimir P., Brandon B. Porter, and John T. Harty. 2002. "Programmed Contraction of CD8+ T Cells after Infection." *Nature Immunology* 3(7):619–26. doi: 10.1038/ni804.

Badovinac, Vladimir P., Brandon B. Porter, and John T. Harty. 2004. "CD8+ T Cell Contraction Is Controlled by Early Inflammation." *Nature Immunology* 5(8):809–17. doi: 10.1038/ni1098.

Banerjee, Arnob, Scott M. Gordon, Andrew M. Intlekofer, Michael A. Paley, Erin C. Mooney, Tulia Lindsten, E. John Wherry, and Steven L. Reiner. 2010. "Cutting Edge: The Transcription Factor Eomesodermin Enables CD8+ T Cells To Compete for the Memory Cell Niche." *The Journal of Immunology* 185(9):4988–92. doi: 10.4049/jimmunol.1002042.

Becker, Todd C., E. John Wherry, David Boone, Kaja Murali-Krishna, Rustom Antia, Averil Ma, and Rafi Ahmed. 2002. "Interleukin 15 Is Required for Proliferative Renewal of Virus-Specific Memory CD8 T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 195(12):1541–48. doi: 10.1084/jem.20020369.

Beltra, Jean-Christophe, Sasikanth Manne, Mohamed S. Abdel-Hakeem, Makoto Kurachi, Josephine R. Giles, Zeyu Chen, Valentina Casella, Shin Foong Ngiow, Omar Khan, Yinghui Jane Huang, Patrick Yan, Kito Nzingha, Wei Xu, Ravi K. Amaravadi, Xiaowei Xu, Giorgos C. Karakousis, Tara C. Mitchell, Lynn M. Schuchter, Alexander C. Huang, and E. John Wherry. 2020. "Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms." *Immunity* 52(5):825-841.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.014.

Belz, Gabrielle T., Christopher M. Smith, Daniel Eichner, Ken Shortman, Guna Karupiah, Francis R. Carbone, and William R. Heath. 2004. "Cutting Edge: Conventional CD8 α + Dendritic Cells Are Generally Involved in Priming CTL Immunity to Viruses." *The Journal of Immunology* 172(4):1996–2000. doi: 10.4049/jimmunol.172.4.1996.

Bergen, Volker, Marius Lange, Stefan Peidli, F. Alexander Wolf, and Fabian J. Theis. 2020. "Generalizing RNA Velocity to Transient Cell States through Dynamical Modeling." *Nature Biotechnology* 38(12):1408–14. doi: 10.1038/s41587-020-0591-3.

Bergsbaken, Tessa, and Michael J. Bevan. 2015. "Proinflammatory Microenvironments within the Intestine Regulate the Differentiation of Tissue-Resident CD8+ T Cells Responding to Infection." *Nature Immunology* 16(4):406–14. doi: 10.1038/ni.3108.

Bevan, Michael J., and Pamela J. Fink. 2001. "The CD8 Response on Autopilot." *Nature Immunology* 2(5):381–82. doi: 10.1038/87676.

Blackburn, Shawn D., Haina Shin, W. Nicholas Haining, Tao Zou, Creg J. Workman, Antonio Polley, Michael R. Betts, Gordon J. Freeman, Dario A. A. Vignali, and E. John Wherry. 2009. "Coregulation of CD8+ T Cell Exhaustion by Multiple Inhibitory Receptors during Chronic Viral Infection." *Nature Immunology* 10(1):29–37. doi: 10.1038/ni.1679.

Blattman, Joseph N., Rustom Antia, David J. D. Sourdive, Xiaochi Wang, Susan M. Kaech, Kaja Murali-Krishna, John D. Altman, and Rafi Ahmed. 2002. "Estimating the Precursor Frequency of Naive Antigen-Specific CD8 T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 195(5):657–64. doi: 10.1084/jem.20001021.

Boise, Lawrence H., Andy J. Minn, Patricia J. Noel, Carl H. June, Mary Ann Accavitti, Tullia Lindsten, and Craig B. Thompson. 1995. "CD28 Costimulation Can Promote T Cell Survival by Enhancing the Expression of Bcl-XL." *Immunity* 3(1):87–98. doi: 10.1016/1074-7613(95)90161-2.

Boivin, Wendy Anne, Dawn Michelle Cooper, Paul Ryan Hiebert, and David James Granville. 2009. "Intracellular versus Extracellular Granzyme B in Immunity and Disease: Challenging the Dogma." *Laboratory Investigation* 89(11):1195–1220. doi: 10.1038/labinvest.2009.91.

Bonnin, R. A., T. Naas, and L. Dortet. 2017. "Impact du séquençage d'ADN à haut débit sur la surveillance des épidémies de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques." *feuilles de Biologie*.

Böttcher, Jan P., Marc Beyer, Felix Meissner, Zeinab Abdullah, Jil Sander, Bastian Höchst, Sarah Eickhoff, Jan C. Rieckmann, Caroline Russo, Tanja Bauer, Tobias Flecken, Dominik Giesen, Daniel Engel, Steffen Jung, Dirk H. Busch, Ulrike Protzer, Robert Thimme,

Matthias Mann, Christian Kurts, Joachim L. Schultze, Wolfgang Kastenmüller, and Percy A. Knolle. 2015. "Functional Classification of Memory CD8+ T Cells by CX3CR1 Expression." *Nature Communications* 6(1):8306. doi: 10.1038/ncomms9306.

Bouillet, Philippe, Donald Metcalf, David C. S. Huang, David M. Tarlinton, Tom W. H. Kay, Frank Köntgen, Jerry M. Adams, and Andreas Strasser. 1999. "Proapoptotic Bcl-2 Relative Bim Required for Certain Apoptotic Responses, Leukocyte Homeostasis, and to Preclude Autoimmunity." *Science* 286(5445):1735–38. doi: 10.1126/science.286.5445.1735.

Brehm, Michael A., Keith A. Daniels, and Raymond M. Welsh. 2005. "Rapid Production of TNF- α Following TCR Engagement of Naive CD8 T Cells." *The Journal of Immunology* 175(8):5043–49. doi: 10.4049/jimmunol.175.8.5043.

Bresser, Kaspar, Lianne Kok, Arpit C. Swain, Lisa A. King, Laura Jacobs, Tom S. Weber, Leïla Perié, Ken R. Duffy, Rob J. de Boer, Ferenc A. Scheeren, and Ton N. Schumacher. 2022. "Replicative History Marks Transcriptional and Functional Disparity in the CD8+ T Cell Memory Pool." *Nature Immunology* 23(5):791–801. doi: 10.1038/s41590-022-01171-9.

Brincks, Erik L., Arna Katewa, Tamara A. Kucaba, and Thomas S. Griffith. 2009. "CD8 T Cells Utilize TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) to Control Influenza Virus Infection."

Buchholz, Veit R., Michael Flossdorf, Inge Hensel, Lorenz Kretschmer, Bianca Weissbrich, Patricia Gräf, Admar Verschoor, Matthias Schiemann, Thomas Höfer, and Dirk H. Busch. 2013. "Disparate Individual Fates Compose Robust CD8 + T Cell Immunity." *Science* 340(6132):630–35. doi: 10.1126/science.1235454.

Butler, Andrew, Paul Hoffman, Peter Smibert, Efthymia Papalexi, and Rahul Satija. 2018. "Integrating Single-Cell Transcriptomic Data across Different Conditions, Technologies, and Species." *Nature Biotechnology* 36(5):411–20. doi: 10.1038/nbt.4096.

Butz, Eric A., and Michael J. Bevan. 1998. "Massive Expansion of Antigen-Specific CD8+ T Cells during an Acute Virus Infection." *Immunity* 8(2):167–75. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80469-0.

Calzascia, Thomas, Marc Pellegrini, Håkan Hall, Laurent Sabbagh, Nobuyuki Ono, Alisha R. Elford, Tak W. Mak, and Pamela S. Ohashi. 2007. "TNF- α Is Critical for Antitumor but Not Antiviral T Cell Immunity in Mice." *Journal of Clinical Investigation* JCI32567. doi: 10.1172/JCI32567.

Cannarile, Michael A., Nicholas A. Lind, Richard Rivera, Alison D. Sheridan, Kristin A. Camfield, Bei Bei Wu, Kitty P. Cheung, Zhaoqing Ding, and Ananda W. Goldrath. 2006. "Transcriptional Regulator Id2 Mediates CD8+ T Cell Immunity." *Nature Immunology* 7(12):1317–25. doi: 10.1038/ni1403.

Casal, Joshua DeSousa, and Juan Carlos Zúñiga-Pflücker. 2022. "T Cell Development." Pp. 64–75 in *Encyclopedia of Infection and Immunity*, edited by N. Rezaei. Oxford: Elsevier.

Chang, John T., Maria L. Ciocca, Ichiko Kinjyo, Vikram R. Palanivel, Courtney E. McClurkin, Caitlin S. DeJong, Erin C. Mooney, Jiyeon S. Kim, Natalie C. Steinel, Jane Oliaro, Catherine C. Yin, Bogdan I. Florea, Herman S. Overkleeft, Leslie J. Berg, Sarah M. Russell, Gary A. Koretzky, Martha S. Jordan, and Steven L. Reiner. 2011. "Asymmetric Proteasome

Segregation as a Mechanism for Unequal Partitioning of the Transcription Factor T-Bet during T Lymphocyte Division.” *Immunity* 34(4):492–504. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.017.

