



HAL
open science

Caractérisation multi-échelle de la dynamique de croissance d'un réseau fongique : étude du champignon filamentueux *Podospora anserina*

Clara Ledoux

► **To cite this version:**

Clara Ledoux. Caractérisation multi-échelle de la dynamique de croissance d'un réseau fongique : étude du champignon filamentueux *Podospora anserina*. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5018 . tel-04295508

HAL Id: tel-04295508

<https://theses.hal.science/tel-04295508v1>

Submitted on 20 Nov 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.

UNIVERSITÉ PARIS CITÉ

École doctorale n°563 : Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries
Laboratoire Interdisciplinaire des Énergies de Demain (LIED UMR 8236)

THÈSE DE DOCTORAT

présentée par

Clara LEDOUX

Dirigée par M^{me} Florence CHAPELAND-LECLERC

Soutenue publiquement le 28 mars 2023

Discipline : Microbiologie

Caractérisation multi-échelle de la dynamique de croissance d'un réseau fongique : étude du champignon filamenteux *Podospora anserina*

Rapporteurs :

M^{me} Fabienne MALAGNAC
M. Patrick PERRÉ

Pr, Université Paris-Saclay
Pr, CentraleSupélec

Examineurs :

M^{me} Martine BASSILANA
M. Marc DURAND
M. Éric HERBERT

DR, Université Côte d'Azur
MCF, Université Paris Cité
MCF, Université Paris Cité

Directrice de thèse :

M^{me} Florence CHAPELAND-LECLERC

Pr, Université Paris Cité

Membre invité :

M^{me} Catherine VILLARD

DR, Université Paris Cité

Résumé

Caractérisation multi-échelle de la dynamique de croissance d'un réseau fongique : étude du champignon filamenteux *Podospora anserina*

La forme végétative des champignons filamenteux est constituée par un réseau branchant d'hyphes en croissance, le mycélium. Cette structure dynamique permet la croissance optimale de l'organisme et sa reproduction. Le réseau mycélien est particulièrement efficace pour l'exploration et l'exploitation de son environnement.

Dans cette étude, la dynamique de croissance en deux dimensions du champignon filamenteux *Podospora anserina* a été caractérisée par une approche multi-échelle. À partir d'un dispositif de microscopie en champ clair développé au laboratoire, nous obtenons une collection d'images du mycélium, régulièrement réparties sur les 20 premières heures de croissance à partir de la germination d'une ascospore. Les images couvrent l'intégralité de la surface du mycélium (jusqu'à 1 cm), tout en conservant une résolution permettant de distinguer individuellement les hyphes (5 μm).

L'analyse du réseau mycélien dans sa globalité s'appuie sur l'extraction de grandeurs dynamiques caractéristiques du développement et de la complexité du réseau : longueur du mycélium, nombre d'apex et de nœuds (connexions entre les hyphes), ou encore surfaces délimitées par les hyphes. Ainsi, les profils de croissance de mycéliums résultant de conditions de croissance variées (contraintes nutritives, lumineuses ou de température) ont été précisément quantifiés. D'autre part, une analyse à l'échelle de l'hyphe (environ 5 μm) a permis de caractériser les vitesses de croissance des apex, la répartition des branchements le long de l'hyphe, et les interactions entre deux branches proches au sein du mycélium. Une distinction claire entre hyphes latérales et apicales a pu ainsi être établie.

De plus, en nous appuyant sur une simulation du réseau mycélien de *P. anserina* sous la forme d'un arbre binaire, et calibrée à partir des données expérimentales, nous montrons comment le mycélium optimise extension et densification. Tout d'abord, la distribution observée des angles de branchement apicaux correspond à la maximisation de l'extension radiale et orthoradiale du thalle, tout en minimisant les chevauchements. Dans un deuxième temps, nous montrons que les hyphes latérales maximisent l'exploitation du substrat par croissance radiale de la densité en retard de phase avec le front d'exploration.

Enfin, des structures intracellulaires ont été observées par une approche de microscopie en fluorescence. En particulier, la dynamique des noyaux, du Spitzenkörper, et la répartition des septa chez *P. anserina* ont été analysées.

Mots-clés : *Podospora anserina*, mycélium, hyphe, apex, anastomose, réseau fongique, réseau branchant, réseau en croissance, graphe, optimisation sous contraintes

Abstract

Multiscale characterization of the growth dynamics of a fungal network: study of the filamentous fungus *Podospora anserina*

The vegetative form of filamentous fungi is constituted by a branching network of growing hyphae, the mycelium. This dynamical structure allows for the optimal growth and reproduction of the organism. The mycelial network is particularly efficient for the exploration and exploitation of its environment.

In this study, the two-dimensional growth dynamics of the filamentous fungus *Podospora anserina* was characterized using a multiscale approach. From a bright field microscopy device developed in the laboratory, we obtain a collection of images of the mycelium, evenly distributed over the first 20 hours of growth from the germination of an ascospore. The images cover the entire surface of the mycelium (up to 1 cm), while keeping a resolution allowing us to distinguish individual hyphae (5 μm).

The analysis of the mycelial network as a whole was based on the extraction of dynamical quantities which are characteristic of the development and the complexity of the network: length of the mycelium, number of apexes and nodes (connections between hyphae), or surfaces delimited by hyphae. The growth profiles of mycelia resulting from various growth conditions (nutrient, light or temperature constraints) were precisely quantified. On the other hand, an analysis at the hypha scale (about 5 μm) enabled us to characterize the growth rates of the apexes, the distribution of branches along the hypha, and the interactions between two close branches within the mycelium. A clear distinction between lateral and apical hyphae could be established.

Furthermore, based on a simulation of the mycelial network of *P. anserina* in the form of a binary tree, and calibrated from experimental data, we showed how the mycelium optimizes extension and densification. First, the observed distribution of apical branching angles corresponds to the maximization of radial and orthoradial extension of the thallus, while minimizing overlaps. Second, we showed that lateral hyphae maximize substrate exploitation by radial density growth lagging behind the exploration front.

Finally, intracellular structures were observed by a fluorescence microscopy approach. In particular, the dynamics of the nuclei, the Spitzenkörper, and the distribution of septa in *P. anserina* were analyzed.

Keywords: *Podospora anserina*, mycelium, hypha, apex, anastomosis, fungal network, branching network, growing network, graph, constrained optimization

Remerciements

J'adresse un immense remerciement à mes directeurs de thèse, Florence et Éric, qui m'ont assuré des conditions de travail idéales et un encadrement des plus complémentaires. Je les remercie grandement pour leur disponibilité, leur efficacité et leur implication dans tous mes travaux. J'ai beaucoup appris à leurs côtés, et je suis fière d'avoir travaillé avec eux. Je prendrai soin d'emmener avec moi leur enthousiasme, l'ingéniosité d'Éric, et l'optimisme de Florence.

Je remercie également l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail : Fabienne Malagnac, Patrick Perré, Martine Bassilana, Marc Durand et Catherine Villard.

Je tiens à remercier grandement Gwenaël qui, avec Florence, m'a gentiment accueillie au sein de l'équipe. J'ai eu la chance de bénéficier de ses conseils avisés tout au long de ma thèse. J'ai eu l'opportunité d'effectuer mes premières heures d'enseignement aux côtés de Gwenaël et Florence, une expérience qui m'a beaucoup plu et a été très enrichissante. Les sorties champignons à Rambouillet ont été des moments riches de découvertes, dont je garderai de très bons souvenirs.

Je remercie particulièrement Frédéric, qui a toujours su m'aider efficacement et judicieusement pour mes expériences. J'ai eu la chance de pouvoir compter sur son investissement et sa grande serviabilité. Au-delà de son aide technique précieuse, il a été d'une grande bienveillance à mon égard, et a su me soutenir lorsque j'en ai eu besoin. Pour préparer mes expériences, j'ai eu la chance de pouvoir compter sur l'efficacité rare de Sylvie, avec qui j'ai partagé de nombreuses après-midis en salle blanche. Je remercie Éva, pour sa gentillesse, ses encouragements et l'attention précieuse qu'elle m'a portée. Un grand merci à Christophe L., qui a toujours su répondre à mes questions et m'aider dans cet océan mathématique et informatique qu'il maîtrise si bien. Ses boosters mandarines et chocolats ont été particulièrement appréciés ! Merci également à Roselyne, qui m'a aidée dès mon arrivée en stage au laboratoire, et avec qui j'ai toujours apprécié échanger. Enfin, je remercie Cécilia et Pascal (je retiendrai les erreurs conservatrices) qui m'ont beaucoup apporté dans ce travail interdisciplinaire et inter-équipes.

Je remercie chaleureusement les membres du laboratoire, qui ont contribué à cette atmosphère joyeuse et conviviale quotidienne : Valérie, Delphine, Hervé, Catherine J., Christophe G., Philippe, Mathieu A., Catherine V., François, Patrick, Aurélien et Sylvain.

Je souhaite remercier sincèrement mes compagnons du bureau 600, (T)hibault, Aymeric(k) et (P)aul, qui savent j'espère, tout ce que je leur dois. J'ai pu compter sur eux, et je sais la chance que j'ai eu de les avoir à mes côtés. La liste serait longue, mais du moins, merci pour les horoscopes inspirants, pour nos petits midis, pour m'avoir appris à boire du café, pour

les craquages du lundi, pour la pixel war, pour le bureau grignotage, pour les décorations au tableau et pour la si bonne humeur quotidienne !

Je voudrais également remercier Huijuan et Xiaoyue, toutes deux si gentilles et courageuses. Merci à Elsa et Lucia pour leur bienveillance et pour nos déjeuners ensemble. Je remercie Ling et Insaf, qui m'ont accueillie dans l'équipe à mon arrivée, et qui m'ont grandement aidée pour mes premières expériences. Enfin, un grand merci à Laura pour son travail minutieux qui m'a permis de débiter ma thèse sur des bases solides (et merci pour les petits champix !).

J'ai rencontré au cours de ma thèse des personnes d'une gentillesse rare, que je tiens à remercier pour tout ce qu'elles m'ont apporté. Je pense particulièrement à Émilie L., Morgane, Amine, Simine, Sebastian, Sarah, Lisa B. et Céline, avec qui j'ai passé de très bons moments. Je remercie Alexander, pour m'avoir montré la voie vers le doctorat, et pour m'avoir soutenue et encouragée. Merci à Sabrina, pour m'avoir donné un aperçu de mon futur sujet de thèse, et pour toutes nos discussions précieuses.

J'adresse un grand remerciement à mes amis Émilie M., Nicolas, Chiara, Mathieu P., Gaspard et Lisa C. pour leur soutien et leurs encouragements.

Mes derniers remerciements s'adressent à ma famille, qui m'a toujours si bien entourée. Je remercie ma sœur, Elisabeth, pour sa confiance et pour avoir su me faire prendre du recul. Merci à mon frère, Vincent, qui a été près de moi depuis mes débuts, et auprès de qui j'ai pu me plaindre abondamment. Merci à mon père, qui a je pense pu comprendre comment j'ai vécu ce travail de recherche (et merci pour les relectures & co bien utiles). Enfin, je remercie ma mère pour sa bienveillance et pour s'être toujours intéressée à mes travaux, bien que très étrangers pour elle.



Table des matières

Avant-propos	1
1 Introduction	3
1.1 Champignons et réseaux mycéliens	4
1.1.1 Le règne des <i>Fungi</i>	4
1.1.2 Les modes de vie des champignons filamenteux	7
1.1.3 Un mycélium organisé en un réseau filamenteux	13
1.2 Croissance des hyphes	20
1.2.1 Croissance polarisée	20
1.2.2 Pression de turgescence	22
1.2.3 Flux cytoplasmique	24
1.2.4 Cytosquelette	25
1.2.5 Paroi cellulaire des hyphes	31
1.2.6 « Cell end markers » et polarisome	33
1.2.7 Spitzenkörper	34
1.2.8 Exocytose	38
1.2.9 Endocytose	40
1.3 Méthodes d'observation du mycélium	41
1.3.1 Dispositifs d'acquisition d'images	42
1.3.2 Traitement des images et extraction de grandeurs caractéristiques du mycélium	45
1.3.3 Analyse du mycélium dans un contexte industriel	47
1.4 Modèle d'étude et travaux antérieurs menés au laboratoire	49
1.4.1 Le champignon modèle <i>Podospora anserina</i>	49
1.4.2 Dispositif d'observation du mycélium de <i>P. anserina</i> préexistant au laboratoire et premiers travaux	52
1.5 Objectifs du projet	58
2 Procédures expérimentales	61
2.1 Culture de <i>P. anserina</i> et préparation de l'échantillon pour observation	61
2.1.1 Culture de la souche sauvage de <i>P. anserina</i>	62
2.1.2 Préparation de l'ascospore pour l'acquisition des images	62
2.1.3 Culture et préparation des échantillons pour les souches mutantes de <i>P. anserina</i>	63
2.2 Acquisition des images du mycélium en champ clair	64
2.2.1 Observation à l'échelle microscopique	64

2.2.2	Observation à l'échelle macroscopique	66
2.2.3	Synthèse des conditions de culture	67
2.3	Traitement des images	68
2.3.1	Assemblage et binarisation	68
2.3.2	Vectorisation et extraction du graphe	68
2.3.3	Extraction des grandeurs caractéristiques de la croissance	69
2.4	Observation des hyphes en fluorescence	70
2.4.1	Fluorochromes et préparation de l'échantillon	70
2.4.2	Microscope en fluorescence	71
2.4.3	Traitement des images	72
3	Contraintes de croissance	73
3.1	Introduction	73
3.2	Procédure d'analyse des données expérimentales	74
3.3	Influence de l'environnement de croissance	75
3.3.1	Influence de l'éclairage	76
3.3.2	Influence de la source de carbone	78
3.3.3	Influence du nombre initial d'ascospores	78
3.4	Article	80
3.5	Discussion	99
4	Organisation et dynamique des hyphes	101
4.1	Introduction	101
4.1.1	Description qualitative du réseau mycélien	102
4.1.2	Mesures sur les images du mycélium	105
4.2	Vitesses de croissance	105
4.2.1	Procédure de relevé des coordonnées des apex	106
4.2.2	Branchement apical : apex exploratoire a_e	107
4.2.3	Branchement apical : apex d'exploitation a_o	108
4.2.4	Branchement latéral : apex a_{lat}	112
4.2.5	Synthèse	114
4.2.6	Discussion	116
4.3	Répartition des branchements le long de l'hyphe	118
4.3.1	Procédure de relevé des points	118
4.3.2	Branchements apicaux	120
4.3.3	Branchements latéraux	124
4.3.4	Répartition des nœuds apicaux et latéraux	127
4.3.5	Synthèse et discussion	129
4.4	Interactions entre les hyphes	134
4.4.1	Comportements d'un apex à proximité d'une hyphe	134
4.4.2	Point de contact entre les hyphes	135
4.4.3	Autotropisme négatif : dynamique d'évitement entre deux hyphes	140

4.4.4	Synthèse et discussion	144
4.5	Conclusion	147
5	Simulation et confrontation avec l'expérience	149
5.1	Introduction	149
5.2	Angles de branchement	151
5.2.1	Introduction	151
5.2.2	Distributions des angles de branchement	152
5.2.3	Sens de rotation des branchements	175
5.2.4	Orientation des branchements par rapport à la courbure de l'hyphe	176
5.2.5	Discussion	178
5.3	Densité des apex	180
5.3.1	Introduction	180
5.3.2	Article	182
6	Observation des hyphes en fluorescence	199
6.1	Introduction	199
6.1.1	Principe de la fluorescence	200
6.1.2	Dispositif expérimental en fluorescence	200
6.1.3	Incertitudes de mesure	201
6.2	Septa	201
6.2.1	Introduction	201
6.2.2	Marquage fluorescent des septa et procédure de mesure	204
6.2.3	Article apical	205
6.2.4	Distances entre les septa	205
6.2.5	Discussion	208
6.3	Noyaux	210
6.3.1	Introduction	210
6.3.2	Marquage fluorescent des noyaux et mesures	211
6.3.3	Zone d'exclusion des noyaux	211
6.3.4	Répartition des noyaux à un point de branchement	213
6.3.5	Discussion	214
6.4	Spitzenkörper	216
6.4.1	Marquage fluorescent du Spitzenkörper	216
6.4.2	Intensité de fluorescence et vitesse de croissance	216
6.4.3	Discussion	218
6.5	Conclusion	219
7	Conclusion	221
A	Analyse de la vitesse de croissance et de la densité du thalle global	227
A.1	Vitesse du thalle à l'échelle macroscopique	227
A.2	Vitesse globale du mycélium au cours des premières heures de croissance	228

Table des matières

A.3 Répartition locale des apex	230
A.3.1 Définition d'un maillage	230
A.3.2 Densité d'apex au sein d'une cellule	231
A.3.3 Étude du maillage complet	232
A.4 Conclusion	233
B Réseaux mycéliens issus de différentes conditions de culture	235
C Ajustements exponentiels des grandeurs A, N, L dans différentes conditions de croissance	237
D Angles de branchement pour différentes conditions de culture	239
Bibliographie	241
Liste des éléments sous droits	258

Avant-propos

Si les champignons sont appréciés pour leurs qualités gustatives, ou au contraire craints pour leur toxicité, ils restent cependant moins connus pour leur rôle prépondérant au sein des écosystèmes terrestres. Le champignon charnu à la surface du sol ne constitue que la partie émergée de l'iceberg : l'organisme s'étend sous terre sous la forme d'un réseau de filaments, le mycélium, et participe activement au maintien de l'équilibre fragile des écosystèmes. Par ailleurs, les champignons sont de plus en plus considérés pour leur potentiel dans de nombreux secteurs innovants, tels que la production de matériaux alternatifs, de biocarburants, ou encore dans la dépollution des sols. Pourtant, un long chemin reste à parcourir dans la compréhension des mécanismes complexes régissant la croissance du mycélium, et de nombreuses questions restent ouvertes.