Chang, John T., Vikram R. Palanivel, Ichiko Kinjyo, Felix Schambach, Andrew M. Intlekofer, Arnob Banerjee, Sarah A. Longworth, Kristine E. Vinup, Paul Mrass, Jane Oliaro, Nigel Killeen, Jordan S. Orange, Sarah M. Russell, Wolfgang Weninger, and Steven L. Reiner. 2007. “Asymmetric T Lymphocyte Division in the Initiation of Adaptive Immune Responses.” *Science* 315(5819):1687–91. doi: 10.1126/science.1139393.

Chang, John T., E. John Wherry, and Ananda W. Goldrath. 2014. “Molecular Regulation of Effector and Memory T Cell Differentiation.” *Nature Immunology* 15(12):1104–15. doi: 10.1038/ni.3031.

Chen, Huan-Yuan, Agnes Fermin, Santosh Vardhana, I.-Chun Weng, Kin Fong Robin Lo, En-Yuh Chang, Emanuel Maverakis, Ri-Yao Yang, Daniel K. Hsu, Michael L. Dustin, and Fu-Tong Liu. 2009. “Galectin-3 Negatively Regulates TCR-Mediated CD4+ T-Cell Activation at the Immunological Synapse.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(34):14496–501. doi: 10.1073/pnas.0903497106.

Chen, Lieping, and Dallas B. Flies. 2013. “Molecular Mechanisms of T Cell Co-Stimulation and Co-Inhibition.” *Nature Reviews Immunology* 13(4):227–42. doi: 10.1038/nri3405.

Chen, Zeyu, Zhicheng Ji, Shin Foong Ngiow, Sasikanth Manne, Zhangying Cai, Alexander C. Huang, John Johnson, Ryan P. Staupe, Bertram Bengsch, Caiyue Xu, Sixiang Yu, Makoto Kurachi, Ramin S. Herati, Laura A. Vella, Amy E. Baxter, Jennifer E. Wu, Omar Khan, Jean-Christophe Beltra, Josephine R. Giles, Erietta Stelekati, Laura M. McLane, Chi Wai Lau, Xiaolu Yang, Shelley L. Berger, Golnaz Vahedi, Hongkai Ji, and E. John Wherry. 2019. “TCF-1-Centered Transcriptional Network Drives an Effector versus Exhausted CD8 T Cell-Fate Decision.” *Immunity* 51(5):840-855.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2019.09.013.

Cieri, Nicoletta, Giacomo Oliveira, Raffaella Greco, Mattia Forcato, Cristian Taccioli, Beatrice Cianciotti, Veronica Valtolina, Maddalena Noviello, Luca Vago, Attilio Bondanza, Francesca Lunghi, Sarah Markt, Laura Bellio, Claudio Bordignon, Silvio Biciato, Jacopo Peccatori, Fabio Ciceri, and Chiara Bonini. 2015. “Generation of Human Memory Stem T Cells after Haploidentical T-Replete Hematopoietic Stem Cell Transplantation.” *Blood* 125(18):2865–74. doi: 10.1182/blood-2014-11-608539.

Codarri Deak, Laura, Valeria Nicolini, Masao Hashimoto, Maria Karagianni, Petra C. Schwalie, Laura Lauener, Eleni Maria Varypataki, Marine Richard, Esther Bommer, Johannes Sam, Stefanie Joller, Mario Perro, Floriana Cremasco, Leo Kunz, Emilio Yanguez, Tamara Hüsser, Ramona Schlenker, Marisa Mariani, Vinko Tosevski, Sylvia Herter, Marina Bacac, Inja Waldhauer, Sara Colombetti, Xavier Gueripel, Stephan Wullschlegler, Melanie Tichet, Douglas Hanahan, Haydn T. Kissick, Stephane Leclair, Anne Freimoser-Grundschober, Stefan Seeber, Volker Teichgräber, Rafi Ahmed, Christian Klein, and Pablo Umaña. 2022. “PD-1-Cis IL-2R Agonism Yields Better Effectors from Stem-like CD8+ T Cells.” *Nature* 610(7930):161–72. doi: 10.1038/s41586-022-05192-0.

Cole, Michael B., Davide Risso, Allon Wagner, David DeTomaso, John Ngai, Elizabeth

Purdom, Sandrine Dudoit, and Nir Yosef. 2017. Performance Assessment and Selection of Normalization Procedures for Single-Cell RNA-Seq. preprint. Genomics. doi: 10.1101/235382.

Crauste, Fabien, Julien Mafille, Lilia Boucinha, Sophia Djebali, Olivier Gandrillon, Jacqueline Marvel, and Christophe Arpin. 2017. "Identification of Nascent Memory CD8 T Cells and Modeling of Their Ontogeny." *Cell Systems* 4(3):306-317.e4. doi: 10.1016/j.cels.2017.01.014.

Crozat, Karine, Samira Tamoutounour, Thien-Phong Vu Manh, Even Fossum, Hervé Luche, Laurence Ardouin, Martin Williams, Hiroaki Azukizawa, Bjarne Bogen, Bernard Malissen, and Marc Dalod. 2011. "Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8 α + Type." *The Journal of Immunology*, November, 4411–15.

Curtsinger, Julie M., Javier O. Valenzuela, Pujya Agarwal, Debra Lins, and Matthew F. Mescher. 2005. "Cutting Edge: Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8 T Cells to Stimulate Clonal Expansion and Differentiation." *The Journal of Immunology* 174(8):4465–69. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.4465.

Danilo, Maxime, Vijaykumar Chennupati, Joana Gomes Silva, Stefanie Siegert, and Werner Held. 2018. "Suppression of Tcf1 by Inflammatory Cytokines Facilitates Effector CD8 T Cell Differentiation." *Cell Reports* 22(8):2107–17. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.072.

Ding, Jiarui, Xian Adiconis, Sean K. Simmons, Monika S. Kowalczyk, Cynthia C. Hession, Nemanja D. Marjanovic, Travis K. Hughes, Marc H. Wadsworth, Tyler Burks, Lan T. Nguyen, John Y. H. Kwon, Boaz Barak, William Ge, Amanda J. Kedaigle, Shaina Carroll, Shuqiang Li, Nir Hacohen, Orit Rozenblatt-Rosen, Alex K. Shalek, Alexandra-Chloé Villani, Aviv Regev, and Joshua Z. Levin. 2020. "Systematic Comparison of Single-Cell and Single-Nucleus RNA-Sequencing Methods." *Nature Biotechnology* 38(6):737–46. doi: 10.1038/s41587-020-0465-8.

Doering, Travis A., Alison Crawford, Jill M. Angelosanto, Michael A. Paley, Carly G. Ziegler, and E. John Wherry. 2012. "Network Analysis Reveals Centrally Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory." *Immunity* 37(6):1130–44. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.021.

D'Souza, Warren N., and Stephen M. Hedrick. 2006. "Cutting Edge: Latecomer CD8 T Cells Are Imprinted with a Unique Differentiation Program." *The Journal of Immunology* 177(2):777–81. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.777.

Duraiswamy, Jaikumar, Chris C. Ibegbu, David Masopust, Joseph D. Miller, Koichi Araki, Gregory H. Doho, Pramila Tata, Satish Gupta, Michael J. Zilliox, Helder I. Nakaya, Bali Pulendran, W. Nicholas Haining, Gordon J. Freeman, and Rafi Ahmed. 2011. "Phenotype, Function, and Gene Expression Profiles of Programmed Death-1hi CD8 T Cells in Healthy Human Adults." *The Journal of Immunology* 186(7):4200–4212. doi: 10.4049/jimmunol.1001783.

Eberlein, Jens, Bennett Davenport, Tom T. Nguyen, Francisco Victorino, Kevin Jhun, Verena van der Heide, Maxim Kuleshov, Avi Ma'ayan, Ross Kedl, and Dirk Homann. 2020. "Chemokine Signatures of Pathogen-Specific T Cells I: Effector T Cells." *The Journal of*

Immunology 205:2169–87. doi: 10.4049/jimmunol.2000253.

Eickhoff, Sarah, Anna Brewitz, Michael Y. Gerner, Frederick Klauschen, Karl Komander, Hiroaki Hemmi, Natalio Garbi, Tsuneyasu Kaisho, Ronald Nathan Germain, and Wolfgang Kastentmüller. 2015. “Robust Anti-Viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions.” *Cell* 162(6):1322–37. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.004.

Fann, Monchou, Jason M. Godlove, Marta Catalfamo, William H. Wood, Francis J. Chrest, Nicholas Chun, Larry Granger, Robert Wersto, Karen Madara, Kevin Becker, Pierre A. Henkart, and Nan-ping Weng. 2006. “Histone Acetylation Is Associated with Differential Gene Expression in the Rapid and Robust Memory CD8+ T-Cell Response.” *Blood* 108(10):3363–70. doi: 10.1182/blood-2006-02-005520.

Feau, Sonia, Ramon Arens, Susan Togher, and Stephen P. Schoenberger. 2011. “Autocrine IL-2 Is Required for Secondary Population Expansion of CD8+ Memory T Cells.” *Nature Immunology* 12(9):908–13. doi: 10.1038/ni.2079.

Fiers, Mark W. E. J., Liesbeth Minnoye, Sara Aibar, Carmen Bravo González-Blas, Zeynep Kalender Atak, and Stein Aerts. 2018. “Mapping Gene Regulatory Networks from Single-Cell Omics Data.” *Briefings in Functional Genomics* 17(4):246–54. doi: 10.1093/bfpg/elx046.

Fourcade, Julien, Zhaojun Sun, Mourad Benallaoua, Philippe Guillaume, Immanuel F. Luescher, Cindy Sander, John M. Kirkwood, Vijay Kuchroo, and Hassane M. Zarour. 2010. “Upregulation of Tim-3 and PD-1 Expression Is Associated with Tumor Antigen-Specific CD8+ T Cell Dysfunction in Melanoma Patients.” *Journal of Experimental Medicine* 207(10):2175–86. doi: 10.1084/jem.20100637.

Garrod, Kym R., Hélène D. Moreau, Zacarias Garcia, Fabrice Lemaître, Isabelle Bouvier, Matthew L. Albert, and Philippe Bousso. 2012. “Dissecting T Cell Contraction In Vivo Using a Genetically Encoded Reporter of Apoptosis.” *Cell Reports* 2(5):1438–47. doi: 10.1016/j.celrep.2012.10.015.

Gattinoni, Luca, Enrico Lugli, Yun Ji, Zoltan Pos, Chrystal M. Paulos, Máire F. Quigley, Jorge R. Almeida, Emma Gostick, Zhiya Yu, Carmine Carpenito, Ena Wang, Daniel C. Douek, David A. Price, Carl H. June, Francesco M. Marincola, Mario Roederer, and Nicholas P. Restifo. 2011. “A Human Memory T Cell Subset with Stem Cell-like Properties.” *Nature Medicine* 17(10):1290–97. doi: 10.1038/nm.2446.

Gattinoni, Luca, Daniel E. Speiser, Mathias Lichterfeld, and Chiara Bonini. 2017. “T Memory Stem Cells in Health and Disease.” *Nature Medicine* 23(1):18–27. doi: 10.1038/nm.4241.

Gattinoni, Luca, Xiao-Song Zhong, Douglas C. Palmer, Yun Ji, Christian S. Hinrichs, Zhiya Yu, Claudia Wrzesinski, Andrea Boni, Lydie Cassard, Lindsay M. Garvin, Chrystal M. Paulos, Pawel Muranski, and Nicholas P. Restifo. 2009. “Wnt Signaling Arrests Effector T Cell Differentiation and Generates CD8+ Memory Stem Cells.” *Nature Medicine* 15(7):808–13. doi: 10.1038/nm.1982.

Gilson, Rebecca C., Sachith D. Gunasinghe, Ludger Johannes, and Katharina Gaus. 2019. “Galectin-3 Modulation of T-Cell Activation: Mechanisms of Membrane Remodelling.”

Progress in Lipid Research 76:101010. doi: 10.1016/j.plipres.2019.101010.

Goldrath, Ananda W., Pallavur V. Sivakumar, Moira Glaccum, Mary K. Kennedy, Michael J. Bevan, Christophe Benoist, Diane Mathis, and Eric A. Butz. 2002. "Cytokine Requirements for Acute and Basal Homeostatic Proliferation of Naive and Memory CD8+ T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 195(12):1515–22. doi: 10.1084/jem.20020033.

Gong, Chang, Jennifer J. Linderman, and Denise Kirschner. 2014. "Harnessing the Heterogeneity of T Cell Differentiation Fate to Fine-Tune Generation of Effector and Memory T Cells." *Frontiers in Immunology* 5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00057.

Grau, Morgan, Séverine Valsesia, Julien Mafille, Sophia Djebali, Martine Tomkowiak, Anne-Laure Mathieu, Daphné Laubret, Simon de Bernard, Pierre-Emmanuel Jouve, Erwan Ventre, Laurent Buffat, Thierry Walzer, Yann Leverrier, and Jacqueline Marvel. 2018. "Antigen-Induced but Not Innate Memory CD8 T Cells Express NKG2D and Are Recruited to the Lung Parenchyma upon Viral Infection." *The Journal of Immunology* 200(10):3635–46. doi: 10.4049/jimmunol.1701698.

Gray, Simon M., Robert A. Amezcua, Tianxia Guan, Steven H. Kleinstein, and Susan M. Kaech. 2017. "Polycomb Repressive Complex 2-Mediated Chromatin Repression Guides Effector CD8+ T Cell Terminal Differentiation and Loss of Multipotency." *Immunity* 46(4):596–608. doi: 10.1016/j.immuni.2017.03.012.

Gupta, Shubhranshu S., Jin Wang, and Min Chen. 2020. "Metabolic Reprogramming in CD8+ T Cells During Acute Viral Infections." *Frontiers in Immunology* 11:1013. doi: 10.3389/fimmu.2020.01013.

Hafemeister, Christoph, and Rahul Satija. 2019. "Normalization and Variance Stabilization of Single-Cell RNA-Seq Data Using Regularized Negative Binomial Regression." *Genome Biology* 20(1):296. doi: 10.1186/s13059-019-1874-1.

Hagemann-Jensen, Michael, Christoph Ziegenhain, Ping Chen, Daniel Ramsköld, Gert-Jan Hendriks, Anton J. M. Larsson, Omid R. Faridani, and Rickard Sandberg. 2020. "Single-Cell RNA Counting at Allele and Isoform Resolution Using Smart-Seq3." *Nature Biotechnology* 38(6):708–14. doi: 10.1038/s41587-020-0497-0.

Haluszczak, Catherine, Adovi D. Akue, Sara E. Hamilton, Lisa D. S. Johnson, Lindsey Pujanauski, Lenka Teodorovic, Stephen C. Jameson, and Ross M. Kedl. 2009. "The Antigen-Specific CD8+ T Cell Repertoire in Unimmunized Mice Includes Memory Phenotype Cells Bearing Markers of Homeostatic Expansion." *Journal of Experimental Medicine* 206(2):435–48. doi: 10.1084/jem.20081829.

Hammarlund, Erika, Matthew W. Lewis, Scott G. Hansen, Lisa I. Strelow, Jay A. Nelson, Gary J. Sexton, Jon M. Hanifin, and Mark K. Slifka. 2003. "Duration of Antiviral Immunity after Smallpox Vaccination." *Nature Medicine* 9(9):1131–37. doi: 10.1038/nm917.

Hashimoto, Masao, Koichi Araki, Maria A. Cardenas, Peng Li, Rohit R. Jadhav, Haydn T. Kissick, William H. Hudson, Donald J. McGuire, Rebecca C. Obeng, Andreas Wieland, Judong Lee, Daniel T. McManus, James L. Ross, Se Jin Im, Junghwa Lee, Jian-Xin Lin, Bin Hu, Erin E. West, Christopher D. Scharer, Gordon J. Freeman, Arlene H. Sharpe, Suresh S. Ramalingam, Alex Pellerin, Volker Teichgräber, William J. Greenleaf, Christian Klein, Jorg J. Goronzy, Pablo

Umaña, Warren J. Leonard, Kendall A. Smith, and Rafi Ahmed. 2022. "PD-1 Combination Therapy with IL-2 Modifies CD8+ T Cell Exhaustion Program." *Nature* 610(7930):173–81. doi: 10.1038/s41586-022-05257-0.

Hathcock, Karen S., Gloria Laszlo, Carlo Pucillo, Peter Linsley, and Richard J. Hodes. 1994. "Comparative Analysis of B7-1 and B7-2 Costimulatory Ligands: Expression and Function." *The Journal of Experimental Medicine*, 631–40.

Herndler-Brandstetter, Dietmar, Harumichi Ishigame, Ryo Shinnakasu, Valerie Plajer, Carmen Stecher, Jun Zhao, Melanie Lietzenmayer, Lina Kroehling, Akiko Takumi, Kohei Kometani, Takeshi Inoue, Yuval Kluger, Susan M. Kaech, Tomohiro Kurosaki, Takaharu Okada, and Richard A. Flavell. 2018. "KLRG1+ Effector CD8+ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity." *Immunity* 48(4):716–729.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.015.

Hicks, Stephanie C., F. William Townes, Mingxiang Teng, and Rafael A. Irizarry. 2018. "Missing Data and Technical Variability in Single-Cell RNA-Sequencing Experiments." *Biostatistics* 19(4):562–78. doi: 10.1093/biostatistics/kxx053.

Hikono, Hirokazu, Jacob E. Kohlmeier, Shiki Takamura, Susan T. Wittmer, Alan D. Roberts, and David L. Woodland. 2007. "Activation Phenotype, Rather than Central- or Effector-Memory Phenotype, Predicts the Recall Efficacy of Memory CD8+ T Cells." *Journal of Experimental Medicine* 204(7):1625–36. doi: 10.1084/jem.20070322.

Homann, Dirk, Luc Teyton, and Michael B. A. Oldstone. 2001. "Differential Regulation of Antiviral T-Cell Immunity Results in Stable CD8+ but Declining CD4+ T-Cell Memory." *Nature Medicine* 7(8):913–19. doi: 10.1038/90950.

Hor, Jyh Liang, Paul G. Whitney, Ali Zaid, Andrew G. Brooks, William R. Heath, and Scott N. Mueller. 2015. "Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4+ and CD8+ T Cell Activation to Localized Viral Infection." *Immunity* 43(3):554–65. doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.020.

Hudson, William H., Julia Gensheimer, Masao Hashimoto, Andreas Wieland, Rajesh M. Valanparambil, Peng Li, Jian-Xin Lin, Bogumila T. Konieczny, Se Jin Im, Gordon J. Freeman, Warren J. Leonard, Haydn T. Kissick, and Rafi Ahmed. 2019. "Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1+ Stem-like CD8+ T Cells during Chronic Infection." *Immunity* 51(6):1043–1058.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2019.11.002.

Huppa, Johannes B., and Mark M. Davis. 2003. "T-Cell-Antigen Recognition and the Immunological Synapse." *Nature Reviews Immunology* 3(12):973–83. doi: 10.1038/nri1245.