La plupart des connaissances relatives à la structure du mycélium provient de décennies d'études des cellules fongiques à l'aide de diverses méthodes d'observation, dont notamment la microscopie optique et la microscopie électronique en transmission. La qualité des observations s'est profondément améliorée grâce au développement de l'informatique et de caméras en haute résolution. De plus, l'émergence de la microscopie en fluorescence a constitué un progrès majeur, en ouvrant l'accès à l'observation de structures intracellulaires spécifiques.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette optique de compréhension de la structure et de la dynamique du mycélium. Avant mon arrivée au laboratoire, un dispositif d'observation en champ clair a été mis en place, permettant d'étudier le mycélium du champignon *Podospora anserina*. Cette approche a été approfondie, et une étude complémentaire en microscopie de fluorescence a par ailleurs été développée.

Chapitre 1

Introduction

1.1	Champignons et réseaux mycéliens	4
1.1.1	Le règne des <i>Fungi</i>	4
1.1.2	Les modes de vie des champignons filamenteux	7
1.1.3	Un mycélium organisé en un réseau filamenteux	13
1.2	Croissance des hyphes	20
1.2.1	Croissance polarisée	20
1.2.2	Pression de turgescence	22
1.2.3	Flux cytoplasmique	24
1.2.4	Cytosquelette	25
1.2.5	Paroi cellulaire des hyphes	31
1.2.6	« Cell end markers » et polarisome	33
1.2.7	Spitzenkörper	34
1.2.8	Exocytose	38
1.2.9	Endocytose	40
1.3	Méthodes d'observation du mycélium	41
1.3.1	Dispositifs d'acquisition d'images	42
1.3.2	Traitement des images et extraction de grandeurs caractéristiques du mycélium	45
1.3.3	Analyse du mycélium dans un contexte industriel	47
1.4	Modèle d'étude et travaux antérieurs menés au laboratoire	49
1.4.1	Le champignon modèle <i>Podospora anserina</i>	49
1.4.2	Dispositif d'observation du mycélium de <i>P. anserina</i> préexistant au laboratoire et premiers travaux	52
1.5	Objectifs du projet	58

1.1 Champignons et réseaux mycéliens

1.1.1 Le règne des *Fungi*

Les champignons sont des organismes discrets, généralement enfouis dans le sol ou à l'intérieur de tissus hôtes de végétaux ou animaux. Certains d'entre eux laissent périodiquement émerger de belles structures à la surface du sol, que l'on remarque facilement en forêt, notamment en automne. Si elles sont communément appelées « champignons », ces structures à chapeaux ne représentent en réalité qu'une partie de l'organisme : le sporophore, issu de la reproduction sexuée du champignon, et produisant les spores. Sous ce corps aérien, le champignon s'étend dans le sol sous la forme d'un réseau de fins filaments appelés hyphes. L'ensemble de celles-ci constitue le mycélium, ou thalle végétatif (figure 1.1). Le déploiement de structures à chapeaux n'est cependant réservé qu'à certaines espèces [1] [2] [3].

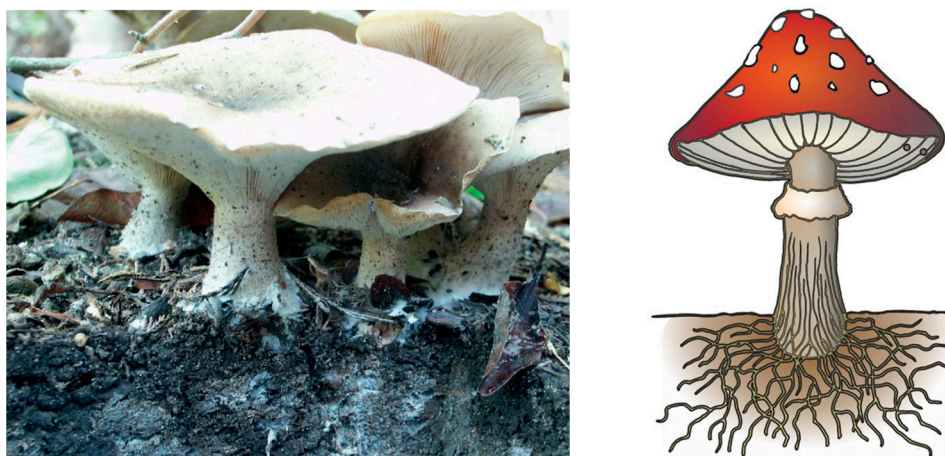


FIG. 1.1 – À gauche, le champignon *Clitocybe nebularis* déploie un sporophore aérien, en dessous duquel s'étend le mycélium enfoui dans le sol, mais visible par sa couleur blanche [4]. À droite, représentation d'un champignon à chapeau, constitué d'hyphes qui se prolongent sous terre (adapté de [3]).

Les *Fungi* parmi les règnes du vivant

À partir de 1969, la classification du vivant impulsée par R. H. Whittaker définit un règne propre aux champignons, les *Fungi*, au même titre que les *Plantae*, les *Animalia*, les *Protista* et les *Monera* [5]. Auparavant, les champignons étaient considérés comme une branche de la botanique.

Une différence fondamentale entre les animaux, les plantes et les champignons repose sur leur mode de nutrition. Les animaux phagocytent leurs proies, les plantes sont autotrophes et produisent de la matière organique par photosynthèse, et les champignons fonctionnent par osmotrophie, c'est-à-dire qu'ils digèrent les ressources à l'extérieur de l'organisme, et les absorbent ensuite (voir section 1.1.2, p. 7) [2].

Moins connus que les plantes ou les animaux, les champignons regroupent pourtant près de 30 000 espèces en France [2]. Ils représentent la deuxième plus grande fraction de la biomasse terrestre après les végétaux [6].

Les mycologues estiment qu'environ 1,5 million d'espèces fongiques existent, avec seulement 120 000 espèces décrites (soit 8%). En effet, au-delà de la difficulté à identifier une telle abondance d'espèces, de nombreux champignons sont difficilement isolables et cultivables en laboratoire. Leur rôle fonctionnel est par ailleurs délicat à définir dans la mesure où ils sont souvent étroitement liés à d'autres organismes, notamment des plantes (voir section 1.1.2, p. 7) [7] [1]. La convergence évolutive accroît par ailleurs les incertitudes : certaines caractéristiques peuvent être communes à plusieurs espèces suite au processus de sélection naturelle, bien qu'elles soient apparues indépendamment au sein de chacune. Par exemple, l'élaboration des sporophores a vu de nombreuses évolutions convergentes, si bien que l'ancienne classification des champignons, s'appuyant majoritairement sur les caractéristiques du sporophore, a été bouleversée par l'arrivée de la technologie de séquençage de génomes [2]. En outre, plus d'un millier d'espèces supplémentaires est décrit chaque année, et la phylogénie reste ainsi en constante évolution [4].

Les eumycètes

L'adoption de l'osmotrophie est intervenue au moins deux fois au cours de l'évolution, et a donné naissance à deux grandes lignées : les eumycètes (*Eumycota*, « vrais champignons »), et les pseudomycètes (« pseudo-champignons »). Les oomycètes appartiennent par exemple à cette dernière catégorie, et présentent des morphologies, des modes de nutrition et des rôles écologiques similaires aux eumycètes. En revanche, contrairement à ces derniers, leurs hyphes sont toujours non cloisonnées (voir section 1.1.3, p. 13), et leur paroi cellulaire est majoritairement composée de cellulose, alors que celle des *Eumycota* est constituée principalement de chitine (voir section 1.2.5, p. 31) [8] [9].

Au sein des vrais champignons, on trouve le groupe des *Dikarya*, ou « champignons supérieurs », et un certain nombre d'autres embranchements associés aux « champignons inférieurs » (figure 1.2) [2]. Contrairement à la deuxième catégorie, les champignons supérieurs ont des hyphes compartimentées par des cloisons percées d'un pore central, et des événements de fusion (anastomoses) peuvent survenir entre les hyphes (voir section 1.1.3, p. 13) [8].

Parmi les *Dikarya*, il se distingue deux morphologies principales : les formes unicellulaires (levures) et les formes filamenteuses. Les levures sont des organismes unicellulaires qui présentent une morphologie circulaire ou en bâtonnet (figure 1.3). Elles sont connues depuis des millénaires pour leur utilisation dans la fabrication du pain, de la bière ou du vin, et ont été, dans ce contexte, particulièrement étudiées [3]. Les espèces filamenteuses, ou moisissures, différencient quant à elles un mycélium constitué d'hyphes interconnectées (figure 1.4). Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéressons à la morphologie filamenteuse.

Les *Dikarya* regroupent les ascomycètes (*Ascomycota*) et les basidiomycètes (*Basidiomycota*), dont la morphologie peut-être soit unicellulaire, soit filamenteuse. Les ascomycètes et les basidiomycètes se distinguent principalement par des différences au niveau de la production des

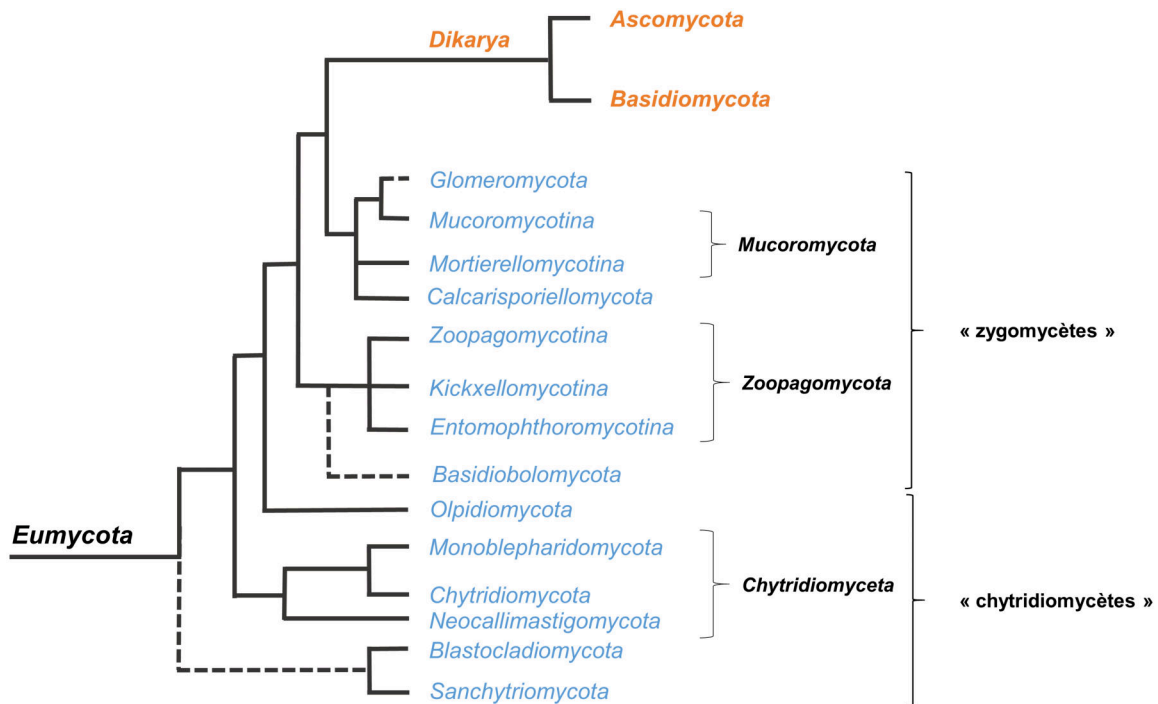


FIG. 1.2 – Arbre phylogénétique des eumycètes. Les champignons supérieurs sont indiqués en orange, et les champignons inférieurs en bleu (adapté de [2]).

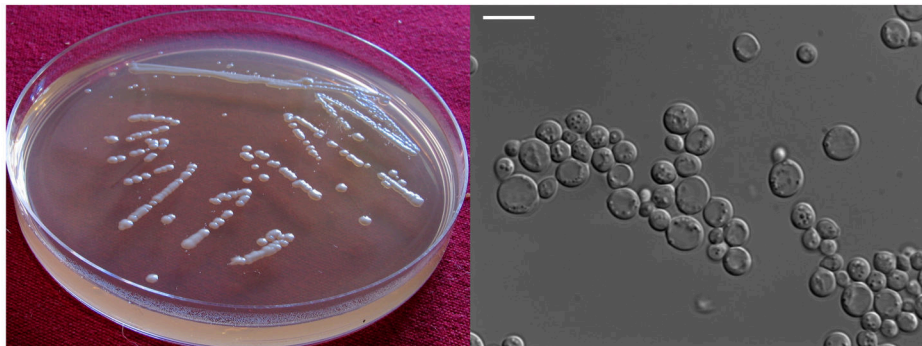


FIG. 1.3 – La levure *S. cerevisiae*, célèbre pour son utilisation dans la fabrication du pain et de la bière, cultivée sur boîte de Petri à gauche, et observée au microscope à droite (barre d'échelle : 10 µm) [2].

spores sexuées (voir section 1.1.2, p.7). Ces organismes présentent la particularité de pouvoir maintenir des cellules à deux noyaux (« karyon » signifie « noyau » en grec) [4].

Les ascomycètes représentent le plus grand groupe de champignons, et regroupent plus de 60% des espèces répertoriées [2] [12]. Certains genres bien connus comme *Fusarium*, *Magnaporthe*, *Candida*, *Penicillium* (figure 1.5), *Aspergillus*, ou encore la célèbre Levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*, l'organisme le mieux caractérisé parmi les cellules eucaryotes, sont des ascomycètes [4].

Les basidiomycètes sont un autre groupe de champignons très diversifié, incluant la quasi-totalité des espèces exploitées à des fins commerciales, tels que *Agaricus bisporus*, le célèbre Champignon de Paris, ou encore les Amanites (figure 1.5), les Bolets et les Pleurotes [4] [1].

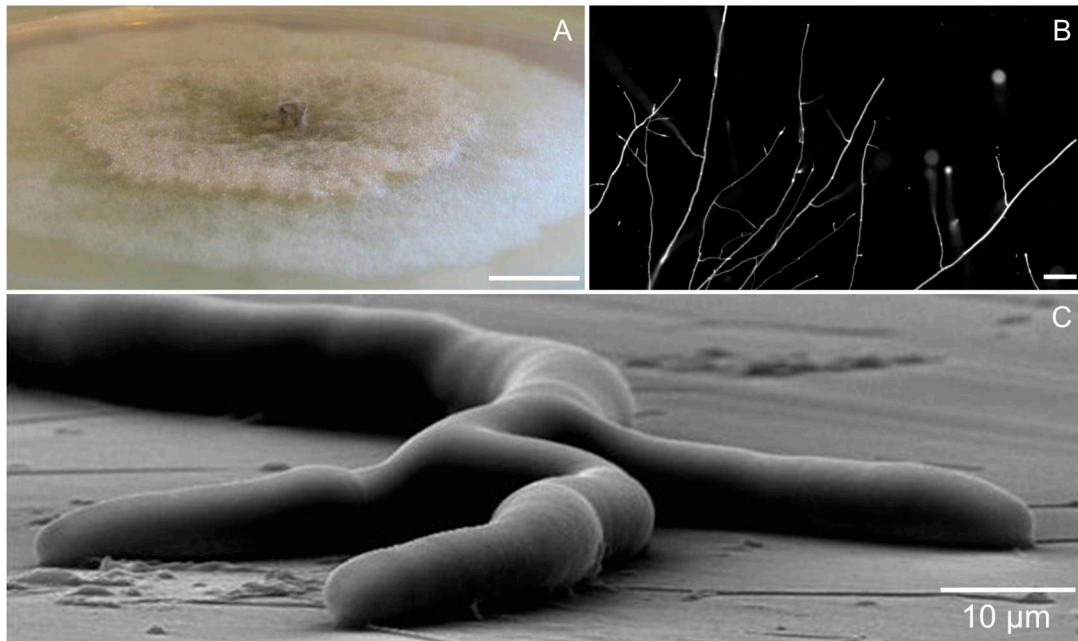


FIG. 1.4 – (A) Le mycélium de *P. anserina* observé sur une boîte de Petri (barre d'échelle : 1 cm) [10]. Le thalle est composé d'un ensemble d'hyphes, détectables au microscope comme présenté sur la figure (B) : Hyphes de *P. anserina* marquées au Calcofluor-white observées en fluorescence (barre d'échelle : 100 μ m). (C) Une hyphe d'*Aspergillus niger* observée en microscopie électronique à balayage (adapté de [11]).



FIG. 1.5 – À gauche, le champignon ascomycète *Penicillium chrysogenum*, qui synthétise notamment la pénicilline [2]. À droite, la célèbre Amanite tue-mouches, une espèce basidiomycète qui développe un sporophore facilement identifiable (crédit photo : Philippe Silar).