Im, Se Jin, Masao Hashimoto, Michael Y. Gerner, Junghwa Lee, Haydn T. Kissick, Matheus C. Burger, Qiang Shan, J. Scott Hale, Judong Lee, Tahseen H. Nasti, Arlene H. Sharpe, Gordon J. Freeman, Ronald N. Germain, Helder I. Nakaya, Hai-Hui Xue, and Rafi Ahmed. 2016. "Defining CD8+ T Cells That Provide the Proliferative Burst after PD-1 Therapy." *Nature* 537(7620):417–21. doi: 10.1038/nature19330.

Jaitin, D. A., E. Kenigsberg, H. Keren-Shaul, N. Elefant, F. Paul, I. Zaretsky, A. Mildner, N. Cohen, S. Jung, A. Tanay, and I. Amit. 2014. "Massively Parallel Single-Cell RNA-Seq for Marker-Free Decomposition of Tissues into Cell Types." *Science* 343(6172):776–79. doi:

10.1126/science.1247651.

Jameson, Stephen C. 2021. "The Naming of Memory T-Cell Subsets." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 13(1):a037788. doi: 10.1101/cshperspect.a037788.

Janssen, Edith M., Edward E. Lemmens, Tom Wolfe, Urs Christen, Matthias G. von Herrath, and Stephen P. Schoenberger. 2003. "CD4+ T Cells Are Required for Secondary Expansion and Memory in CD8+ T Lymphocytes." *Nature* 421(6925):852–56. doi: 10.1038/nature01441.

Joffre, Olivier P., Elodie Segura, Ariel Savina, and Sebastian Amigorena. 2012. "Cross-Presentation by Dendritic Cells." *Nature Reviews Immunology* 12(8):557–69. doi: 10.1038/nri3254.

Johnnidis, Jonathan B., Yuki Muroyama, Shin Foong Ngiow, Zeyu Chen, Sasikanth Manne, Zhangying Cai, Shufei Song, Jesse M. Platt, Jason M. Schenkel, Mohamed Abdel-Hakeem, Jean-Christophe Beltra, Allison R. Greenplate, Mohammed-Alkhatim A. Ali, Kito Nzingha, Josephine R. Giles, Christelle Harly, John Attanasio, Kristen E. Pauken, Bertram Bengsch, Michael A. Paley, Vesselin T. Tomov, Makoto Kurachi, Dario A. A. Vignali, Arlene H. Sharpe, Steven L. Reiner, Avinash Bhandoola, F. Bradley Johnson, and E. John Wherry. 2021. "Inhibitory Signaling Sustains a Distinct Early Memory CD8 + T Cell Precursor That Is Resistant to DNA Damage." *Science Immunology* 6(55):eabe3702. doi: 10.1126/sciimmunol.abe3702.

Joshi, Nikhil S., Weiguo Cui, Anmol Chandele, Heung Kyu Lee, David R. Urso, James Hagman, Laurent Gapin, and Susan M. Kaech. 2007. "Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-Bet Transcription Factor." *Immunity* 27(2):281–95. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.010.

Jouanguy, Emmanuelle, Rainer Ddffinger, Stephanie Dupuis, Annaïck Pallier, Frédéric Altare, and Jean-Laurent Casanova. 1999. "IL-12 and IFN- γ Host Defense against Mycobacteria and Salmonella in Mice and Men." *Current Opinion in Immunology*, 11:346-351.

Jung, Steffen, Derya Unutmaz, Phillip Wong, Gen-Ichiro Sano, Kenia De los Santos, Tim Sparwasser, Shengji Wu, Sri Vuthoori, Kyung Ko, Fidel Zavala, Eric G. Pamer, Dan R. Littman, and Richard A. Lang. 2002. "In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens." *Immunity* 17(2):211–20. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00365-5.

Kaech, Susan M., and Weiguo Cui. 2012. "Transcriptional Control of Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation." *Nature Reviews Immunology* 12(11):749–61. doi: 10.1038/nri3307.

Kaech, Susan M., Joyce T. Tan, E. John Wherry, Bogumila T. Konieczny, Charles D. Surh, and Rafi Ahmed. 2003. "Selective Expression of the Interleukin 7 Receptor Identifies Effector CD8 T Cells That Give Rise to Long-Lived Memory Cells." *Nature Immunology* 4(12):1191–98. doi: 10.1038/ni1009.

Kaech, Susan M., E. John Wherry, and Rafi Ahmed. 2002. "Effector and Memory T-Cell Differentiation: Implications for Vaccine Development." *Nature Reviews Immunology* 2(4):251–62. doi: 10.1038/nri778.

Kägi, David, Françoise Vignaux, Birgit Ledermann, Kurt Bürki, Valérie Depraetere,

Shigekazu Nagata, Hans Hengartner, and Pierre Golstein. 1994. "Fas and Perforin Pathways as Major Mechanisms of T Cell-Mediated Cytotoxicity." *Science* 265(5171):528–30. doi: 10.1126/science.7518614.

Kahan, Shannon M., Rakesh K. Bakshi, Jennifer T. Ingram, R. Curtis Hendrickson, Elliot J. Lefkowitz, David K. Crossman, Laurie E. Harrington, Casey T. Weaver, and Allan J. Zajac. 2022. "Intrinsic IL-2 Production by Effector CD8 T Cells Affects IL-2 Signaling and Promotes Fate Decisions, Stemness, and Protection." *Science Immunology* 7(68):eabl6322. doi: 10.1126/sciimmunol.abl6322.

Kakaradov, Boyko, Janilyn Arsenio, Christella E. Widjaja, Zhaoren He, Stefan Aigner, Patrick J. Metz, Bingfei Yu, Ellen J. Wehrens, Justine Lopez, Stephanie H. Kim, Elina I. Zuniga, Ananda W. Goldrath, John T. Chang, and Gene W. Yeo. 2017. "Early Transcriptional and Epigenetic Regulation of CD8+ T Cell Differentiation Revealed by Single-Cell RNA Sequencing." *Nature Immunology* 18(4):422–32. doi: 10.1038/ni.3688.

Kalia, Vandana, and Surojit Sarkar. 2018. "Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2—A Balancing Act." *Frontiers in Immunology* 9:2987. doi: 10.3389/fimmu.2018.02987.

Kalia, Vandana, Surojit Sarkar, Shruti Subramaniam, W. Nicholas Haining, Kendall A. Smith, and Rafi Ahmed. 2010. "Prolonged Interleukin-2R α Expression on Virus-Specific CD8+ T Cells Favors Terminal-Effector Differentiation In Vivo." *Immunity* 32(1):91–103. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.010.

Katzenelenbogen, Yonatan, Fadi Sheban, Adam Yalin, Ido Yofe, Dmitry Svetlichnyy, Diego Adhemar Jaitin, Chamutal Bornstein, Adi Moshe, Hadas Keren-Shaul, Merav Cohen, Shuang-Yin Wang, Baoguo Li, Eyal David, Tomer-Meir Salame, Assaf Weiner, and Ido Amit. 2020. "Coupled scRNA-Seq and Intracellular Protein Activity Reveal an Immunosuppressive Role of TREM2 in Cancer." *Cell* 182(4):872-885.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.032.

Kaur, Manpreet, Dhaneshwar Kumar, Vincent Butty, Sudhakar Singh, Alexandre Esteban, Gerald R. Fink, Hidde L. Ploegh, and Sharvan Sehrawat. 2018. "Galectin-3 Regulates γ -Herpesvirus Specific CD8 T Cell Immunity." *iScience* 9:101–19. doi: 10.1016/j.isci.2018.10.013.

Kersh, Ellen N., David R. Fitzpatrick, Kaja Murali-Krishna, John Shires, Samuel H. Speck, Jeremy M. Boss, and Rafi Ahmed. 2006. "Rapid Demethylation of the IFN γ Gene Occurs in Memory but Not Naive CD8 T Cells." *The Journal of Immunology* 176(7):4083–93. doi: 10.4049/jimmunol.176.7.4083.

Kieper, William C., J. Theodore Burghardt, and Charles D. Surh. 2004. "A Role for TCR Affinity in Regulating Naive T Cell Homeostasis." *The Journal of Immunology* 172(1):40–44. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.40.

Kinjyo, Ichiko, Jim Qin, Sioh-Yang Tan, Cameron J. Wellard, Paulus Mrass, William Ritchie, Atsushi Doi, Lois L. Cavanagh, Michio Tomura, Asako Sakaue-Sawano, Osami Kanagawa, Atsushi Miyawaki, Philip D. Hodgkin, and Wolfgang Weninger. 2015. "Real-Time Tracking of Cell Cycle Progression during CD8+ Effector and Memory T-Cell Differentiation." *Nature Communications* 6(1):6301. doi: 10.1038/ncomms7301.

Kolumam, Ganesh A., Sunil Thomas, Lucas J. Thompson, Jonathan Sprent, and Kaja Murali-Krishna. 2005. "Type I Interferons Act Directly on CD8 T Cells to Allow Clonal Expansion and Memory Formation in Response to Viral Infection." *Journal of Experimental Medicine* 202(5):637–50. doi: 10.1084/jem.20050821.

Kretschmer, Lorenz, Michael Flossdorf, Jonas Mir, Yi-Li Cho, Marten Plambeck, Irina Treise, Albulena Toska, Susanne Heinzel, Matthias Schiemann, Dirk H. Busch, and Veit R. Buchholz. 2020. "Differential Expansion of T Central Memory Precursor and Effector Subsets Is Regulated by Division Speed." *Nature Communications* 11(1):113. doi: 10.1038/s41467-019-13788-w.