1.1.2 Les modes de vie des champignons filamenteux

Le cycle de vie

Les champignons filamenteux peuvent avoir recours à la reproduction sexuée ou asexuée, et les deux stratégies sont employées chez certaines espèces. Les sporophores sont des structures mises en place pour la reproduction sexuée, et les conidiophes sont les structures qui produisent les conidies, ou spores asexuées. Chez les espèces du genre *Aspergillus* ou *Penicillium* par exemple, les conidies sont produites en très grand nombre au niveau de la tête aspergillaire des

conidiophores (figure 1.6), dont la morphologie est caractéristique d'un genre, voire même d'une espèce [13]. Les sporophores peuvent être de tailles très variées (de quelques millimètres à plusieurs centimètres). Chez les espèces à chapeaux, les sporophores sont massifs et visibles à l'œil nu. C'est la partie aérienne qui est ramassée et consommée par les amateurs de champignons. Nous verrons dans la section 1.4.1, p.49 que chez notre champignon d'étude *P. anserina*, le sporophore est microscopique. Le développement sexué peut être initié au sein d'un seul individu autofertile, ou homothallique, ou bien par accouplement entre deux thalles distincts. Dans ce dernier cas, chaque thalle est autostérile, et le champignon est dit hétérothallique [2] [12] [7]. Par la suite nous nous intéresserons aux spores issues de la reproduction sexuée dans la mesure où notre modèle d'étude *P. anserina* produit des spores sexuées uniquement.

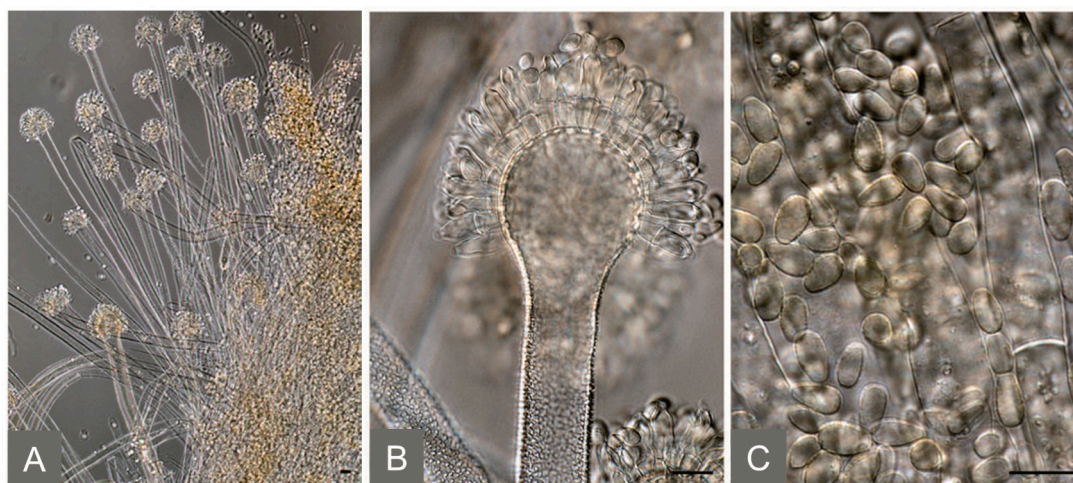


FIG. 1.6 – Conidiophores (A et B) et conidies (C) d'*Aspergillus togoensis* (barres d'échelle : 10 μ m) [14].

Les champignons supérieurs ont élaboré des stratégies de reproduction et de dispersion très variées et ingénieuses. La spore formée dans le sporophore constitue l'unité à partir de laquelle est initiée le début du cycle de vie d'un champignon filamenteux. Suite à sa germination, la spore donne naissance à un mycélium qui s'étend de manière radiale autour d'elle, et pouvant par la suite différencier les sporophores produisant les spores [2] [15]. Le développement de ces structures en surface requiert le déploiement d'hyphes aériennes, puisque le mycélium est généralement enfoui dans le substrat. Les anastomoses (voir section 1.1.3, p.13) ainsi que la circulation active au sein du réseau d'hyphes permettent la translocation massive d'eau et de nutriments pour assurer la croissance des sporophores au-dessus du mycélium. Enfin, la dispersion des spores vers des régions distantes permet au champignon de se répandre et d'atteindre de nouvelles ressources [16] (figure 1.7).

Les spores matures sont libérées du sporophore [2], puis sont généralement transportées par le vent, jusqu'à ce qu'elles se déposent sur le sol, des feuilles ou un animal. La germination est déclenchée par des stimulus extérieurs spécifiques à chaque espèce. En conditions favorables, la spore germe et donne naissance aux premiers tubes germinatifs à l'origine du futur mycélium. Si les conditions ne sont pas appropriées à la croissance, comme une température trop faible

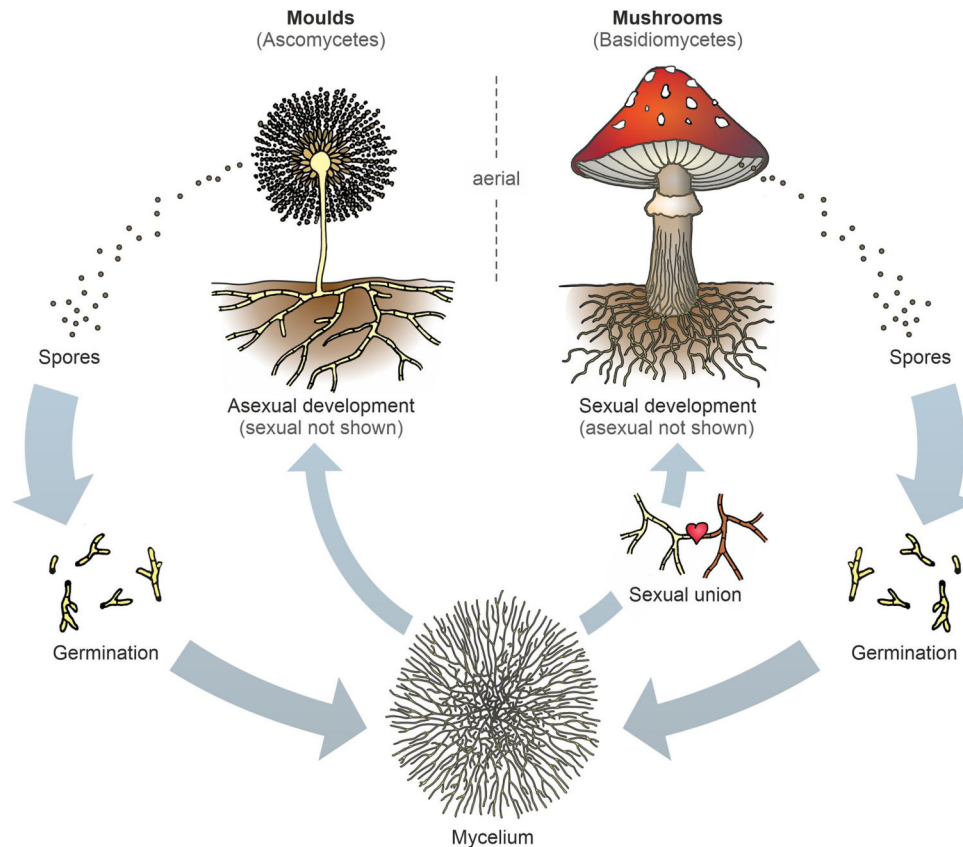


FIG. 1.7 – Cycle de vie simplifié des champignons ascomycètes et basidiomycètes. La reproduction asexuée est représentée à gauche, et la reproduction sexuée à droite. Suite à la germination, la spore développe un mycélium, qui donnera naissance, après la reproduction, à de nouvelles spores [3].

par exemple, la germination est repoussée et la spore entre dans un état de dormance qui peut durer de plusieurs heures à plusieurs années [2] [16] [1].

La majorité des champignons présente par ailleurs la formidable capacité de se régénérer à partir d'une partie de l'organisme : un fragment de mycélium, ou un morceau de sporophore peuvent suffire à disperser l'espèce [2].

Les modes de nutrition

Les champignons ont adopté l'osmotrophie comme stratégie alimentaire et sont ainsi capables de récupérer les nutriments indispensables à leur croissance par diffusion transmembranaire [2] [17]. On distingue trois modes de nutrition principaux : les saprotrophes, qui utilisent de la matière organique morte comme substrat, les nécrotrophes, qui envahissent des tissus vivants qu'ils tuent, et les biotrophes, qui exploitent des cellules hôtes maintenues en vie [4].

Les polysaccharides de la biomasse végétale présente dans l'environnement naturel du champignon sont des structures complexes, et doivent être dégradés avant assimilation. Pour cela, les hyphes pénètrent le substrat, tout en sécrétant des enzymes lytiques, qui ont pour rôle d'hydrolyser les liaisons glycosidiques des polymères végétaux, ainsi que des protéines et des lipides. Les produits de la décomposition sont par exemple des monosaccharides comme le

glucose, ou des acides aminés, qui peuvent alors être assimilés par les hyphes grâce à des transporteurs spécifiques enchâssés dans la membrane plasmique [2] [18] [3].

La colonisation d'un nouvel environnement, éventuellement convoité par d'autres organismes, dépend en grande partie de la capacité du champignon à utiliser les ressources présentes [16]. Les champignons filamenteux sont extrêmement performants dans l'hydrolyse des polysaccharides des végétaux, avec un nombre de gènes impliqués dans la dégradation évalué entre 100 et 250, contre 30 chez la levure *S.cerevisiae* [3].

Une enzyme est spécifique d'un polysaccharide particulier, qu'elle dégrade soit par attaque d'une extrémité (exoenzyme), soit en le découpant en plusieurs oligomères (endoenzyme). Elles peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire autour de l'hyphe, ou bien rester accrochées à la paroi, permettant ainsi une dégradation localisée au plus près de l'hyphe [4]. La sécrétion se produit au niveau de l'apex et également au niveau des cloisons de l'hyphe (voir section 1.1.3, p.13) [19] [20].

Les champignons au sein des écosystèmes

Habitats variés

La proportion d'espèces de champignons isolées dans les habitats marins est anecdotique ; l'écrasante majorité de ces organismes est associée avec le sol. Ils se développent en effet en profondeur dans le sol et à sa surface, et sur des plantes ou des animaux, eux-mêmes évoluant sur les terres [4].

Le mycélium en croissance appauvrit en permanence son milieu en ressources, et est alors contraint d'explorer continuellement de nouvelles régions [16]. Les hyphes constituant le mycélium (voir section 1.1.3, p.13) permettent à celles-ci d'acquérir une forme de mobilité, et sont redoutablement efficaces pour la colonisation de substrats variés, allant des tissus vivants à des matériaux abiotiques comme la roche [21] [15] [22]. Les champignons sont ainsi parvenus à coloniser la majorité des écosystèmes terrestres. Les réseaux mycéliens peuvent s'étendre sur des surfaces allant de l'échelle microscopique à plusieurs kilomètres carrés [23] [24]. Aux États-Unis, le mycélium du champignon *Armillaria ostoyae* a couvert une surface gigantesque (9 km²) et est probablement âgé d'environ 2 400 ans [2].

Rôles des champignons dans les écosystèmes

Les champignons jouent des rôles clés de liaison entre les différents constituants des écosystèmes. Ils peuvent agir en tant que mutualistes, commensalistes et parasites des plantes, des animaux et des microorganismes [25] [7] [23].

Les champignons saprotrophes sont les agents de décomposition principaux de la matière organique, et jouent un rôle central dans le cycle du carbone et des éléments nutritifs (hydrogène, phosphore, oxygène, azote...). Ils décomposent la litière végétale et les cadavres d'animaux, participant ainsi activement aux transformations organiques et inorganiques des éléments (figure 1.8) [7] [26]. De plus, les champignons sont impliqués dans l'érosion, la stabilisation et l'aération des sols, et la rétention et la translocation de l'eau [4].

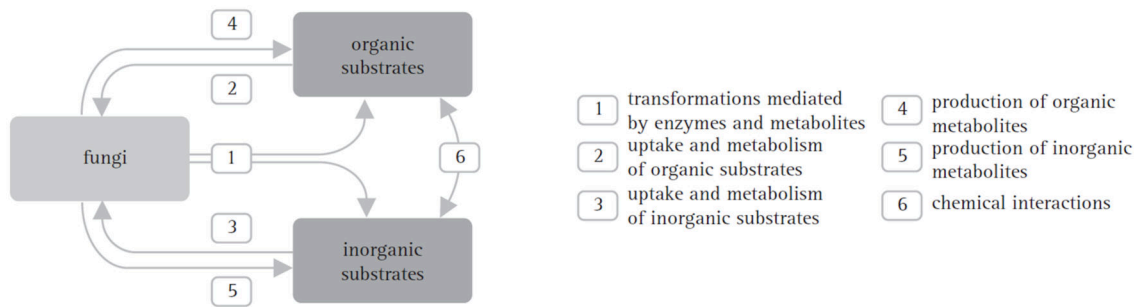


FIG. 1.8 – Représentation schématisée de l'action des champignons sur les substrats organiques et inorganiques [4].

Grâce à leur système de sécrétion d'enzymes, les champignons saprotrophes sont capables de dégrader les polymères végétaux les plus récalcitrants. La lignocellulose, composée d'un mélange de lignine, d'hémicellulose et de cellulose, est la forme majoritaire de la biomasse végétale. Les champignons, mais aussi les bactéries, hydrolysent la cellulose. La décomposition des polymères de lignine est quant à elle extrêmement difficile, et les champignons, en particulier les basidiomycètes, sont parmi les seuls organismes capables de les dégrader efficacement en dioxyde de carbone et en eau (figure 1.9) [2] [6] [4]. Sans l'activité essentielle des champignons, la litière s'accumulerait, et le CO₂ indispensable à la survie des plantes viendrait à manquer [18].



FIG. 1.9 – Tronc de hêtre sectionné, laissant paraître des zones plus foncées (flèches) où la dégradation de la lignine notamment a été initiée [16].

Association symbiotique entre plantes et champignons : les mycorhizes

Si les champignons sont essentiels à la décomposition de la biomasse végétale morte, ils contribuent également à la croissance de nombreux végétaux grâce à une association mycorhizienne. Les mycorhizes sont des interactions symbiotiques entre des hyphes et les racines d'une plante. Celle-ci reçoit alors des nutriments via le mycélium, en particulier du

phosphore, et le champignon bénéficie des sucres issus de la photosynthèse. Cette association étroite entre les deux règnes a probablement permis aux végétaux de coloniser davantage de régions à la surface de la Terre, notamment grâce à l'apport de nutriments supplémentaires par le mycélium sur des sols pauvres [7] [4].

On associe généralement certaines espèces de champignons comestibles avec des espèces d'arbres spécifiques. Par exemple, le Cèpe de Bordeaux (*Boletus edulis*) se développe préférentiellement au pied des chênes ou des hêtres (famille des *Fagaceae*) [27], alors que la Girolle (*Cantharellus cibarius*) se trouve souvent au pied des pins (espèces appartenant au genre *Pinus*) [28]. Ces associations spatiales entre champignons et végétaux reflètent l'existence de mycorhizes créées entre le champignon et une espèce végétale spécifique.

Stress environnementaux et métabolites secondaires

Les habitats naturels des champignons sont des environnements dynamiques présentant des propriétés très hétérogènes dans le temps et l'espace. Par exemple, le sol est un système vivant complexe, puisqu'il abrite des bactéries, des champignons, des protozoaires, mais aussi des animaux multicellulaires, comme des vers et des petits mammifères. Les champignons sont ainsi confrontés en permanence à des stress biotiques et abiotiques, tels que des modifications de température, de porosité du sol, ou la compétition face à d'autres organismes. Les champignons étant immobiles, ils doivent faire face aux contraintes pour s'y adapter, survivre et persister dans le milieu [4] [16].

Dans de telles conditions, ces organismes sont capables de produire un large éventail de composés appelés métabolites secondaires. Ceux-ci ne sont pas directement impliqués dans les processus physiologiques fondamentaux de l'organisme, mais jouent un rôle dans la communication intercellulaire et les réponses offensives et défensives notamment. Certains métabolites secondaires sécrétés dans un contexte de compétition entre espèces sont d'une grande efficacité, et sont commercialisés en tant qu'antifongiques pour lutter contre des maladies fongiques chez les plantes, les animaux et les humains [7] [16] [4].

Menaces associées aux champignons

Si les champignons jouent des rôles essentiels au sein des écosystèmes, ils constituent également une menace pour la vie des plantes, des animaux et des humains. Chaque année, les infections fongiques sont responsables de la mort de 1,5 à 2 millions de personnes [3], et représentent 20% (environ 300 espèces) des pathogènes humains connus [29]. En intérieur, ils sont omniprésents sous la forme de spores, notamment dans les tapis, les rideaux et les couvertures, et peuvent causer des problèmes pulmonaires [4]. Ce sont les principaux organismes pathogènes des plantes, et ils sont responsables de la majorité des pertes en agriculture [4]. On retrouve par ailleurs des mycotoxines dangereuses pour les humains sur de nombreux produits de culture comme le blé, le maïs ou le café [3]. Enfin, les champignons peuvent également causer des dégâts matériels en dégradant des bâtiments en profondeur [4].

1.1.3 Un mycélium organisé en un réseau filamenteux

Les caractéristiques du mycélium

Dans cette partie, nous introduirons les termes spécifiques relatifs à la composition et à l'organisation du mycélium.

Hyphes

Le mycélium est constitué d'un ensemble d'hyphes interconnectées. Il s'agit de longs cylindres de 2 à 20 μm de diamètre qui s'étendent au niveau de leur extrémité, appelée apex [15]. Le « statut d'apex » est un état transitoire, dans la mesure où toute extrémité finit par se ramifier, et donne naissance à de nouveaux apex [30]. L'ensemble des hyphes forme alors un réseau vivant dynamique et complexe (figure 1.10), et dont l'évolution est déterminée par le comportement individuel de chaque hyphe ainsi que par l'arrangement de ces filaments entre eux [31] [18]. Le phénomène d'autotropisme entre les hyphes intervient notamment dans l'organisation globale du mycélium. L'autotropisme dit « négatif » décrit l'influence répulsive des hyphes entre elles, alors que l'autotropisme « positif », par lequel les hyphes s'attirent, peut aboutir à un phénomène de fusion, ou anastomose, en particulier chez les ascomycètes et les basidiomycètes [4] [32].