Krummel, Matthew F., and James P. Allison. 1995. "CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T Cells to Stimulation." *Journal of Experimental Medicine*, 459–65.

Kumar, Brahma V., Wenji Ma, Michelle Miron, Tomer Granot, Rebecca S. Guyer, Dustin J. Carpenter, Takashi Senda, Xiaoyun Sun, Siu-Hong Ho, Harvey Lerner, Amy L. Friedman, Yufeng Shen, and Donna L. Farber. 2017. "Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites." *Cell Reports* 20(12):2921–34. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.078.

Kurd, Nadia S., Zhaoren He, Tiani L. Louis, J. Justin Milner, Kyla D. Omilusik, Wenhao Jin, Matthew S. Tsai, Christella E. Widjaja, Jad N. Kanbar, Jocelyn G. Olvera, Tiffani Tysl, Lauren K. Quezada, Brigid S. Boland, Wendy J. Huang, Cornelis Murre, Ananda W. Goldrath, Gene W. Yeo, and John T. Chang. 2020. "Early Precursors and Molecular Determinants of Tissue-Resident Memory CD8 + T Lymphocytes Revealed by Single-Cell RNA Sequencing." *Science Immunology* 5(47):eaaz6894. doi: 10.1126/sciimmunol.aaz6894.

La Manno, Gioele, Ruslan Soldatov, Amit Zeisel, Emelie Braun, Hannah Hochgerner, Viktor Petukhov, Katja Lidschreiber, Maria E. Kastriiti, Peter Lönnerberg, Alessandro Furlan, Jean Fan, Lars E. Borm, Zehua Liu, David van Bruggen, Jimin Guo, Xiaoling He, Roger Barker, Erik Sundström, Gonçalo Castelo-Branco, Patrick Cramer, Igor Adameyko, Sten Linnarsson, and Peter V. Kharchenko. 2018. "RNA Velocity of Single Cells." *Nature* 560(7719):494–98. doi: 10.1038/s41586-018-0414-6.

Lanzavecchia, Antonio, and Federica Sallusto. 2002. "Progressive Differentiation and Selection of the Fittest in the Immune Response." *Nature Reviews Immunology* 2(12):982–87. doi: 10.1038/nri959.

Law, Ruby H. P., Natalya Lukyanova, Ilia Voskoboinik, Tom T. Caradoc-Davies, Katherine Baran, Michelle A. Dunstone, Michael E. D'Angelo, Elena V. Orlova, Fasséli Coulibaly, Sandra Verschoor, Kylie A. Browne, Annette Ciccone, Michael J. Kuiper, Phillip I. Bird, Joseph A. Trapani, Helen R. Saibil, and James C. Whisstock. 2010. "The Structural Basis for Membrane Binding and Pore Formation by Lymphocyte Perforin." *Nature* 468(7322):447–51. doi: 10.1038/nature09518.

Lin, Wen-Hsuan W., Simone A. Nish, Bonnie Yen, Yen-Hua Chen, William C. Adams, Radomir Kratchmarov, Nyanza J. Rothman, Avinash Bhandoola, Hai-Hui Xue, and Steven L. Reiner. 2016. "CD8 + T Lymphocyte Self-Renewal during Effector Cell Determination." *Cell Reports* 17(7):1773–82. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.032.

Link, Alexander, Tobias K. Vogt, Stéphanie Favre, Mirjam R. Britschgi, Hans Acha-Orbea, Boris Hinz, Jason G. Cyster, and Sanjiv A. Luther. 2007. "Fibroblastic Reticular Cells in Lymph Nodes Regulate the Homeostasis of Naive T Cells." *Nature Immunology* 8(11):1255–65. doi: 10.1038/ni1513.

Luecken, Malte D., and Fabian J. Theis. 2019. "Current Best Practices in Single-cell RNA-seq Analysis: A Tutorial." *Molecular Systems Biology* 15(6). doi: 10.15252/msb.20188746.

Lugli, Enrico, Maria H. Dominguez, Luca Gattinoni, Pratip K. Chattopadhyay, Diane L. Bolton, Kaimei Song, Nichole R. Klatt, Jason M. Brenchley, Monica Vaccari, Emma Gostick, David A. Price, Thomas A. Waldmann, Nicholas P. Restifo, Genevieve Franchini, and Mario Roederer. 2013. "Superior T Memory Stem Cell Persistence Supports Long-Lived T Cell Memory." *Journal of Clinical Investigation* JCI66327. doi: 10.1172/JCI66327.

Mariuzza, Roy A., Pragati Agnihotri, and John Orban. 2020. "The Structural Basis of T-Cell Receptor (TCR) Activation: An Enduring Enigma." *Journal of Biological Chemistry* 295(4):914–25. doi: 10.1016/S0021-9258(17)49904-2.

Masopust, David, Daniel Choo, Vaiva Vezys, E. John Wherry, Jaikumar Duraiswamy, Rama Akondy, Jun Wang, Kerry A. Casey, Daniel L. Barber, Kim S. Kawamura, Kathryn A. Fraser, Richard J. Webby, Volker Brinkmann, Eugene C. Butcher, Kenneth A. Newell, and Rafi Ahmed. 2010. "Dynamic T Cell Migration Program Provides Resident Memory within Intestinal Epithelium." *Journal of Experimental Medicine* 207(3):553–64. doi: 10.1084/jem.20090858.

Masopust, David, and Jason M. Schenkel. 2013. "The Integration of T Cell Migration, Differentiation and Function." *Nature Reviews Immunology* 13(5):309–20. doi: 10.1038/nri3442.

McInnes, Leland, John Healy, and James Melville. 2020. "UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction."

Mempel, Thorsten R., Sarah E. Henrickson, and Ulrich H. von Andrian. 2004. "T-Cell Priming by Dendritic Cells in Lymph Nodes Occurs in Three Distinct Phases." *Nature* 427(6970):154–59. doi: 10.1038/nature02238.

Mercer, Tim R., Shane Neph, Marcel E. Dinger, Joanna Crawford, Martin A. Smith, Anne-Marie J. Shearwood, Eric Haugen, Cameron P. Bracken, Oliver Rackham, John A. Stamatoyannopoulos, Aleksandra Filipovska, and John S. Mattick. 2011. "The Human Mitochondrial Transcriptome." *Cell* 146(4):645–58. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.051.

Miller, Mark J., Arsalan S. Hejazi, Sindy H. Wei, Michael D. Cahalan, and Ian Parker. 2004. "T Cell Repertoire Scanning Is Promoted by Dynamic Dendritic Cell Behavior and Random T Cell Motility in the Lymph Node." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(4):998–1003. doi: 10.1073/pnas.0306407101.

Milner, J. Justin, Hongtuyet Nguyen, Kyla Omilusik, Miguel Reina-Campos, Matthew Tsai, Clara Toma, Arnaud Delpoux, Brigid S. Boland, Stephen M. Hedrick, John T. Chang, and Ananda W. Goldrath. 2020. "Delineation of a Molecularly Distinct Terminally Differentiated Memory CD8 T Cell Population." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(41):25667–78. doi: 10.1073/pnas.2008571117.

Monks, Colin R. F., Benjamin A. Freiberg, Hannah Kupfer, Noah Sciaky, and Abraham

Kupfer. 1998. "Three-Dimensional Segregation of Supramolecular Activation Clusters in T Cells." *Nature* 395(6697):82–86. doi: 10.1038/25764.

Mou, Tian, Wenjiang Deng, Fengyun Gu, Yudi Pawitan, and Trung Nghia Vu. 2020. "Reproducibility of Methods to Detect Differentially Expressed Genes from Single-Cell RNA Sequencing." *Frontiers in Genetics* 10:1331. doi: 10.3389/fgene.2019.01331.

Ngoenkam, Jatuporn, Wolfgang W. Schamel, and Sutatip Pongcharoen. 2018. "Selected Signalling Proteins Recruited to the T-Cell Receptor-CD3 Complex." *Immunology* 153(1):42–50. doi: 10.1111/imm.12809.

Nguyen, Michelle L. T., Sarah A. Jones, Julia E. Prier, and Brendan E. Russ. 2015. "Transcriptional Enhancers in the Regulation of T Cell Differentiation." *Frontiers in Immunology* 6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00462.

Nolz, Jeffrey C., Gabriel R. Starbeck-Miller, and John T. Harty. 2011. "Naive, Effector and Memory CD8 T-Cell Trafficking: Parallels and Distinctions." [Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Imt.11.100](http://Dx.Doi.Org/10.2217/Imt.11.100). Retrieved June 27, 2022 (<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/imt.11.100>).

Obar, Joshua J., Kamal M. Khanna, and Leo Lefrançois. 2008. "Endogenous Naive CD8+ T Cell Precursor Frequency Regulates Primary and Memory Responses to Infection." *Immunity* 28(6):859–69. doi: 10.1016/j.immuni.2008.04.010.

Olson, Janelle A., Cameron McDonald-Hyman, Stephen C. Jameson, and Sara E. Hamilton. 2013. "Effector-like CD8+ T Cells in the Memory Population Mediate Potent Protective Immunity." *Immunity* 38(6):1250–60. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.009.

Omilusik, Kyla D., J. Adam Best, Bingfei Yu, Steven Goossens, Alexander Weidemann, Jessica V. Nguyen, Eve Seuntjens, Agata Stryjewska, Christiane Zweier, Rahul Roychoudhuri, Luca Gattinoni, Lynne M. Bird, Yujiro Higashi, Hisato Kondoh, Danny Huylebroeck, Jody Haigh, and Ananda W. Goldrath. 2015. "Transcriptional Repressor ZEB2 Promotes Terminal Differentiation of CD8+ Effector and Memory T Cell Populations during Infection." *Journal of Experimental Medicine* 212(12):2027–39. doi: 10.1084/jem.20150194.

Opferman, Joseph T., Anthony Letai, Caroline Beard, Mia D. Sorcinelli, Christy C. Ong, and Stanley J. Korsmeyer. 2003. "Development and Maintenance of B and T Lymphocytes Requires Antiapoptotic MCL-1." *Nature* 426(6967):671–76. doi: 10.1038/nature02067.

Opferman, Joseph T., Bertram T. Ober, and Philip G. Ashton-Rickardt. 1999. "Linear Differentiation of Cytotoxic Effectors into Memory T Lymphocytes." *Science* 283(5408):1745–48. doi: 10.1126/science.283.5408.1745.

Osii, Rowland S., Thomas D. Otto, Paul Garside, Francis M. Ndungu, and James M. Brewer. 2020. "The Impact of Malaria Parasites on Dendritic Cell–T Cell Interaction." *Frontiers in Immunology* 11:1597. doi: 10.3389/fimmu.2020.01597.

Pace, Luigia, Christel Goudot, Elina Zueva, Paul Gueguen, Nina Burgdorf, Joshua J. Waterfall, Jean-Pierre Quivy, Geneviève Almouzni, and Sebastian Amigorena. 2018. "The Epigenetic Control of Stemness in CD8 + T Cell Fate Commitment." *Science* 359(6372):177–86. doi: 10.1126/science.aah6499.

Pais Ferreira, Daniela, Joana Gomes Silva, Tania Wyss, Silvia A. Fuertes Marraco,

Léonardo Scarpellino, Mélanie Charmoy, Roeltje Maas, Imran Siddiqui, Li Tang, Johanna A. Joyce, Mauro Delorenzi, Sanjiv A. Luther, Daniel E. Speiser, and Werner Held. 2020. "Central Memory CD8+ T Cells Derive from Stem-like Tcf7hi Effector Cells in the Absence of Cytotoxic Differentiation." *Immunity* 53(5):985-1000.e11. doi: 10.1016/j.immuni.2020.09.005.

Papalexi, Efthymia, and Rahul Satija. 2018. "Single-Cell RNA Sequencing to Explore Immune Cell Heterogeneity." *Nature Reviews Immunology* 18(1):35–45. doi: 10.1038/nri.2017.76.

Pauken, Kristen E., Jernej Godec, Pamela M. Odorizzi, Keturah E. Brown, Kathleen B. Yates, Shin Foong Ngiow, Kelly P. Burke, Seth Maleri, Shannon M. Grande, Loise M. Francisco, Mohammed-Alkhatim Ali, Sabrina Imam, Gordon J. Freeman, W. Nicholas Haining, E. John Wherry, and Arlene H. Sharpe. 2020. "The PD-1 Pathway Regulates Development and Function of Memory CD8+ T Cells Following Respiratory Viral Infection." *Cell Reports* 31(13):107827. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107827.

Pellegrini, Marc, Gabrielle Belz, Philippe Bouillet, and Andreas Strasser. 2003. "Shutdown of an Acute T Cell Immune Response to Viral Infection Is Mediated by the Proapoptotic Bcl-2 Homology 3-Only Protein Bim." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(24):14175–80. doi: 10.1073/pnas.2336198100.

Petit, Anne-Elisabeth, Nathalie Demotte, Benoît Scheid, Claude Wildmann, René Bigirimana, Monica Gordon-Alonso, Javier Carrasco, Salvatore Valitutti, Danièle Godelaine, and Pierre van der Bruggen. 2016. "A Major Secretory Defect of Tumour-Infiltrating T Lymphocytes Due to Galectin Impairing LFA-1-Mediated Synapse Completion." *Nature Communications* 7(1):12242. doi: 10.1038/ncomms12242.

Picelli, Simone, Omid R. Faridani, Åsa K. Björklund, Gösta Winberg, Sven Sagasser, and Rickard Sandberg. 2014. "Full-Length RNA-Seq from Single Cells Using Smart-Seq2." *Nature Protocols* 9(1):171–81. doi: 10.1038/nprot.2014.006.

Pipkin, Matthew E. 2021. "Runx Proteins and Transcriptional Mechanisms That Govern Memory CD8 T Cell Development." *Immunological Reviews* 300(1):100–124. doi: 10.1111/imr.12954.

Pipkin, Matthew E., Jilian A. Sacks, Fernando Cruz-Guilloty, Mathias G. Lichtenheld, Michael J. Bevan, and Anjana Rao. 2010. "Interleukin-2 and Inflammation Induce Distinct Transcriptional Programs That Promote the Differentiation of Effector Cytolytic T Cells." *Immunity* 32(1):79–90. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.012.

Plumlee, Courtney R., Joshua J. Obar, Sara L. Colpitts, Evan R. Jellison, W. Nicholas Haining, Leo Lefrancois, and Kamal M. Khanna. 2015. "Early Effector CD8 T Cells Display Plasticity in Populating the Short-Lived Effector and Memory-Precursor Pools Following Bacterial or Viral Infection." *Scientific Reports* 5(1):12264. doi: 10.1038/srep12264.

Pollizzi, Kristen N., Im-Hong Sun, Chirag H. Patel, Ying-Chun Lo, Min-Hee Oh, Adam T. Waickman, Ada J. Tam, Richard L. Blosser, Jiayu Wen, Greg M. Delgoffe, and Jonathan D. Powell. 2016. "Asymmetric Inheritance of MTORC1 Kinase Activity during Division Dictates CD8+ T Cell Differentiation." *Nature Immunology* 17(6):704–11. doi: 10.1038/ni.3438.

Prlic, Martin, Gabriela Hernandez-Hoyos, and Michael J. Bevan. 2006. "Duration of the

Initial TCR Stimulus Controls the Magnitude but Not Functionality of the CD8+ T Cell Response.” *Journal of Experimental Medicine* 203(9):2135–43. doi: 10.1084/jem.20060928.

Ray, Steven J., Suzanne N. Franki, Robert H. Pierce, Snezhana Dimitrova, Victor Koteliansky, Andrew G. Sprague, Peter C. Doherty, Antonin R. de Fougères, and David J. Topham. 2004. “The Collagen Binding α 1^L1 Integrin VLA-1 Regulates CD8 T Cell-Mediated Immune Protection against Heterologous Influenza Infection.”

Redeker, Anke, Suzanne P. M. Welten, Miranda R. M. Baert, Sandra A. Vloemans, Machteld M. Tiemessen, Frank J. T. Staal, and Ramon Arens. 2015. “The Quantity of Autocrine IL-2 Governs the Expansion Potential of CD8 + T Cells.” *The Journal of Immunology* 195(10):4792–4801. doi: 10.4049/jimmunol.1501083.

Renkema, Kristin R., Matthew A. Huggins, Henrique Borges da Silva, Todd P. Knutson, Christy M. Henzler, and Sara E. Hamilton. 2020. “KLRG1 + Memory CD8 T Cells Combine Properties of Short-Lived Effectors and Long-Lived Memory.” *The Journal of Immunology* 205(4):1059–69. doi: 10.4049/jimmunol.1901512.

Ritter, Alex T., Yukako Asano, Jane C. Stinchcombe, N. M. G. Dieckmann, Bi-Chang Chen, C. Gawden-Bone, Schuyler van Engelenburg, Wesley Legant, Liang Gao, Michael W. Davidson, Eric Betzig, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Gillian M. Griffiths. 2015. “Actin Depletion Initiates Events Leading to Granule Secretion at the Immunological Synapse.” *Immunity* 42(5):864–76. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.013.

Saelens, Wouter, Robrecht Cannoodt, Helena Todorov, and Yvan Saeys. 2019. “A Comparison of Single-Cell Trajectory Inference Methods.” *Nature Biotechnology* 37(5):547–54. doi: 10.1038/s41587-019-0071-9.

de Saint Basile, Geneviève, Gaël Ménasché, and Alain Fischer. 2010. “Molecular Mechanisms of Biogenesis and Exocytosis of Cytotoxic Granules.” *Nature Reviews Immunology* 10(8):568–79. doi: 10.1038/nri2803.

Sakuishi, Kaori, Lionel Apetoh, Jenna M. Sullivan, Bruce R. Blazar, Vijay K. Kuchroo, and Ana C. Anderson. 2010. “Targeting Tim-3 and PD-1 Pathways to Reverse T Cell Exhaustion and Restore Anti-Tumor Immunity.” *Journal of Experimental Medicine* 207(10):2187–94. doi: 10.1084/jem.20100643.

Sallusto, Federica, Danielle Lenig, and Antonio Lanzavecchia. 1999. “Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions.” 401.

Sarkar, Surojit, Vandana Kalia, W. Nicholas Haining, Bogumila T. Konieczny, Shruti Subramaniam, and Rafi Ahmed. 2008. “Functional and Genomic Profiling of Effector CD8 T Cell Subsets with Distinct Memory Fates.” *Journal of Experimental Medicine* 205(3):625–40. doi: 10.1084/jem.20071641.

Schenkel, Jason M., Kathryn A. Fraser, Lalit K. Beura, Kristen E. Pauken, Vaiva Vezys, and David Masopust. 2014. “Resident Memory CD8 T Cells Trigger Protective Innate and Adaptive Immune Responses.” *Science* 346(6205):98–101. doi: 10.1126/science.1254536.