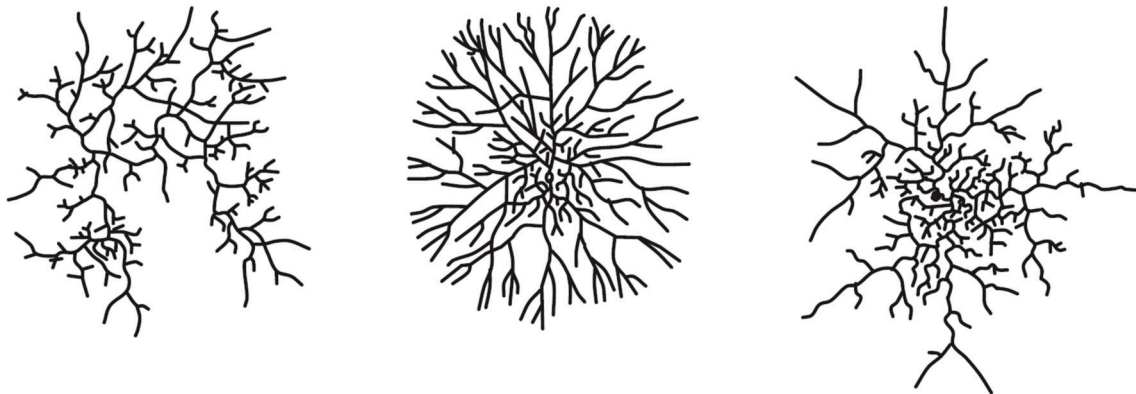


FIG. 1.10 – Trois exemples de jeunes réseaux mycéliens, dont l'organisation diffère d'un genre à l'autre. Les schémas sont réalisés à partir d'images des genres *Boletus* (à gauche), *Tricholoma* (au milieu), et *Amanita* (à droite) (adapté de [4]).

Septa

Les hyphes présentent par ailleurs la particularité de ne pas réellement se diviser lors de l'extension, comme c'est le cas chez les levures par exemple (figure 1.11). Chez les *Dikarya* en particulier, l'hyphe construit des cloisons relativement régulièrement espacées appelées septa. Les compartiments ou articles ainsi délimités s'apparentent à des cellules classiques, mais qui restent connectés entre eux grâce à la présence de pores au sein des septa (figure 1.11) [2] (voir section 6.2, p. 201). La continuité cytoplasmique ainsi mise en place permet notamment la translocation des nutriments entre les différentes régions du mycélium [30] [32].

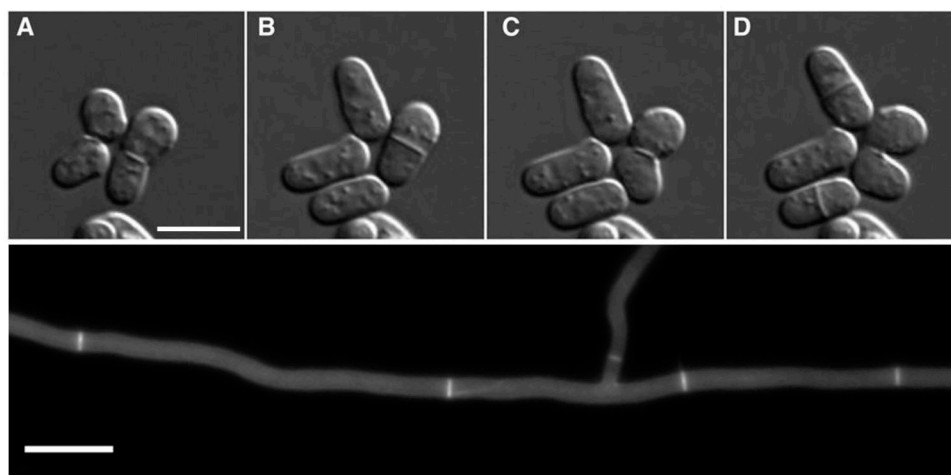


FIG. 1.11 – En haut (A à D), la « levure à fission » *Schizosaccharomyces pombe*, dont la division par fission médiane d'une cellule mère donne naissance à deux cellules filles de taille identique (barre d'échelle : 10 μm) [33]. En bas, une hyphe de l'espèce filamenteuse *P. anserina* compartimentée par les septa, marqués ici en fluorescence au Calcofluor-white (barre d'échelle : 20 μm).

Rhizomorphes

Si les hyphes sont des structures individuellement simples, il n'en reste pas moins qu'elles sont capables de se différencier en une variété de formes multicellulaires complexes, telles que les appressoria (système d'infection des champignons phytopathogènes), les sporophores (voir section 1.1.2, p.7) ou les rhizomorphes [29] [34]. Ces cordons mycéliens, développés par certains ascomycètes et basidiomycètes, sont formés par l'agrégation d'hyphes en un organe linéaire avec une extrémité arrondie, et un diamètre pouvant aller jusqu'à 7 mm (figure 1.12) [35] [15] [36]. La biomasse mycélienne peut être relocalisée au cours de sa croissance, et favoriser alors l'épaississement de certains cordons favorablement dirigés par rapport à la source de nutriments [24] [16].

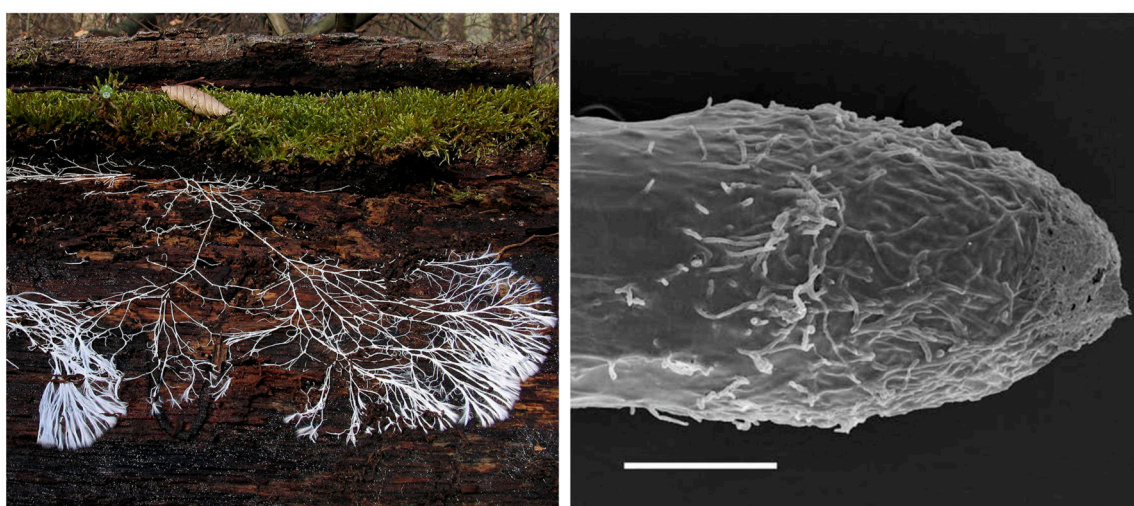


FIG. 1.12 – À gauche, des rhizomorphes d'un basidiomycète lignivore clairement visibles sur du bois [2]. À droite, l'extrémité d'un rhizomorphe de *Armillaria gallica* observée en microscopie électronique à balayage (barre d'échelle : 100 μm) [35].

Croissance localisée à l'apex

Géométrie tubulaire

L'extension par l'extrémité est le mode de croissance adopté par les champignons filamenteux, mais aussi par les tubes de pollen et les poils racinaires chez les végétaux, ou les neurones, les vaisseaux sanguins et les canaux des poumons et des reins chez les animaux [4] [15]. La morphologie associée à ce type de croissance consiste en de longs tubes ou cylindres de symétrie radiale, qui maintiennent cette forme au cours du temps [37] [38] [39]. Dans le cas des hyphes, l'extension est une déformation plastique accompagnée de l'insertion de matière à l'apex, puisque la paroi est déformée de manière irréversible [40] (voir section 1.2, p. 20).

Ce type de croissance confère un certain degré de mobilité aux organismes, qui sont capables d'explorer de nouveaux territoires par extension apicale [18]. La forme du filament est caractéristique des cellules invasives, et se révèle particulièrement efficace pour pénétrer et coloniser des substrats variés et hétérogènes [2] [15].

L'efficacité d'invasion des filaments se reflète par ailleurs dans le comportement de certains champignons pathogènes, comme *Candida albicans* par exemple. Ceux-ci, en fonction des conditions extérieures, sont capables d'adopter la morphologie circulaire ou sphérique des levures, ou bien une forme filamenteuse. La morphologie des levures est favorable à l'invasion de l'hôte à travers la circulation de fluides (système sanguin par exemple), alors que la forme mycélienne est efficace pour pénétrer des tissus solides et s'établir durablement dans l'organisme cible [4] [7].

La géométrie tubulaire pourrait être considérée comme un éventuel optimum géométrique dans la mesure où le ratio entre la surface et le volume est préservé lors de l'extension de la paroi, permettant ainsi au champignon de conserver la même activité métabolique au cours de sa croissance [37]. Une seule dimension est significativement modifiée au cours du temps, puisque le cylindre s'étend en conservant environ la même section transversale. De plus, l'aire de la paroi cellulaire influence sa capacité à communiquer avec l'extérieur et impacte les capacités respiratoires et l'absorption des nutriments. Par rapport à une sphère de même volume, la forme du cylindre permet d'augmenter significativement l'aire de la paroi [38] [15]. Enfin, la localisation de toute la machinerie de croissance à l'extrémité pourrait favoriser l'extension rapide de l'hyphe, en comparaison d'une répartition distribuée sur toute la longueur du tube [38].

Forme de l'extrémité de l'hyphe

La forme allongée de l'extrémité de l'hyphe peut être efficacement décrite par un demi-ellipsoïde [41].

Campàs *et al.* [37] ont montré que les hyphes et les tubes de pollen ont adopté une stratégie de croissance similaire, alors que les oomycètes possèdent un mécanisme différent. Dans le cas des hyphes de *Neurospora crassa* et des tubes de pollen de *Lilium longiflorum* (Lys), si le rayon de l'hyphe R augmente, le rayon de courbure de l'apex R_a varie proportionnellement. La morphologie du filament est alors invariante quelle que soit la valeur de son rayon. Par contre,

pour les oomycètes, R_a reste constant malgré les variations de R , ce qui induit des tubes de forme plus pointue (figure 1.13).

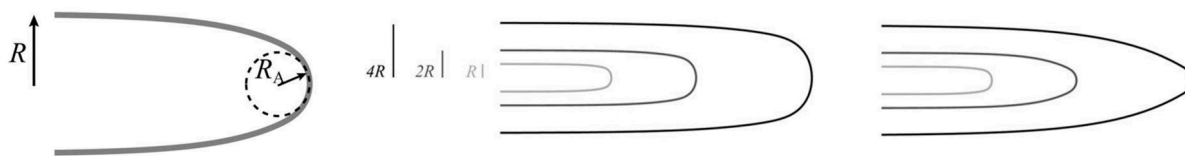


FIG. 1.13 – R est le rayon de l’hyphe, R_a est le rayon de courbure de l’apex. Chez *N. crassa*, R_a est proportionnel à R , mais chez les oomycètes, R_a est constant [37].

Les réseaux biologiques

Si l’organisation en réseau et la croissance par l’extrémité sont les marques de fabrique du règne fongique [42] [43], ces stratégies sont également répandues parmi d’autres domaines du vivant, bien que certaines spécificités diffèrent d’une espèce à l’autre [44] [4].

Quelques exemples de réseaux vivants

Chez les végétaux, la structure en réseau renvoie par exemple aux racines ou encore aux nervures des feuilles. Une analyse d’un réseau de nervures des feuilles de *Ficus religiosa* a révélé que les angles de branchement dépendent de l’épaisseur du canal constituant la nervure principale (figure 1.14) [45]. De plus, Salima *et al.* [46] ont développé un outil permettant d’extraire automatiquement le motif de nervation de différentes feuilles. Ce dernier est spécifique de certaines espèces végétales, et offre ainsi des critères de classification faciles à déterminer.

Gorgonia ventalina est un type de corail qui possède un squelette formant un réseau dynamique. Certains axes de la structure peuvent se renforcer au cours du temps, mais contrairement aux nervures des feuilles, cette réorganisation du squelette n’est pas liée à l’âge de la branche en question, et le motif ainsi produit confère au réseau un aspect peu hiérarchique (figure 1.14). L’explication réside dans le fait que le point central n’est pas le pied du corail : certains apex de la bordure sont dominants, et les branches qui leur sont associées se renforcent au cours de la croissance [45].

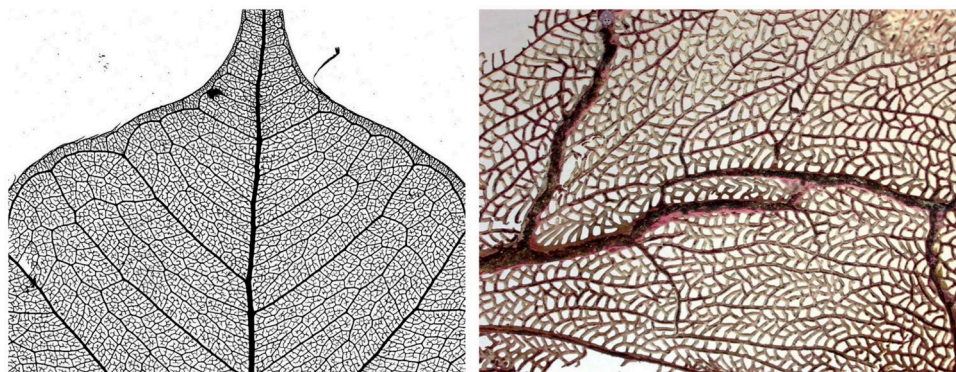


FIG. 1.14 – À gauche, feuille de *F. religiosa*. À droite, détail de la structure de *G. ventalina* [45].

Un autre exemple de réseau particulier est celui formé par le système gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita* (figure 1.15). Song *et al.* [47] ont révélé que deux croissances de ces réseaux à partir de clones ne produisaient jamais rigoureusement le même motif. Les instabilités intervenant au cours de la croissance de la méduse, notamment les contractions oscillatoires liées au déplacement dans l'eau, sont à l'origine de cette variabilité d'un réseau à l'autre.

Enfin, le réseau formé par *Physarum polycephalum*, le célèbre blob (figure 1.15), fait actuellement l'objet d'une attention particulière du fait de ses étonnantes capacités de colonisation rapide et de remodelage autour des sources de nutriments [48]. Ce myxomycète est un Eucaryote unicellulaire : il est assimilable à une cellule géante avec plusieurs noyaux, au sein de laquelle circule le cytoplasme par ondes de contraction, permettant à l'organisme de s'étendre [49] [36].

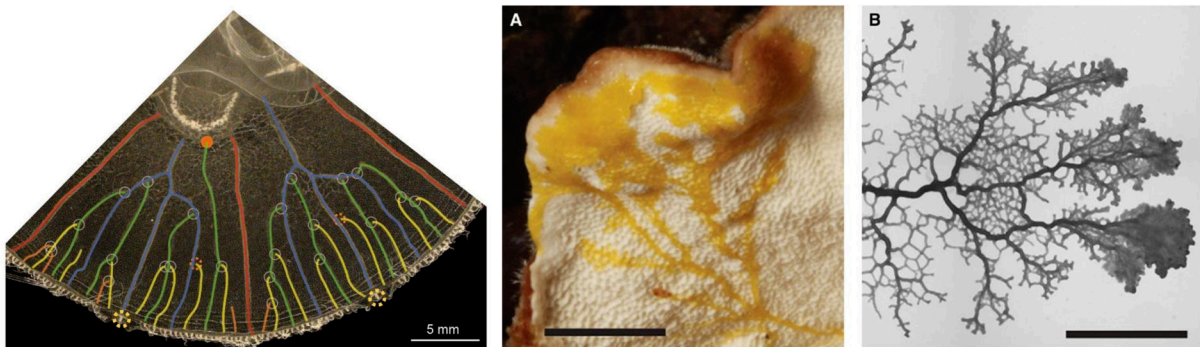


FIG. 1.15 – À gauche, la méduse *A. aurita* [47]. À droite (A et B), le blob (*P. polycephalum*) (barres d'échelle : 0,5 cm) [50].

Réseau mycélien

Le réseau mycélien des champignons présente la particularité de constituer l'organisme lui-même, et non pas d'en faire simplement partie, comme c'est le cas pour les feuilles ou le système vasculaire des animaux [51] [52]. Cette stratégie de croissance offre le précieux avantage de connecter en permanence les différentes composantes du réseau entre elles, permettant la libre circulation du cytoplasme et des signaux le long des hyphes en croissance. Le mycélium est capable de coloniser des régions pauvres en nutriments, dans la mesure où il suffit qu'une partie du réseau ait accès à une ressource pour qu'elle puisse alimenter le reste du thalle par translocation des nutriments. Les champignons sont ainsi particulièrement adaptés à la croissance dans des environnements hétérogènes en temps et en espace comme le sol [30] [32] [53].

De plus, bien que les champignons ne possèdent pas de système d'organisation central comme un cerveau, certains présentent des capacités exceptionnelles pour remodeler leur réseau en fonction de la localisation des ressources et des conditions environnementales, à la manière de *P. polycephalum*. Cette capacité d'adaptation concerne plutôt les champignons lignivores pouvant pousser sous la forme de cordons mycéliens, ou rhizomorphes, leur permettant de favoriser les circuits connectant l'inoculum à la source de nutriments (figure 1.16) [54] [55] [51]. D'autres champignons, dont de nombreux ascomycètes, ne produisent pas de rhizomorphes et développent un réseau permanent, dans le sens où il n'est pas remodelé au cours du temps.

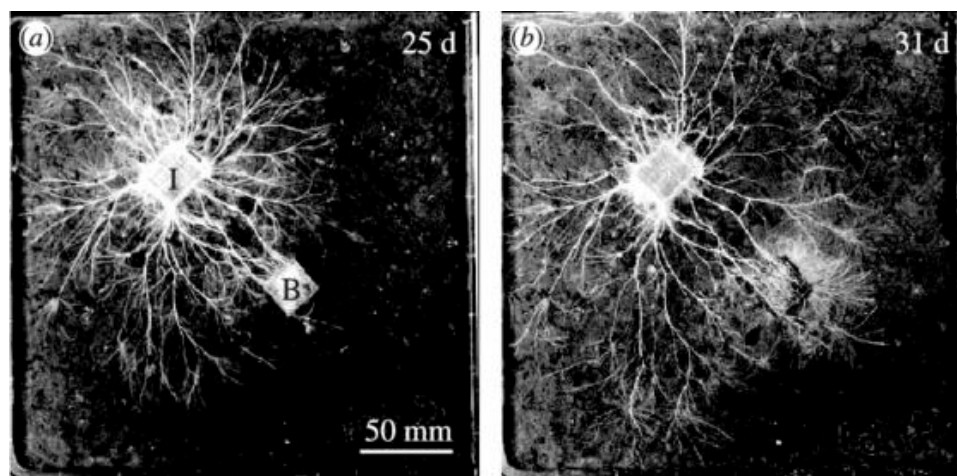


FIG. 1.16 – Croissance de *Phanerochaete velutina*. I est l'inoculum et B est la source de nutriments. Après plusieurs jours de croissance, le réseau est remodelé, et les connexions entre I et B sont maintenues [51].

Par ailleurs, Heaton *et al.* [6] ont réalisé une étude comparant les cellules mobiles, capables de migrer, avec les hyphes sur le plan de l'accès aux ressources. Sur des substrats récalcitrants et pauvres comme le bois, les hyphes prennent l'avantage grâce à leur connectivité. Lorsque les hyphes ont épuisé les nutriments essentiels comme le carbone sur une zone de ressources, les enzymes de dégradation continuent à alimenter le champignon avec les autres nutriments restants sur cette région. Comme les hyphes sont connectées les unes aux autres, l'approvisionnement du réseau en ressources essentielles reste assuré par des hyphes explorant d'autres espaces. À l'inverse, les cellules mobiles doivent se déplacer dès l'épuisement en ressources essentielles pour survivre.

Si la connexion entre les hyphes représente un atout indéniable pour la colonisation des espaces, elle constitue néanmoins un point de fragilité pour l'organisme. En effet, une simple atteinte sur une hyphe provoquant la rupture localisée de la paroi compromet l'intégrité du mycélium tout entier, qui pourrait alors se vider intégralement de son cytoplasme. L'existence des septa chez les champignons supérieurs permet de réduire la menace, puisque ces cloisons peuvent être obstruées en cas de lésion. Cette compartimentation renforce ainsi la résistance aux stress, et permet de limiter la diffusion d'un pathogène (virus par exemple) au sein du réseau [56] [57].

Modèle vivant

Le succès de la colonisation d'un milieu requiert tout d'abord de parvenir à la ressource, de s'y établir, puis d'y persister jusqu'à la reproduction et la dissémination. Cet enjeu est particulièrement maîtrisé par les réseaux fongiques, qui sont parvenus à établir un compromis optimal pour la répartition des ressources entre l'exploration rapide, le transport interne, la résilience et les coûts énergétiques liés à la construction de biomasse [52] [24] [16] [1]. En fonction des conditions environnementales et de l'espèce, l'équilibre entre ces paramètres n'est pas toujours le même. Un réseau avec de nombreuses connexions est par exemple résistant en

cas de lésions ponctuelles grâce aux nombreux chemins alternatifs, mais le coût énergétique de production de matière est élevé et les hyphes couvrent moins de surface [42] [51].

La colonisation de la plupart des territoires par les réseaux fongiques suggère que ceux-ci, au cours de l'évolution, ont développé et amélioré des solutions efficaces à ce type de problèmes d'optimisation combinatoire [51] [58]. Dans ce contexte, les réseaux mycéliens pourraient inspirer la conception d'algorithmes pour optimiser un circuit entre des points sources et cibles. Des algorithmes bioinspirés ont déjà été développés, par exemple l'« artificial bee colony algorithm », basé sur le comportement d'un essaim d'abeilles à la recherche de nectar [59] [55].

Les réseaux abiotiques

De nombreuses formes de réseaux se développent également à différentes échelles dans des contextes abiotiques, qui peuvent nous être très familiers. Par exemple, les fissures, qui apparaissent sur les vieilles peintures craquelées ou sur les sols déshydratés, sont à l'origine de réseaux creux. L'étude des réseaux sur de l'argile qui sèche montre que la formation des fissures dépend du contenu en eau, et que les fissures les plus récentes se connectent perpendiculairement aux anciennes (figure 1.17) [45] [60].

On peut également s'intéresser aux cours d'eau, qui s'organisent au fil du temps en des réseaux très ramifiés. Ils présentent des formes similaires retrouvées à toutes les échelles, ainsi qu'un angle de ramification particulier (figure 1.17) [61].

Enfin, les rues qui façonnent les plans des villes peuvent être étudiées selon le nombre d'intersections à franchir pour passer d'une rue à une autre, en identifiant ainsi les axes principaux (figure 1.17) [45].

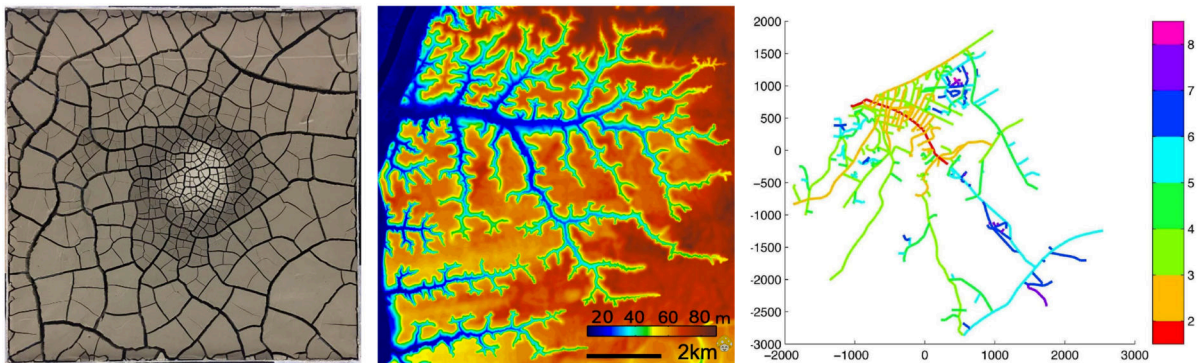


FIG. 1.17 – À gauche, un bloc d'argile dont le centre est sec [45]. Au milieu, une carte topographique de cours d'eaux en Floride [61]. À droite, une carte des rues de Villiers-sur-mer. La rue principale (la plus ancienne) peut être identifiée par l'étude du nombre de virages nécessaires pour passer d'une rue à une autre. La configuration qui minimise le nombre total de virages révèle la rue principale [45].

Les réseaux mycéliens et les exemples de réseaux évoqués ci-dessus présentent des caractéristiques communes dans la mesure où la structure se propage, bifurque et se ramifie au cours du temps. Les liens directs entre ces différents réseaux restent cependant délicats à établir. En effet, si l'intérêt pour un organisme vivant d'explorer son environnement afin d'y trouver des ressources semble évident, un tel objectif est difficile à associer à une ville ou à un motif de

fissures. Par contre, les méthodologies d'approche de la structure du réseau sont intéressantes à croiser et enrichissent les analyses strictement disciplinaires.

1.2 Croissance des hyphes

Le cytoplasme des hyphes contient de nombreux organites et structures cellulaires similaires à ceux rencontrés chez les autres organismes eucaryotes, tels que les noyaux, les mitochondries ou le cytosquelette par exemple. Le mode de croissance particulier des champignons filamenteux nécessite néanmoins des éléments cellulaires qui leur sont propres, notamment la compartimentation de l'hyphe par les septa (voir section 6.2, p.201), ainsi que le cluster de vésicules à l'apex, nommé Spitzenkörper (voir section 1.2.7, p.34) [34].

La clé de la croissance de l'hyphe se trouve à son extrémité [62]. En effet, le filament s'allonge grâce au dépôt localisé de nouvelle membrane plasmique, paroi et enzymes associées, par le biais de l'exocytose de vésicules sécrétoires à l'apex. La croissance polarisée nécessite également la coordination des marqueurs de polarité et du cytosquelette, ainsi que le maintien de la pression de turgescence, fournissant la force essentielle à l'extension de l'hyphe [63] [64] [65].

Dans cette partie, les mécanismes de croissance seront décrits au travers de travaux portant majoritairement sur les ascomycètes *N. crassa* et *Aspergillus nidulans*, deux organismes d'études de référence depuis de nombreuses années [66] [67].

1.2.1 Croissance polarisée

Les champignons filamenteux constituent un des exemples les plus extrêmes de croissance cellulaire polarisée, qui se traduit par la présence d'un seul pôle de croissance, au niveau de l'apex. Ce type de croissance asymétrique, s'oppose à la croissance isotrope, ou symétrique, pour laquelle l'expansion se produit sur toute la surface de paroi disponible [68] [15] [69].

Initiation de la croissance polarisée

La croissance des hyphes d'un champignon filamenteux est initiée suite au processus irréversible de germination de la spore. Celle-ci connaît alors une phase de croissance isotrope, engendrant l'augmentation de son volume. Chez *Ashbya gossypii*, la polarité de la cellule se fixe ensuite à une localisation spécifique à la surface de la spore, indiquée par la protéine Cdc42, et déclenche l'émergence des premiers tubes germinatifs. Le maintien de la polarité aboutit à la formation de tubes très allongés, les hyphes, qui s'étendent en continu par l'apex [69].

La mise en place de la polarité est similaire chez les champignons filamenteux et les levures, excepté au niveau de son maintien à long terme. De fait, suite à l'émergence d'un bourgeon au niveau d'un site polarisé chez la levure *S. cerevisiae*, celui-ci poursuit sa croissance de manière

isotrope jusqu'à la séparation des cellules mères et filles. Il y a ainsi alternance entre croissance polarisée et isotrope au cours du cycle de vie de la levure, contrairement aux hyphes (figure 1.18) [68] [70] [69].

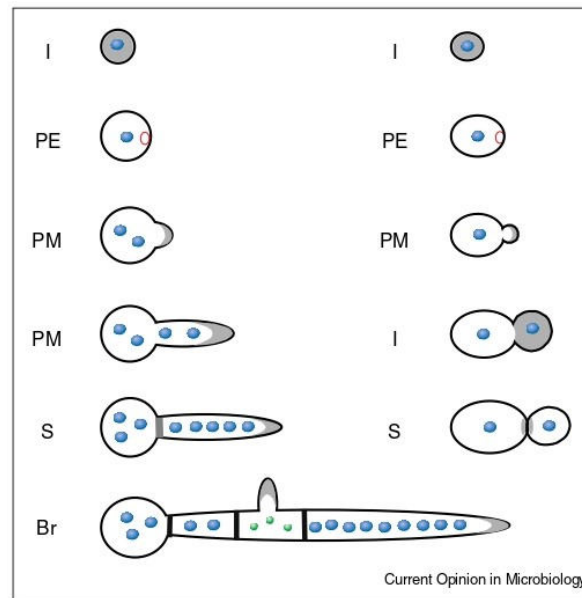


FIG. 1.18 – Comparaison entre la croissance des champignons filamenteux (à gauche) et des levures bourgeonnantes (à droite). La surface grise représente les zones de croissance, et les points bleus les noyaux. I : extension isotrope, PE : établissement de la polarité, PM : maintien de la polarité, S : septation, Br : branchement [68].

Par ailleurs, les champignons filamenteux sont capables d'assurer le maintien simultané de plusieurs axes de polarité, puisque les hyphes produisent de nombreux branchements, chacun associé à une direction de croissance. L'établissement de la polarité lors du branchement reste un processus peu connu [68] [44] [71].

Modèle d'extension de la paroi au niveau de l'apex

L'épaisseur relativement constante de la paroi sur toute la longueur de l'hyphe indique que l'ajout de matière à l'apex est proportionnel à l'augmentation de la surface de la paroi, sans quoi celle-ci deviendrait de plus en plus fine au cours du temps [39] [1]. Bartnicki-Garcia *et al.* [72] ont étudié de quelle manière la nouvelle paroi formée à l'apex déplace la paroi préexistante, par le biais du suivi de la trajectoire d'un marqueur externe (particules de carbone) sur la paroi d'une hyphe en croissance de *Rhizoctonia solani*. La trajectoire de la particule s'est révélée orthogonale : le marqueur se déplace de manière perpendiculaire à la paroi, quelle que soit sa position initiale à la surface de l'apex (figure 1.19). Ces observations suggèrent l'existence d'une force motrice perpendiculaire à la surface de l'hyphe : la pression de turgescence (voir section 1.2.2, p. 22).

La croissance des hyphes est ainsi initiée par l'établissement puis le maintien d'un site de polarité situé à l'apex. Pour ce faire, les matériaux de croissance doivent être transportés en

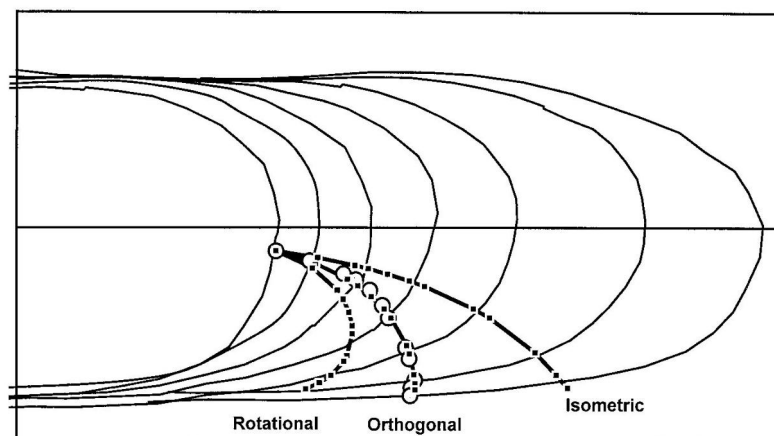


FIG. 1.19 – Analyse du déplacement d'un marqueur à la surface d'une hyphé de *R. solani*. Les courbes théoriques associées à trois modes d'extension de la paroi sont représentées. Les résultats expérimentaux révèlent que le marqueur se déplace de manière orthogonale à la paroi [72].

flux continu à la pointe de l'hyphé, grâce à l'action coordonnée d'éléments du cytosquelette (voir section 1.2.4, p.25), de la pression interne, et du flux cytoplasmique [4] [65] [71]. Les deux parties suivantes s'intéressent à l'origine et au rôle de la pression de turgescence et du flux intracellulaire dans la croissance des hyphes.

1.2.2 Pression de turgescence

Régulation de la pression hydrostatique

La pression de turgescence fournit la force nécessaire pour étendre la paroi de la cellule et lui donner sa forme, en complément du transport actif le long du cytosquelette (voir section 1.2.4, p. 25) [73] [74]. Cette pression interne se maintient par le phénomène d'osmose, qui intervient en réponse à une concentration en substances osmotiquement actives (les osmolytes) supérieure à l'intérieur de la cellule par rapport au milieu extérieur. La membrane de l'hyphé étant semi-perméable, l'eau est absorbée depuis le milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire afin de tenter d'augmenter le volume du cytoplasme, et donc de réduire la concentration interne en osmolytes. La force mécanique de la paroi autour de la membrane limite néanmoins l'augmentation du volume, et la différence entre ces deux forces est la pression de turgescence, qui conserve l'hyphé dans un état « gonflé » [4] [40] [75].

La synthèse intracellulaire d'osmolytes comme du glycérol, de l'arabitol, ou de la proline, ainsi que l'accumulation d'ions via les pompes à protons H^+ permet de maintenir cette pression par régulation osmotique [73] [40] [1]. Les pompes H^+ sont des ATPases de la membrane plasmique qui maintiennent un gradient de proton électrochimique à la membrane, permettant de réguler le pH intracellulaire mais aussi l'absorption de nutriments [76] [77].

Résistance de la paroi cellulaire

Les cellules de champignons et de plantes peuvent maintenir une pression hydrostatique élevée grâce à leur paroi très résistante. Les forces de pression sont générées de manière très

différente pour les cellules animales qui sont dépourvues de paroi [15]. La mesure de la pression de turgescence dans une hyphe peut être réalisée en la perçant à l'aide d'une sonde de pression. Les valeurs obtenues autour de 4 à 5 bar sont proches de la pression d'un pneu de vélo par exemple [15] [78] [75]. À titre de comparaison, la pression hydrostatique des tubes de pollen chez les Lys est autour de 1 à 4 bar, et de 3 à 10 bar dans les poils racinaires [15]. Les valeurs de pression très élevées dans les hyphes peuvent expliquer leur capacité impressionnante à pénétrer physiquement différents substrats (voir section 1.1.2, p.7) [79].