Schluns, Kimberly S., William C. Kieper, Stephen C. Jameson, and Leo Lefrançois. 2000. “Interleukin-7 Mediates the Homeostasis of Naïve and Memory CD8 T Cells in Vivo.” *Nature Immunology* 1(5):426–32. doi: 10.1038/80868.

Sharpe, Arlene H., and Gordon J. Freeman. 2002. "The B7–CD28 Superfamily." *Nature Reviews Immunology* 2(2):116–26. doi: 10.1038/nri727.

Shedlock, Devon J., and Hao Shen. 2003. "Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory." *Science* 300(5617):337–39. doi: 10.1126/science.1082305.

Shin, Hyun Mu, Varun N. Kapoor, Gwanghun Kim, Peng Li, Hang-Rae Kim, M. Suresh, Susan M. Kaech, E. John Wherry, Liisa K. Selin, Warren J. Leonard, Raymond M. Welsh, and Leslie J. Berg. 2017. "Transient Expression of ZBTB32 in Anti-Viral CD8+ T Cells Limits the Magnitude of the Effector Response and the Generation of Memory." *PLOS Pathogens* 13(8):e1006544. doi: 10.1371/journal.ppat.1006544.

Sigal, Luis J. 2016. "Activation of CD8 T Lymphocytes during Viral Infections." Pp. 286–90 in *Encyclopedia of Immunobiology*. Elsevier.

Smith, Logan K., Giselle M. Boukhaled, Stephanie A. Condotta, Sabrina Mazouz, Jenna J. Guthmiller, Rahul Vijay, Noah S. Butler, Julie Bruneau, Naglaa H. Shoukry, Connie M. Krawczyk, and Martin J. Richer. 2018. "Interleukin-10 Directly Inhibits CD8+ T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity." *Immunity* 48(2):299–312.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.006.

Smyth, Mark J., and Ricky W. Johnstone. 2000. "Role of TNF in Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity." *Microscopy Research and Technique* 50(3):196–208. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<196::AID-JEMT3>3.0.CO;2-9.

Soerens, Andrew G., Marco Künzli, Clare F. Quarntstrom, Milcah C. Scott, Lee Swanson, Jj. Locquiao, Hazem E. Ghoneim, Dietmar Zehn, Benjamin Youngblood, Vaiva Vezys, and David Masopust. 2023. "Functional T Cells Are Capable of Supernumerary Cell Division and Longevity." *Nature* 614(7949):762–66. doi: 10.1038/s41586-022-05626-9.

Solouki, Sabrina, Weishan Huang, Jessica Elmore, Candice Limper, Fei Huang, and Avery August. 2020. "TCR Signal Strength and Antigen Affinity Regulate CD8 + Memory T Cells." *The Journal of Immunology* 205(5):1217–27. doi: 10.4049/jimmunol.1901167.

Soneson, Charlotte, and Mark D. Robinson. 2018. "Bias, Robustness and Scalability in Single-Cell Differential Expression Analysis." *Nature Methods* 15(4):255–61. doi: 10.1038/nmeth.4612.

Stegmayr, John, Fredrik Zetterberg, Michael C. Carlsson, Xiaoli Huang, Gunjan Sharma, Barbro Kahl-Knutson, Hans Schambye, Ulf J. Nilsson, Stina Oredsson, and Hakon Leffler. 2019. "Extracellular and Intracellular Small-Molecule Galectin-3 Inhibitors." *Scientific Reports* 9(1):2186. doi: 10.1038/s41598-019-38497-8.

Stemberger, Christian, Katharina M. Huster, Martina Koffler, Florian Anderl, Matthias Schiemann, Hermann Wagner, and Dirk H. Busch. 2007. "A Single Naive CD8+ T Cell Precursor Can Develop into Diverse Effector and Memory Subsets." *Immunity* 27(6):985–97. doi: 10.1016/j.immuni.2007.10.012.

Stinchcombe, Jane C., Endre Majorovits, Giovanna Bossi, Stephen Fuller, and Gillian M. Griffiths. 2006. "Centrosome Polarization Delivers Secretory Granules to the Immunological Synapse." *Nature* 443(7110):462–65. doi: 10.1038/nature05071.

Stoeckius, Marlon, Christoph Hafemeister, William Stephenson, Brian Houck-Loomis, Pratip K. Chattopadhyay, Harold Swerdlow, Rahul Satija, and Peter Smibert. 2017. "Simultaneous Epitope and Transcriptome Measurement in Single Cells." *Nature Methods* 14(9):865–68. doi: 10.1038/nmeth.4380.

Street, Kelly, Davide Risso, Russell B. Fletcher, Diya Das, John Ngai, Nir Yosef, Elizabeth Purdom, and Sandrine Dudoit. 2018. "Slingshot: Cell Lineage and Pseudotime Inference for Single-Cell Transcriptomics." *BMC Genomics* 19(1):477. doi: 10.1186/s12864-018-4772-0.

Stuart, Tim, Andrew Butler, Paul Hoffman, Christoph Hafemeister, Efthymia Papalexi, William M. Mauck, Yuhan Hao, Marlon Stoeckius, Peter Smibert, and Rahul Satija. 2019. "Comprehensive Integration of Single-Cell Data." *Cell* 177(7):1888-1902.e21. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.031.

Sun, Joseph C., and Michael J. Bevan. 2003. "Defective CD8 T Cell Memory Following Acute Infection Without CD4 T Cell Help." *Science* 300(5617):339–42. doi: 10.1126/science.1083317.

Surh, Charles D., and Jonathan Sprent. 2008. "Homeostasis of Naive and Memory T Cells." *Immunity* 29(6):848–62. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.002.

Svensson, Valentine, Kedar Nath Natarajan, Lam-Ha Ly, Ricardo J. Miragaia, Charlotte Labalette, Iain C. Macaulay, Ana Cvejic, and Sarah A. Teichmann. 2017. "Power Analysis of Single-Cell RNA-Sequencing Experiments." *Nature Methods* 14(4):381–87. doi: 10.1038/nmeth.4220.

Szabo, Peter A., Michelle Miron, and Donna L. Farber. 2019. "Location, Location, Location: Tissue Resident Memory T Cells in Mice and Humans." *Science Immunology* 4(34):eaas9673. doi: 10.1126/sciimmunol.aas9673.

Szeto, Christopher, Christian A. Lobos, Andrea T. Nguyen, and Stephanie Gras. 2020. "TCR Recognition of Peptide–MHC-I: Rule Makers and Breakers." *International Journal of Molecular Sciences* 22(1):68. doi: 10.3390/ijms22010068.

Takaba, Hiroyuki, and Hiroshi Takayanagi. 2017. "The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus." *Trends in Immunology* 38(11):805–16. doi: 10.1016/j.it.2017.07.010.

Takemoto, Naofumi, Andrew M. Intlekofer, John T. Northrup, E. John Wherry, and Steven L. Reiner. 2006. "Cutting Edge: IL-12 Inversely Regulates T-Bet and Eomesodermin Expression during Pathogen-Induced CD8+ T Cell Differentiation." *The Journal of Immunology* 177(11):7515–19. doi: 10.4049/jimmunol.177.11.7515.

Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg, and C. D. Surh. 2001. "IL-7 Is Critical for Homeostatic Proliferation and Survival of Naive T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(15):8732–37. doi: 10.1073/pnas.161126098.

Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Pérarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. "Differential Requirements for Survival and Proliferation of CD8 Naïve or Memory T Cells." *Science (New York, N.Y.)* 276(5321):2057–62. doi: 10.1126/science.276.5321.2057.

Thiery, Jerome, Dennis Keefe, Saviz Saffarian, Denis Martinvalet, Michael Walch, Emmanuel Boucrot, Tomas Kirchhausen, and Judy Lieberman. 2010. "Perforin Activates

Clathrin- and Dynamin-Dependent Endocytosis, Which Is Required for Plasma Membrane Repair and Delivery of Granzyme B for Granzyme-Mediated Apoptosis.” *Blood* 115(8):1582–93. doi: 10.1182/blood-2009-10-246116.

Thompson, C. B., T. Lindsten, J. A. Ledbetter, S. L. Kunkel, H. A. Young, S. G. Emerson, J. M. Leiden, and C. H. June. 1989. “CD28 Activation Pathway Regulates the Production of Multiple T-Cell-Derived Lymphokines/Cytokines.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(4):1333–37. doi: 10.1073/pnas.86.4.1333.

Till, J. E., and E. A. McCulloch. 1961. “A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells.” *Radiation Research* 14(2):213–22. doi: 10.2307/3570892.

Todorov, Helena, Margaux Prioux, Daphne Laubreton, Matteo Bouvier, Shaoying Wang, Simon de Bernard, Christophe Arpin, Robrecht Cannoodt, Wouter Saelens, Arnaud Bonnaffoux, Olivier Gandrillon, Fabien Crauste, Yvan Saeys, and Jacqueline Marvel. 2022. “CD8 Memory Precursor Cell Generation Is a Continuous Process.” *IScience* 25(9):104927. doi: 10.1016/j.isci.2022.104927.

Tomura, Michio, Naoki Yoshida, Junko Tanaka, Satoshi Karasawa, Yoshihiro Miwa, Atsushi Miyawaki, and Osami Kanagawa. 2008. “Monitoring Cellular Movement in Vivo with Photoconvertible Fluorescence Protein ‘Kaede’ Transgenic Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(31):10871–76. doi: 10.1073/pnas.0802278105.