La paroi rigide qui enserre les hyphes pourrait s'apparenter à une fine coquille, similaire à celle des insectes, dont ces derniers se débarrassent pour pouvoir grandir. La carapace des insectes est d'ailleurs composée en grande partie de chitine, comme la paroi des hyphes (voir section 1.2.5, p.31). Le recours à la mue chez les insectes reflète la difficulté pour un organisme de grandir entouré par une paroi rigide [80]. Reinhardt [81] formule une hypothèse en 1892 selon laquelle l'insertion du nouveau matériel de paroi à l'extrémité est facilitée par la souplesse locale de l'apex (hypothèse du « soft spot »). La pression de turgescence s'exerce sur l'intégralité de la paroi, mais aura un effet plus important sur la région où la paroi est souple, permettant ainsi à l'hyphe de s'étendre (figure 1.20) [15] [39]. Wessels *et al.* [82] apportent en 1983 les preuves expérimentales d'une plus grande flexibilité de l'apex que celle de la région subapicale. Cette configuration de l'hyphe explique intuitivement la croissance longitudinale, et non radiale du filament [39]. L'équilibre entre croissance et rigidité est délicat, car si la pression de turgescence produit une force supérieure à la valeur de résistance de la paroi, même sur une zone localisée, la paroi se rompt et la cellule meurt [4].

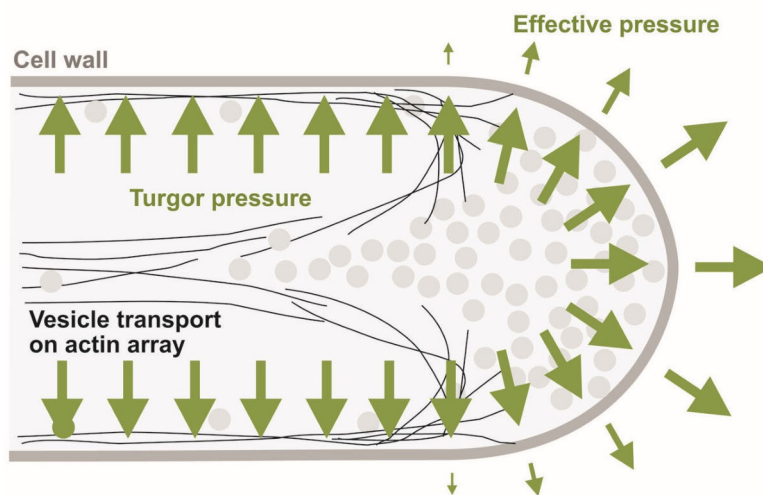


FIG. 1.20 – Apex d'une hyphe en croissance. La pression de turgescence exerce une force sur l'intégralité de la surface de la paroi cellulaire, mais n'engendre une extension qu'à l'extrémité, région où la paroi est la plus souple [15].

Absorption de l'eau

Le champignon dépend en permanence de l'absorption d'eau pour maintenir sa croissance. La région du mycélium dans laquelle ce phénomène intervient reste incertaine. Certains auteurs

considèrent que l'eau doit être assimilée au centre du thalle pour permettre la création d'un flux en direction de l'apex (voir section 1.2.3, p.24), et selon d'autres, l'absorption locale de l'eau au niveau de l'extrémité de l'hyphe est favorable à l'extension [83] [73].

La membrane de l'hyphe est perméable à l'eau, notamment du fait de la présence d'aquaporines favorisant la perméabilité. À l'inverse, les hydrophobines sont des protéines sécrétées afin d'éviter la perte d'eau. Ces petites protéines de 15 kDa, riches en cystéine, s'auto-assemblent pour former une couche hydrophobe à la surface de l'hyphe, en particulier sur les hyphes aériennes [83] [73].

1.2.3 Flux cytoplasmique

Circulation du cytoplasme au sein de l'hyphe

Si la biomécanique s'intéresse souvent aux flux de fluides externes auxquels les organismes vivants sont confrontés, tels que le vent ou les rivières, les cellules sont également soumises à un autre défi lié aux flux internes, qu'elles doivent initier et réguler en permanence. Le cytoplasme des champignons filamenteux est particulièrement dynamique et est organisé de manière à permettre le transport des matériaux de croissance en direction de l'apex [84]. Le mouvement de ces éléments est assuré soit par des moteurs moléculaires le long du cytosquelette (transport actif, voir section 1.2.4, p.25), soit par diffusion, soit par le flux de cytoplasme (ou flux de masse) [85] [73].

On peut assimiler le transport actif au déplacement de cargaisons par des bateaux sur l'océan, alors que les éléments transportés par le flux de masse s'apparentent aux objets portés par les courants de l'eau [85]. Le cytosol n'est pas à l'origine de ce flux de cytoplasme, mais est au contraire entraîné passivement par les éléments en circulation le long du cytosquelette [86]. Ce dernier est d'ailleurs lui-même transporté par le flux cytoplasmique [48] [74].

Lew [78] a donné une preuve de l'existence du flux de masse en injectant dans des hyphes de *N. crassa* des gouttes d'huile, qui n'interagissent pas avec le cytosquelette. Les gouttes se sont déplacées en direction de l'extrémité à une vitesse de $5\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, excédant la vitesse de croissance de l'apex. Lew a également émis l'hypothèse que le flux cytoplasmique nécessite une différence de pression au sein de l'hyphe, provenant d'un gradient osmotique intracellulaire créé par un transport d'ions et la production d'osmolytes. La différence de pression intracellulaire requise pour l'écoulement cytoplasmique est très faible ($0,001$ à $0,1\text{ bar}\cdot\text{cm}^{-1}$) en comparaison à la pression de turgescence (4 à 5 bar).

Influence de la diffusion et du flux cytoplasmique sur le transport au sein de l'hyphe

En complément du transport actif, les macromolécules en circulation au sein de l'hyphe sont soumises à trois effets physiques : la diffusion, le flux cytoplasmique et la durée de vie de la molécule [84]. Afin d'évaluer la contribution relative de la diffusion ou du flux massique sur le transport de la molécule, Roper *et al.* [84] proposent de se référer au nombre sans dimension C , égal au ratio entre la distance que la macromolécule parcourt par diffusion durant sa durée

de vie et la distance parcourue en étant transportée par le flux de cytoplasme : $C = \frac{\sqrt{D\tau}}{U}$, avec τ la durée de vie de la molécule, D son coefficient de diffusion, et U la vitesse du flux.

Si C est inférieur à 1, la plupart du transport est lié au flux de masse. À titre d'exemple, pour un fragment d'ARN messager de taille standard ($D = 0,2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) avec une durée de vie d'une heure, son transport sera principalement assuré par le flux cytoplasmique (et non par la diffusion) si $U > 0,007 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, vitesse atteinte dans la plupart des hyphes en croissance [84].

Profil d'écoulement du cytoplasme

Il pourrait être attendu que le profil d'écoulement du flux de cytoplasme présente une variation de la vitesse le long de la section transversale de l'hyphe en raison de la contrainte de cisaillement de la paroi, où la vitesse doit s'annuler. Le flux serait alors plus rapide au centre du cylindre que dans les régions proches de la paroi. Cependant, des mesures *in vivo* chez *N. crassa* indiquent que les différences de vitesse sont très faibles sur la section transversale. Ces observations s'expliquent probablement par le fait que le cytoplasme est très visqueux à cause de la présence de polymères enchevêtrés et de grosses protéines, et s'écoule ainsi davantage comme une pâte de dentifrice que comme de l'eau [84]. Lew [75] a d'ailleurs décrit le flux cytoplasmique comme un écoulement laminaire, avec un nombre de Reynolds de faible valeur (de l'ordre de 10^{-4}), signifiant donc que les forces de frottement liées à la viscosité dominent sur les forces inertielles liées à la vitesse.

Le paragraphe suivant s'intéresse à la structure de transport actif au sein du cytoplasme : le cytosquelette. L'existence de ce mode de transport se justifie notamment par le fait que la diffusion seule serait largement insuffisante pour déplacer certaines macromolécules volumineuses [87].

1.2.4 Cytosquelette

Rôle du cytosquelette

Le cytosquelette est une structure dynamique qui maintient la forme de la cellule, organise les composés du cytoplasme, joue un rôle pour le transport dirigé de macromolécules, d'organites et d'ARN à l'intérieur de la cellule, et pour la division cellulaire [4] [70]. Il est également indispensable à l'établissement et au maintien de la polarité de l'hyphe (voir section 1.2.1, p. 20). Ce squelette est composé des microtubules, des microfilaments d'actine, de leurs protéines motrices et des protéines associées, et des septines (voir section 1.2.4, p. 25) [74] [65] [4]. Chaque élément du cytosquelette possède sa propre dynamique, mais réalise des liaisons avec les autres composés du squelette, formant ainsi un système cytoplasmique interconnecté et continu [4] [34].

Les microtubules sont spécialisés pour le transport de longue distance en direction de l'apex, et les microfilaments d'actine sont plutôt utilisés pour les déplacements à petite distance [65]. S'il a été montré que la croissance de l'hyphe peut se poursuivre en l'absence de microtubules fonctionnels chez *N. crassa* et *A. nidulans*, elle est par contre totalement bloquée si l'intégrité du

cytosquelette d'actine est affectée [74] [44]. Les fonctions des microtubules restent essentielles à la morphogénèse de l'hyphe : des mutations ou inhibitions entraînant la désorganisation des microtubules chez *N. crassa* provoquent des défauts de croissance et une morphologie inhabituelle des hyphes [88] [67].

Protéines motrices

Le matériel nécessaire à l'assemblage de la nouvelle paroi à l'apex est transporté le long du cytosquelette dans des vésicules renfermant la précieuse cargaison (« cargo »). Ces vésicules procurent ainsi une mobilité aux enzymes et aux polymères à l'intérieur de la cellule [89]. Les vésicules, les macromolécules et les organites peuvent se lier au cytosquelette grâce à des protéines motrices spécifiques des microtubules et des filaments d'actine. Les fonctions du cytosquelette sont ainsi directement liées à ces moteurs protéiques [34]. Les moteurs moléculaires principaux associés aux microtubules sont les kinésines et les dynéines, et ceux associés aux filaments d'actine sont les myosines (voir section 1.2.4, p.25).

Ces protéines ont des similarités structurales : elles possèdent toutes un domaine moteur, une zone de liaison et une queue. De plus, elles hydrolysent toutes les trois de l'ATP afin de pouvoir se déplacer le long du filament (figure 1.21). L'énergie fournie par le clivage de l'ATP est transformée en énergie cinétique permettant un mouvement de la protéine [4] [87]. Plus précisément, l'hydrolyse de l'ATP provoque un changement de conformation de la protéine, qui peut alors se déplacer par petits mouvements successifs (figure 1.22) [71] [4].

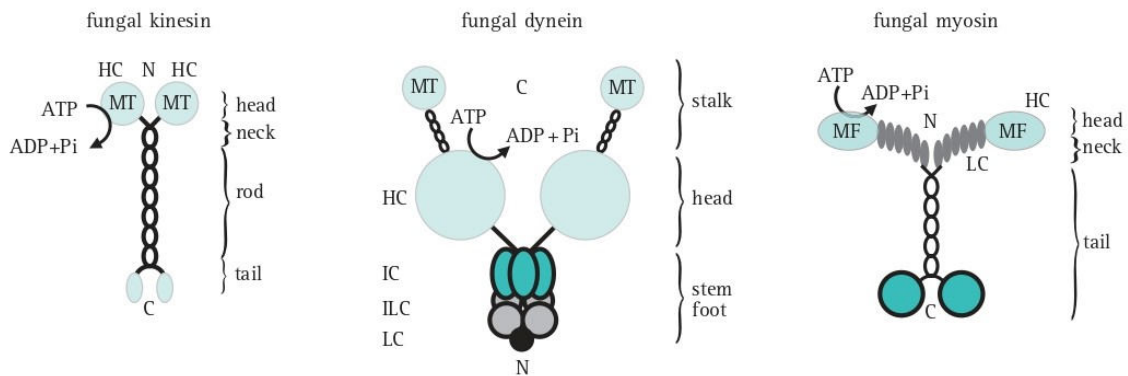


FIG. 1.21 – Représentations des moteurs moléculaires principaux associés au cytosquelette. De gauche à droite : kinésine (microtubules), dynéines (microtubules), myosine (filaments d'actine). L'énergie libérée par le clivage de l'ATP permet le déplacement de la protéine. C : extrémité C-terminale, HC : chaîne lourde, IC : chaîne intermédiaire, ILC : chaîne intermédiaire légère, LC : chaîne légère, MF : site de liaison de l'actine, MT : site de liaison des microtubules, N : extrémité N-terminale [4].

Malgré une absence de mesure des coûts énergétiques de ce transport actif chez les champignons, on peut supposer qu'ils sont extrêmement élevés par rapport au déplacement par flux cytoplasmique ou par diffusion. En effet, les microtubules et les microfilaments d'actine doivent être assemblés, les vésicules et organites transportés sont de tailles conséquentes, la vitesse de transport est élevée, et le cytoplasme est visqueux [73].

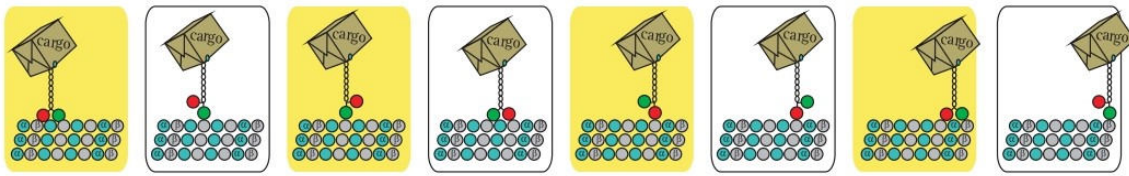


FIG. 1.22 – Mécanisme de déplacement d'une kinésine (de gauche vers droite) transportant des vésicules (« cargo ») le long d'un microtubule [4].

Microtubules

Les microtubules sont formés d'hétérodimères de tubuline alpha et beta qui s'assemblent de bout en bout en tubes cylindriques de 25 nm de diamètre, et de longueur très variable. Ils ne sont pas restreints par la taille des compartiments septaux car ils peuvent s'étendre au travers des pores [74]. Ces filaments s'allongent en se polymérisant grâce à l'assemblage des dimères de tubuline, jusqu'à une bascule qui intervient aléatoirement et qui provoque la dépolymérisation. Celle-ci mène à un raccourcissement rapide des microtubules, jusqu'à leur disparition totale, ou bien jusqu'à la reprise de l'élongation. Les microtubules sont donc en permanence en état d'instabilité dynamique [4] [74].

Chez *N. crassa*, il a été observé que les microtubules sont principalement organisés de manière longitudinale le long de l'hyphe. Les segments droits sont cependant rares : la plupart possèdent une légère courbure hélicoïdale et ont tendance à s'entrelacer les uns avec les autres pour former un réseau tressé et lâche (figure 1.23). Dans les régions éloignées de l'apex, les microtubules sont organisés de manière plus aléatoire [74] [88].

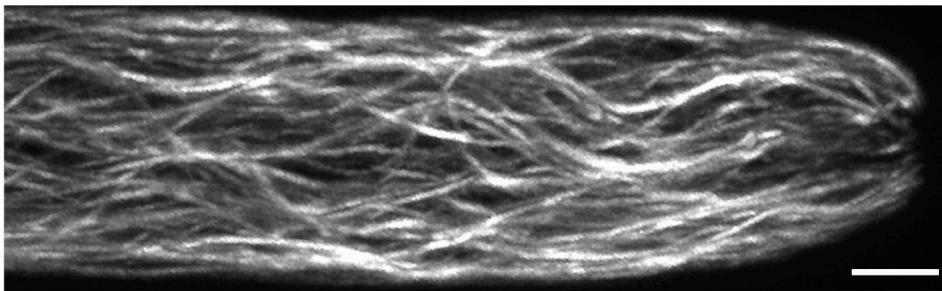


FIG. 1.23 – Microtubules observés sur une hyphe de *Sclerotium rolfisii* (immunofluorescence, microscopie confocale). Les microtubules sont principalement orientés parallèlement à l'axe de croissance et forment un maillage tressé. Barre d'échelle : 3 μm . (adapté de [34]).

Les microtubules sont des structures polaires : l'extrémité (+) se polymérise ou se dépolymérise activement, alors que l'extrémité (-) est plus stable [70] [90] [87]. L'extrémité (+) en croissance est associée à de nombreuses protéines qui contrôlent l'extension, telle que la « microtubule polymerase », et est majoritairement orientée en direction de l'apex (figure 1.24) [29] [70] [90] [44].

L'extrémité (-) constitue souvent le point d'ancrage sur les « microtubule organizing centers » (MTOC) [4] [29]. Il s'agit d'un groupe d'organites sans membrane à partir duquel est initiée la

polymérisation du filament. La plupart des champignons ont des MTOC intégrés dans l'enveloppe nucléaire, ou proches des septa (figure 1.24) [44] [91].

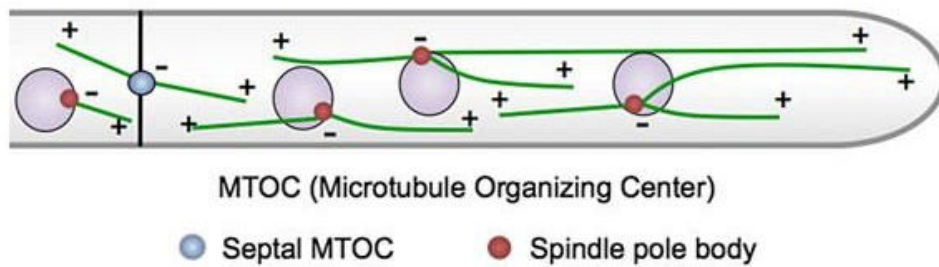


FIG. 1.24 – La plupart des microtubules sont orientés de telle sorte que leur extrémité (+) soit dirigée vers l'apex. Leur extrémité (-) est reliée aux MTOC (adapté de [66]). La plupart des champignons possèdent des MTOC particuliers appelés « spindle pole bodies » (SPB), qui sont des structures intégrées dans l'enveloppe nucléaire [91].

Le transport s'appuyant sur les protéines motrices permet un déplacement dans les deux directions le long du microtubule grâce à sa polarité, sur des distances importantes de quelques millimètres à quelques centimètres. Les champignons possèdent des moteurs moléculaires associés aux microtubules parmi les plus rapides connus ($1 \text{ à } 4 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) [73] [71]. Les kinésines se déplacent plutôt en direction de l'extrémité (+) des microtubules, c'est-à-dire vers l'apex, tandis que les dynéines circulent dans l'autre sens (figure 1.25) [87] [4]. Chez les champignons filamenteux, 10 kinésines différentes et une unique dynéine ont été décrites [90] [67]. De plus, Palenzuela *et al.* [92] ont étudié des microtubules flottant librement dans un milieu visqueux, et ont montré qu'une dynéine transportant une cargaison peut exercer une force de traction sur le filament et initier son déplacement dans le sens contraire à la direction de la protéine motrice.

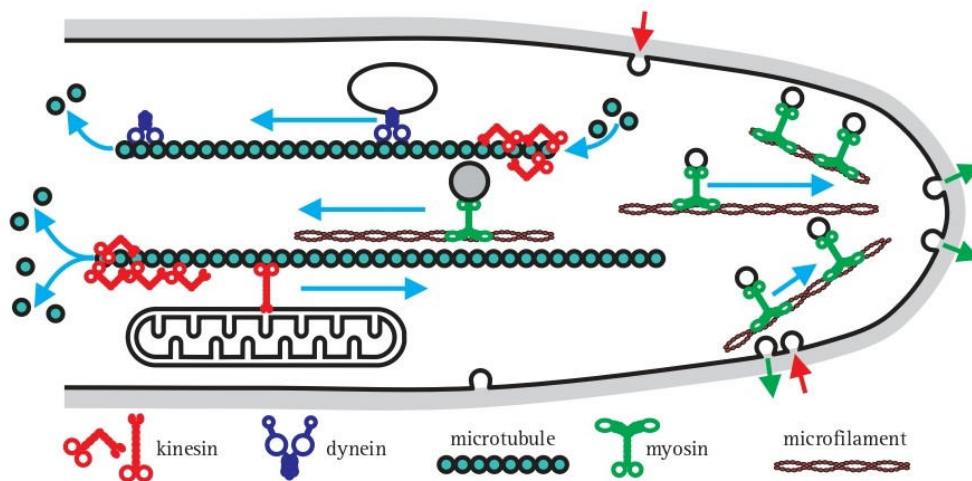


FIG. 1.25 – Modèle de l'activité des protéines motrices, assurant le transport de cargaisons au sein de l'hyphé. Les kinésines et les dynéines se déplacent en direction opposée le long des microtubules. Les myosines circulent le long des microfilaments d'actine, concentrés à l'apex [4].

Actine

L'actine est une des protéines les plus abondantes chez les eucaryotes et joue différents rôles dans les fonctions cellulaires. En coopération avec des protéines associées, l'actine est impliquée dans la croissance cellulaire, la régulation spatiale des organites, l'exocytose (voir section 1.2.8, p.38), l'endocytose (voir section 1.2.9, p.40) et la forme de l'hyphes [29]. L'actine sous forme monomérique est un polypeptide de 43 kDa appelé actine globulaire (actine G), qui peut s'assembler en filaments. L'arrangement de deux filaments formant une double hélice donne naissance à un microfilament de 7 nm de diamètre, également appelé actine filamenteuse (actine F). Tout comme les microtubules, ces filaments d'actine sont polarisés, avec une extrémité (+) très dynamique et une extrémité (-) [74] [63].

L'assemblage des microfilaments connaît une succession de phases de croissance et de phases de désassemblage, régulées par hydrolyse de l'ATP ainsi que par des « actine binding proteins » (ABP). Les formines font par exemple partie des ABP, et assurent la polymérisation par l'addition des actines G à l'extrémité (+). L'accumulation des formines à l'apex suggère que l'extrémité (+) des microfilaments est orientée vers le pôle de croissance [4] [71] [63].

L'actine F peut s'assembler en trois structures d'ordre supérieur différentes (figure 1.26). Tout d'abord, les patches d'actine sont des structures ponctuelles, composées par l'accumulation d'actine F en complexe avec plus de 60 autres protéines, et localisées dans les zones où se produit l'endocytose (voir section 1.2.9, p.40). Les patches d'actine entourent les vésicules en formation lors de l'invagination de la membrane, puis sont progressivement dégradés lorsque les vésicules s'éloignent de celle-ci.

Les anneaux d'actine sont actifs lors de la formation des septa (voir section 6.2, p.201). Ces anneaux sont liés à la membrane et génèrent une force de contraction qui guide l'invagination et la synthèse de la paroi du septum en formation.

Enfin, les câbles d'actine sont des agrégats de microfilaments d'actine réticulés, indispensables pour le transport de cargaisons variées dans le cytoplasme (vésicules, patches d'actine, mitochondries, vacuoles, ARN...) [63] [44].

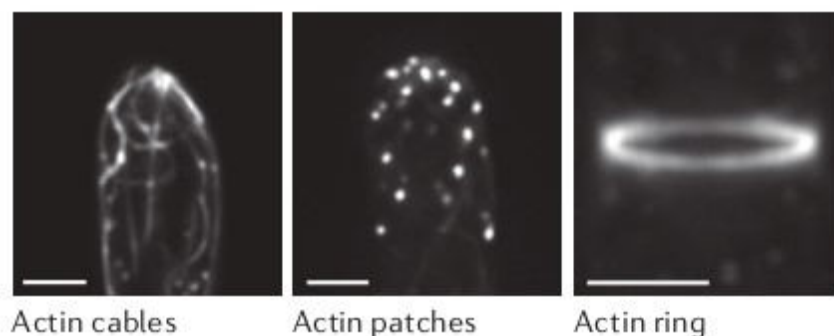


FIG. 1.26 – L'actine F peut s'organiser en trois structures avec des rôles fonctionnels différents : câbles, patches, ou anneaux d'actine (de gauche à droite). Barre d'échelle : 2 μm (adapté de [63]). Les câbles sont généralement très difficiles à visualiser *in vivo*, mais l'utilisation du colorant LifeAct se révèle très efficace pour observer ces structures en fluorescence, comme sur ces figures [63].

La protéine motrice associée aux filaments d'actine est la myosine. Le sens de déplacement le long des filaments polarisés dépend du type de la myosine (figure 1.25) [90] [44] [87].

Similarité avec les tubes de pollen des plantes

Malgré des parcours évolutifs distincts, les tubes de pollen des plantes à fleurs et les hyphes des champignons filamenteux présentent des similitudes structurelles et fonctionnelles. Les tubes de pollen sont des protubérances cellulaires éphémères qui permettent de guider les spermatozoïdes depuis le grain de pollen vers l'ovaire de la fleur réceptrice, afin d'assurer la fécondation. Ces structures polarisées ont une géométrie extrême dans la mesure où la longueur du tube est jusqu'à plusieurs milliers de fois plus grande que la largeur [93] [94] [86].

De manière similaire aux hyphes de champignon, les tubes de pollen assurent un transport interne de cargaisons à longue et à courte distance grâce au cytosquelette, comprenant les microtubules et les filaments d'actine, orientés parallèlement le long du tube [94] [93]. L'élongation du tube de pollen nécessite également une certaine pression de turgescence [86]. Si la plupart des gros organites font demi-tour une fois arrivés au niveau de l'apex, les vésicules s'accumulent quant à elles à l'extrémité, et y délivrent des précurseurs de la paroi et des enzymes par exocytose. Les vésicules vides sont ensuite entraînées par le flux cytoplasmique et repartent en écoulement opposé [94] [86] [93]. De plus, le processus d'endocytose, décrit comme fondamental pour la croissance des hyphes (voir section 1.2.9, p.40), se produit également pour les tubes de pollen (figure 1.27).

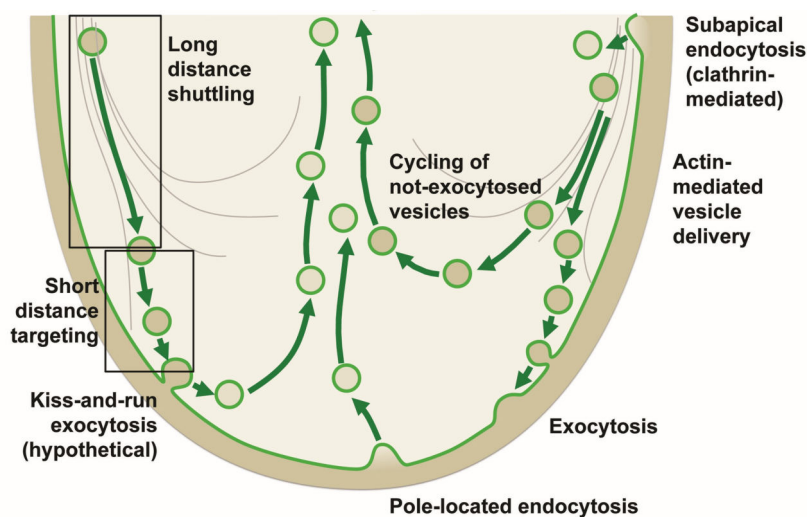


FIG. 1.27 – Les vésicules sécrétoires sont transportées jusqu'à l'extrémité des tubes de pollen, où elles délivrent les précurseurs nécessaires à l'extension de la paroi par exocytose. Une activité d'endocytose a également été décrite à l'apex (adapté de [94]).

Septines

Les septines sont également des protéines du cytosquelette, présentes chez de nombreux eucaryotes comme les animaux, les levures, les champignons filamenteux, mais absentes chez les plantes. Elles jouent des rôles variés dans la polarité de la cellule, le trafic de vésicules, la

morphologie de la cellule, la septation et la germination. Les septines appartiennent à la famille des protéines de liaison au GTP, et interagissent avec l'actine, les microtubules et la membrane plasmique [63] [95].

Ces protéines sont capables de former des filaments oligomériques polarisés qui s'assemblent en différentes structures d'ordre supérieur appelées complexes de multiseptines. Ces structures peuvent être des anneaux au niveau des septa, des boucles ou des fibres dans le cytoplasme, et des bandes ou des coiffes sur les foyers de croissance (émergence d'une branche par exemple) [63] [96] [95] [97] [96].

Les complexes de multiseptines pourraient contribuer à générer des asymétries dans la cellule, et ainsi à maintenir la polarité, en agissant comme des échafaudages moléculaires et en formant des barrières de diffusion. Ces dernières pourraient bloquer la diffusion de la machinerie de polarisation en la maintenant au niveau de la membrane apicale, et ainsi contribuer à la polarité [21] [67] [96].

De plus, il a été observé que les septines semblent limiter le nombre de sites de polarité chez *N. crassa*, mais le mécanisme reste inconnu. Des mutants affectés au niveau des septines ont en effet un mycélium hyperbranché [21].

1.2.5 Paroi cellulaire des hyphes

La paroi des hyphes joue un rôle clé dans la morphologie des cellules, dans l'interaction avec l'environnement et dans la protection du milieu intracellulaire. La composition de cette structure dynamique peut varier en fonction des conditions extérieures [74] [98]. La paroi est malléable et peut être remodelée, notamment lors des branchements ou des fusions entre les hyphes [74].

Composition de la paroi cellulaire

La composition de la paroi est connue en détail chez certaines espèces comme *N. crassa*, mais les mécanismes moléculaires et cellulaires précis qui contribuent à sa synthèse et à son remodelage restent obscurs [98]. Chez *N. crassa*, la paroi est composée de plusieurs couches superposées. Au plus près de la membrane, des fibres de chitine forment une première épaisseur, recouverte par une couche plus épaisse de β - 1,3 glucanes et autres glucanes. Ce maillage de polysaccharides sert de support à l'ancrage des galactomannanes, et des protéines de paroi y sont insérées, qui peuvent avoir gardé ou non leur ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), leur permettant de rester liées à la membrane plasmique (figure 1.28). Il a été estimé que la chitine, les glucanes et les galactomannanes représentent 80 à 90 % des composants de la paroi, et les protéines qui y sont insérées entre 10 et 20 % [74]. Celles-ci jouent un rôle pour le remodelage de la membrane plasmique et pour la croissance de l'hyphe [98]. De plus, la bicouche lipidique de la membrane plasmique permet d'ancrer les protéines nécessaires à la synthèse des polysaccharides de la paroi, processus qui sera détaillé dans le paragraphe suivant (figure 1.28) [29] [98].

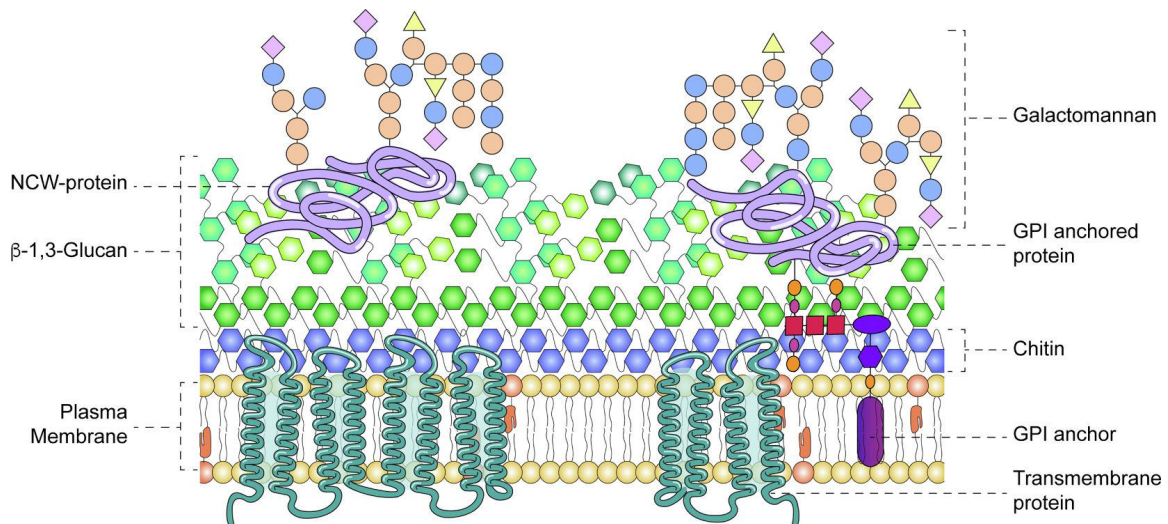


FIG. 1.28 – Représentation de la structure de la paroi chez *N. crassa*, avec l'espace intracellulaire situé en bas. Une couche de chitine est directement accolée à la membrane plasmique, suivie d'une épaisseur de glucanes, utilisée comme support par les galactomannanes et autres protéines. NCW : protéine de paroi non ancrée [98].

Synthèse de la chitine et des glucanes

La chitine est un homopolymère de résidus N-acétylglucosamine liés entre eux par des liaisons de type $\beta-1,4$, et est synthétisée par les chitine synthases. Chez *N. crassa*, sept gènes codent ces enzymes, et elles ont été observées dans la partie centrale du Spitzenkörper (amas de vésicules à l'apex, voir section 1.2.7, p.34) et au niveau des septa en développement. Une fois insérées dans la membrane plasmique, les chitines synthases transfèrent des résidus N-acétylglucosamine depuis le côté cytoplasmique et les incorporent à une chaîne de chitine en croissance [71] [98] [99].

Les polymères de $\beta-1,3$ glucanes sont synthétisés par le complexe glucane synthase, majoritairement situé dans la région des macrovésicules du Spitzenkörper, c'est-à-dire à sa périphérie [98]. De la même manière que la synthèse de la chitine, les glucane synthases catalysent l'assemblage de résidus glucose originaires du cytoplasme sur une chaîne de $\beta-1,3$ glucanes en extension [65] [71].

Les chitine et glucane synthases étant insérées dans la membrane plasmique, les polysaccharides principaux de la paroi sont synthétisés directement sur leur lieu d'incorporation à l'extrême apex. On suppose que les deux types d'enzymes sont transportés sous forme inactive par des vésicules sécrétoires en direction de l'apex, et qu'elles sont libérées directement près de la membrane plasmique par exocytose (voir section 1.2.8, p.38) [98] [65]. Par contre, les protéines de la paroi sont quant à elles synthétisées dans le cytoplasme et sont ensuite transportées à l'apex pour être incorporées à la paroi [98] [74].

1.2.6 « Cell end markers » et polarisome

La croissance polarisée des hyphes repose sur l'ajout de nouvelle paroi dans une région extrêmement localisée. Ce processus nécessite que les vésicules sécrétoires contenant le matériel de paroi soient apportées précisément à l'extrême pointe de l'hyphe par le cytosquelette. Pour cela, un des rôles des microtubules est de transporter des repères de polarité appelés « cell end markers » directement à la membrane plasmique apicale. Ces protéines marqueurs sont ainsi correctement placées, et vont initier la polymérisation des câbles d'actine polarisés. Ces derniers peuvent à leur tour apporter des vésicules sécrétoires en direction de l'extrémité de l'hyphe. Des mutations des cell end markers chez *A. nidulans* provoquent des hyphes très courbées ou en zigzag [44] [66] [100] [29].