Toumi, Ryma, Yevgeniy Yuzefpolskiy, Adithya Vegaraju, Hanxi Xiao, Kendall A. Smith, Surojit Sarkar, and Vandana Kalia. 2022. “Autocrine and Paracrine IL-2 Signals Collaborate to Regulate Distinct Phases of CD8 T Cell Memory.” *Cell Reports* 39(2):110632. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110632.

Tsui, Carlson, Lorenz Kretschmer, Svenja Rapelius, Sarah S. Gabriel, David Chisanga, Konrad Knöpper, Daniel T. Utzschneider, Simone Nüssing, Yang Liao, Teisha Mason, Santiago Valle Torres, Stephen A. Wilcox, Krystian Kanev, Sebastian Jarosch, Justin Leube, Stephen L. Nutt, Dietmar Zehn, Ian A. Parish, Wolfgang Kastenmüller, Wei Shi, Veit R. Buchholz, and Axel Kallies. 2022. “MYB Orchestrates T Cell Exhaustion and Response to Checkpoint Inhibition.” *Nature* 609(7926):354–60. doi: 10.1038/s41586-022-05105-1.

Van der Maaten, Laurence, and Geoffrey Hinton. 2008. “Visualizing Data Using T-SNE.” *Journal of Machine Learning Research*.

Ventre, Elias, Ulysse Herbach, Thibault Espinasse, Gérard Benoit, and Olivier Gandrillon. 2022. One Model Fits All: Combining Inference and Simulation of Gene Regulatory Networks. preprint. *Systems Biology*. doi: 10.1101/2022.06.19.496754.

Voskoboinik, Ilia, James C. Whisstock, and Joseph A. Trapani. 2015. “Perforin and Granzymes: Function, Dysfunction and Human Pathology.” *Nature Reviews Immunology* 15(6):388–400. doi: 10.1038/nri3839.

Vrisekoop, Nienke, Ineke den Braber, Anne Bregje de Boer, An F. C. Ruiters, Mariëtte T. Ackermans, Saskia N. van der Crabben, Elise H. R. Schrijver, Gerrit Spierenburg, Hans P. Sauerwein, Mette D. Hazenberg, Rob J. de Boer, Frank Miedema, José A. M. Borghans, and Kiki Tesselaar. 2008. “Sparse Production but Preferential Incorporation of Recently Produced

Naïve T Cells in the Human Peripheral Pool.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(16):6115–20. doi: 10.1073/pnas.0709713105.

Vu Manh, Thien-Phong, Nicolas Bertho, Anne Hosmalin, Isabelle Schwartz-Cornil, and Marc Dalod. 2015. “Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions.” *Frontiers in Immunology* 6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00260.

Wang, Shaoying. 2022. “The impact of exogenous IL-2 on the generation of CD8 memory precursor in vitro.”

Wei, Qiaozhi, and Paul S. Frenette. 2018. “Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny.” *Immunity* 48(4):632–48. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.024.

Wherry, E. John, Sang-Jun Ha, Susan M. Kaech, W. Nicholas Haining, Surojit Sarkar, Vandana Kalia, Shruti Subramaniam, Joseph N. Blattman, Daniel L. Barber, and Rafi Ahmed. 2007. “Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection.” *Immunity* 27(4):670–84. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.006.

Wherry, E. John, and Makoto Kurachi. 2015. “Molecular and Cellular Insights into T Cell Exhaustion.” *Nature Reviews Immunology* 15(8):486–99. doi: 10.1038/nri3862.

Wherry, E. John, A. Kristin Puorro, Angel Porgador, and C. Laurence Eisenlohr. 1999. “The Induction of Virus-Specific CTL as a Function of Increasing Epitope Expression: Responses Rise Steadily Until Excessively High Levels of Epitope Are Attained.” *The Journal of Immunology*, 3735–45.

Williams, Matthew A., Aaron J. Tyznik, and Michael J. Bevan. 2006. “Interleukin-2 Signals during Priming Are Required for Secondary Expansion of CD8+ Memory T Cells.” *Nature* 441(7095):890–93. doi: 10.1038/nature04790.

Wolchok, Jedd D., Harriet Kluger, Margaret K. Callahan, Michael A. Postow, Naiyer A. Rizvi, Alexander M. Lesokhin, Neil H. Segal, Charlotte E. Ariyan, Ruth-Ann Gordon, Kathleen Reed, Matthew M. Burke, Anne Caldwell, Stephanie A. Kronenberg, Blessing U. Agunwamba, Xiaoling Zhang, Israel Lowy, Hector David Inzunza, William Feely, Christine E. Horak, Quan Hong, Alan J. Korman, Jon M. Wigginton, Ashok Gupta, and Mario Sznol. 2013. “Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma.” *New England Journal of Medicine* 369(2):122–33. doi: 10.1056/NEJMoa1302369.

Yang, Cliff Y., J. Adam Best, Jamie Knell, Edward Yang, Alison D. Sheridan, Adam K. Jesionek, Haiyan S. Li, Richard R. Rivera, Kristin Camfield Lind, Louise M. D’Cruz, Stephanie S. Watowich, Cornelis Murre, and Ananda W. Goldrath. 2011. “The Transcriptional Regulators Id2 and Id3 Control the Formation of Distinct Memory CD8+ T Cell Subsets.” *Nature Immunology* 12(12):1221–29. doi: 10.1038/ni.2158.

Yang, Yiping, and James M. Wilson. 1996. “CD40 Ligand-Dependent T Cell Activation: Requirement of B7-CD28 Signaling Through CD40.” *Science* 273(5283):1862–64. doi: 10.1126/science.273.5283.1862.

Yao, Chen, Guohua Lou, Hong-Wei Sun, Ziang Zhu, Yi Sun, Zeyu Chen, Daniel Chauss, E. Ashley Moseman, Jun Cheng, Marc A. D’Antonio, Wangke Shi, Junwei Shi, Kohei Kometani, Tomohiro Kurosaki, E. John Wherry, Behdad Afzali, Luca Gattinoni, Yuwen Zhu, Dorian B. McGavern, John J. O’Shea, Pamela L. Schwartzberg, and Tuoqi Wu. 2021. “BACH2 Enforces the

Transcriptional and Epigenetic Programs of Stem-like CD8+ T Cells.” *Nature Immunology* 22(3):370–80. doi: 10.1038/s41590-021-00868-7.

Yao, Chen, Hong-Wei Sun, Neal E. Lacey, Yun Ji, E. Ashley Moseman, Han-Yu Shih, Elisabeth F. Heuston, Martha Kirby, Stacie Anderson, Jun Cheng, Omar Khan, Robin Handon, Julie Reilley, Jessica Fioravanti, Jinhui Hu, Selamawit Gossa, E. John Wherry, Luca Gattinoni, Dorian B. McGavern, John J. O’Shea, Pamela L. Schwartzberg, and Tuoqi Wu. 2019. “Single-Cell RNA-Seq Reveals TOX as a Key Regulator of CD8+ T Cell Persistence in Chronic Infection.” *Nature Immunology* 20(7):890–901. doi: 10.1038/s41590-019-0403-4.

Yates, Andrew. 2014. “Theories and Quantification of Thymic Selection.” *Frontiers in Immunology* 5.

Youngblood, Ben, J. Scott Hale, and Rafi Ahmed. 2015. “Memory CD8 T Cell Transcriptional Plasticity.” *F1000Prime Reports* 7. doi: 10.12703/P7-38.

Youngblood, Ben, J. Scott Hale, Haydn T. Kissick, Eunseon Ahn, Xiaojin Xu, Andreas Wieland, Koichi Araki, Erin E. West, Hazem E. Ghoneim, Yiping Fan, Pranay Dogra, Carl W. Davis, Bogumila T. Konieczny, Rustom Antia, Xiaodong Cheng, and Rafi Ahmed. 2017. “Effector CD8 T Cells Dedifferentiate into Long-Lived Memory Cells.” *Nature* 552(7685):404–9. doi: 10.1038/nature25144.

Zajac, Allan J., Joseph N. Blattman, Kaja Murali-Krishna, David J. D. Sourdive, M. Suresh, John D. Altman, and Rafi Ahmed. 1998. “Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function.” *Journal of Experimental Medicine* 188(12):2205–13. doi: 10.1084/jem.188.12.2205.

Zehn, Dietmar, Sarah Y. Lee, and Michael J. Bevan. 2009. “Complete but Curtailed T-Cell Response to Very Low-Affinity Antigen.” *Nature* 458(7235):211–14. doi: 10.1038/nature07657.

Zhang, Yi, Gerard Joe, Elizabeth Hexner, Jiang Zhu, and Stephen G. Emerson. 2005. “Host-Reactive CD8+ Memory Stem Cells in Graft-versus-Host Disease.” *Nature Medicine* 11(12):1299–1305. doi: 10.1038/nm1326.

Zhou, Fang. 2009. “Molecular Mechanisms of IFN- γ to Up-Regulate MHC Class I Antigen Processing and Presentation.” *International Reviews of Immunology* 28(3–4):239–60. doi: 10.1080/08830180902978120.

Zhou, Xinyuan, Shuyang Yu, Dong-Mei Zhao, John T. Harty, Vladimir P. Badovinac, and Hai-Hui Xue. 2010. “Differentiation and Persistence of Memory CD8+ T Cells Depend on T Cell Factor 1.” *Immunity* 33(2):229–40. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.002.

Ziegenhain, Christoph, Beate Vieth, Swati Parekh, Björn Reinius, Amy Guillaumet-Adkins, Martha Smets, Heinrich Leonhardt, Holger Heyn, Ines Hellmann, and Wolfgang Enard. 2017. “Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods.” *Molecular Cell* 65(4):631-643.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2017.01.023.