Parmi une variété de cell end markers, qui lient les microtubules et le cytosquelette d'actine, et participent à la polarité, certains ont été étudiés chez *A. nidulans*. TeaA, présent à l'extrémité des microtubules, est apporté par ces derniers à l'apex puis ancré à la membrane plasmique par interaction avec son récepteur TeaR. TeaA interagit avec d'autres composés, et le recrutement final de la formine SepA induit la polymérisation des câbles d'actine (figure 1.29) [44] [95] [70] [71].

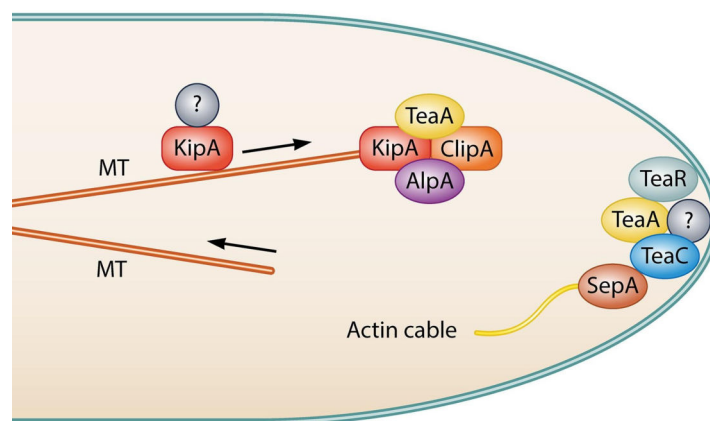


FIG. 1.29 – Les cell end markers jouent un rôle de liaison entre les microtubules et les microfilaments d'actine chez *A. nidulans* (voir le texte pour la description de TeaA et TeaR [29]).

Les microtubules transmettent ainsi des informations de position pour l'initiation du cytosquelette d'actine par le biais des repères de polarité. Une fois que les cell end markers sont positionnés sur l'apex, une cascade de protéines GTPases est activée, dont notamment la protéine Cdc42. Ces enzymes contribuent à l'assemblage et au maintien du polarisome, un complexe multiprotéique qui joue un rôle important dans le maintien de la polarité et la polymérisation des câbles d'actine [65] [29] [101] [68].

Taherally *et al.* [102] ont étudié le lien éventuel entre 10 protéines impliquées dans la polarité (dont Tea1, l'homologue de TeaA par exemple) et la vitesse de croissance chez la levure *S. pombe*. Cette vitesse semble positivement corrélée avec la quantité locale de ces facteurs de polarité.

Si l'ajout de nouveaux éléments de paroi à l'apex est indispensable à la croissance de l'hyphes, ce processus provoque inévitablement la dilution des marqueurs de polarité initialement concentrés dans la région d'extension. Ishitsuka *et al.* [100] proposent un modèle de polarité transitoire afin d'expliquer comment la cellule fait face à cette difficulté, en s'appuyant sur les cell end markers TeaR et TeaA chez *A. nidulans*. Le modèle comprend plusieurs étapes (figure 1.30) :

- (i) Tout d'abord, comme évoqué précédemment, TeaA est apporté par les microtubules au niveau de son récepteur TeaR, ancré à la membrane plasmique. De nouvelles protéines repères sont recrutées et forment un site de polarité.
- (ii) Les câbles d'actine commencent à polymériser, recrutant alors davantage de vésicules sécrétoires qui libèrent leur contenu pour étendre la paroi : les protéines TeaR sont dispersées le long de la membrane. Les microtubules se dépolymérisent.
- (iii) Une fois que le site de polarité est désassemblé, de nouveaux microtubules sont recrutés et guidés par quelques marqueurs TeaR et par les filaments d'actine encore présents. Le site de polarité est rapidement réassemblé car les microtubules transportent de nouveaux TeaR ainsi que des protéines TeaA à leurs extrémités, et le cycle peut être initié à nouveau.

Le site de polarité est ainsi très dynamique et peut être légèrement déplacé à chaque cycle [100] [66] [103]. Ce modèle correspond à des observations chez *N. crassa* où des bouffées d'exocytose ont été détectées à différentes positions à l'apex [104].

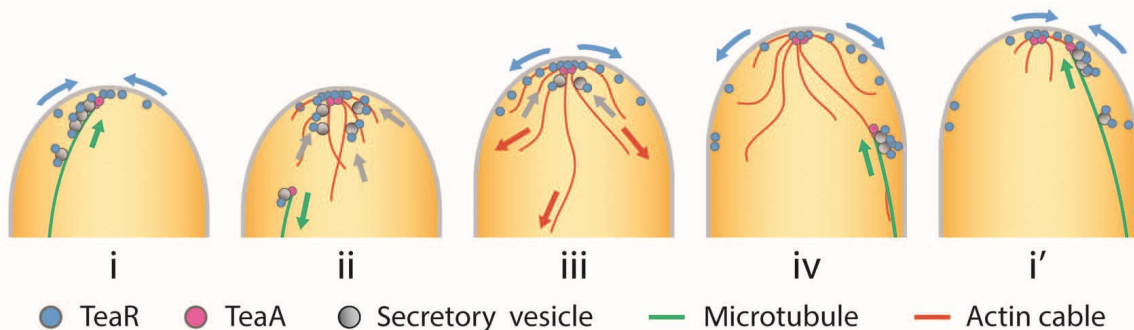


FIG. 1.30 – Modèle de polarité transitoire chez *A. nidulans*. Voir le texte pour la description des étapes du modèle [100].

1.2.7 Spitzenkörper

Découverte du Spitzenkörper

En 1969, Girbardt et Bracker ont utilisé les moyens optiques disponibles à l'époque pour observer des hyphes fongiques, et ont révélé l'un des aspects les plus fondamentaux de la croissance des champignons : l'existence du Spitzenkörper (SPK), qui signifie « corps apical » en allemand [105] [106]. Les deux scientifiques ont été parmi les premiers à exploiter de manière optimale la microscopie de contraste de phase et la microscopie électronique pour observer des cellules vivantes, qui ne laissent presque rien paraître de leur contenu en microscopie en champ

clair. Girbardt et Bracker mettent alors en évidence la présence d'un corps, nommé SPK, au niveau des apex des hyphes en croissance (figure 1.31), et observent qu'il disparaît dès l'arrêt de l'extension. Ils suggèrent également que le SPK pourrait guider la direction de croissance de l'hyphe. Ils caractérisent le SPK comme un assemblage sphéroïdal de vésicules et d'autres éléments moins abondants. Les vésicules se répartissent entre les microvésicules et les macrovésicules, organisées en deux strates, au cœur et à la périphérie, respectivement (figure 1.31). Enfin, ils émettent l'hypothèse que les vésicules produites dans les régions subapicales se retrouvent concentrées à l'apex au niveau du SPK, avant d'être incorporées à la paroi en expansion [105] [106]. Cette hypothèse a été confirmée par la suite, comme nous l'évoquerons dans les paragraphes suivants [89] [107].

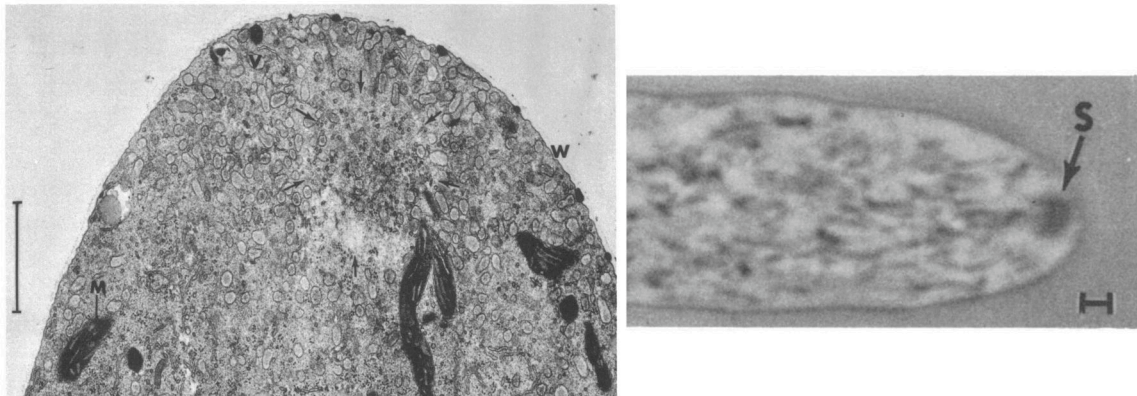


FIG. 1.31 – Observation de l'apex de *N. crassa* en microscopie électronique à gauche et à contraste de phase à droite. À gauche, le SPK est délimité par des flèches. V : vésicules, M : mitochondries, W : paroi. À droite, la structure sombre indiquée par une flèche est le SPK. Barre d'échelle : 1µm (adapté de [106]).

Composition du Spitzenkörper

Le SPK est une structure éphémère composée d'une agglomération de vésicules à l'apex, dont la présence ou l'absence sont étroitement liées à la croissance et à la morphologie de l'hyphe. Il n'est délimité par aucune membrane, et peut présenter des variabilités de taille, de forme et de position [34] [108]. Une des fonctions attribuées au SPK est de concentrer les vésicules sécrétoires avant qu'elles ne soient délivrées à la membrane plasmique avec laquelle elles fusionnent pour y apporter le nouveau matériel paroi [65].

Chez *N. crassa*, le cœur du SPK est composé de microvésicules de 30 à 40 nm, identifiées comme étant majoritairement des chitosomes (c'est-à-dire des vésicules contenant des chitine synthases, voir section 1.2.5, p.31), des microfilaments d'actine et des ribosomes. La couche extérieure contient quant à elle des macrovésicules, dont le diamètre est généralement supérieur à 100 nm. Elles renferment notamment des composés du complexe glucane synthase et des polymères de paroi (voir section 1.2.5, p.31) [65] [29] [98].

Le SPK est caractéristique des *Dikarya*, et est présent chez la plupart des basidiomycètes et des ascomycètes. Par contre, les zygomycètes par exemple (champignons inférieurs) ne possèdent

pas de SPK, mais un « apical vesicle crescent » (AVC). Cette structure présente un agencement plus simple que le SPK et s'apparente à une fine couche de vésicules (figure 1.32), mais semble fonctionner de manière similaire [29] [71] [108].

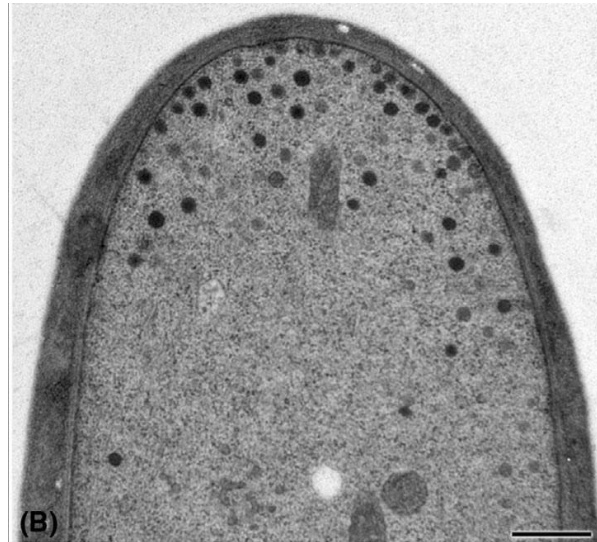


FIG. 1.32 – L'accumulation de vésicules sécrétoires proches de la membrane plasmique forme l'AVC chez *Coemansia reversa* (barre d'échelle : 0,5 μm) [108].

Rôle du Spitzenkörper

Le cytosquelette est étroitement lié et interagit en permanence avec le SPK, qui agirait comme une station de transfert entre les microtubules et le cytosquelette d'actine (figure 1.33 A). Les vésicules circulent sur les longues distances le long des microtubules, depuis des régions éloignées de l'apex jusqu'au SPK, puis sont transférées aux câbles d'actine depuis le SPK afin d'être délivrées à la membrane plasmique, avec laquelle elles fusionnent. Par ailleurs, l'actine F qui se trouve au cœur du SPK aurait pour rôle de réguler le flux de vésicules arrivant et sortant du SPK [63] [71] [29].

Le SPK a également été décrit comme responsable de la direction de croissance de l'hyphe chez *N. crassa*. Ce champignon a tendance à serpenter : ses hyphes s'allongent en formant de petites oscillations, mais la direction globale est rectiligne. Il a été observé que le SPK modifiait sa position le long de la paroi apicale avant même que l'hyphe n'ait commencé à modifier sa direction, indiquant ainsi le rôle du SPK dans l'orientation de croissance (figure 1.33 B) [109].

D'autre part, Wright *et al.* [110] ont utilisé une pince optique afin d'induire un déplacement du SPK chez *N. crassa*. Le principe de la méthode repose sur l'utilisation d'un faisceau laser très focalisé permettant de piéger et de manipuler des cellules, des organites, ou des structures comme le SPK en utilisant les forces générées lorsque la lumière interagit avec la matière. Le laser est orienté d'un côté du SPK, provoquant un déplacement de celui-ci dans la direction opposée, et en la modification de l'axe de croissance dans cette même direction (figure 1.34).

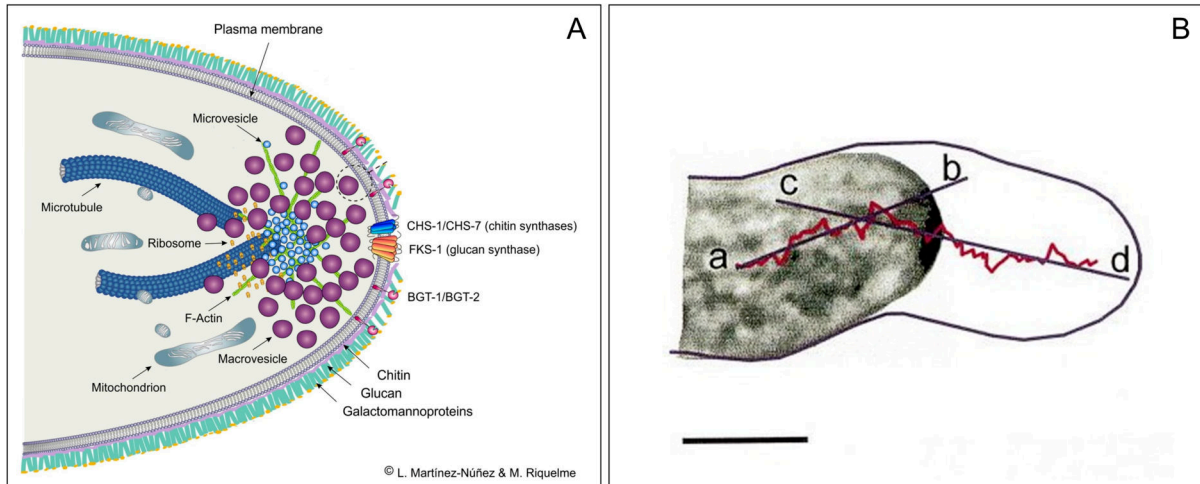


FIG. 1.33 – (A) Schéma de l'apex de *N. crassa*, où le SPK joue le rôle de pôle de transfert entre les microtubules et les microfilaments d'actine. Voir le texte pour les détails (adapté de [71]). (B) Chez *N. crassa*, la position du SPK est modifiée avant le changement de direction de l'apex (la position initiale est l'hyphé en gris, et sa position plus tardive est délimitée par la courbe noire). La ligne rouge représente la position du SPK (toutes les 2 s). Les droites de régression associées à la ligne rouge avant (a-b) et après (c-d) le changement de direction sont représentées. Barre d'échelle : 5 µm. [109]

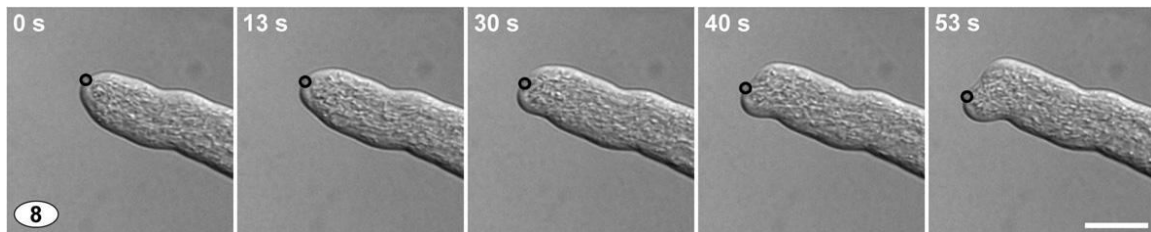


FIG. 1.34 – Le SPK est repoussé par un laser (cercle). Lorsque le laser est placé d'un côté du SPK, l'hyphé de *N. crassa* se réoriente en direction du côté opposé. Barre d'échelle : 10 µm. [110]

Modèle de croissance de l'apex

De nombreux modèles ont été proposés pour chercher à expliquer la croissance des hyphes par l'extrémité [4]. L'un d'entre eux a été largement repris par plusieurs auteurs et a évolué grâce aux nouvelles découvertes : le modèle du « vesicule supply center » (VSC) de Bartnicki-Garcia *et al.* [111]. Le VSC représente le SPK, à partir duquel du nouveau matériel est ajouté à la paroi existante, et qui se déplace avec l'avancée de l'apex en croissance. Le modèle s'appuie également sur l'existence de la pression de turgescence pour générer la force nécessaire à l'extension. Les vésicules sont distribuées radialement à partir du VSC dans toutes les directions, et externalisent leur contenu lorsqu'elles rencontrent la membrane plasmique. La forme de la paroi peut alors être décrite à chaque instant avec l'équation $y = x \cot\left(\frac{xV}{N}\right)$, où N est la quantité de vésicules libérées du SPK par unité de temps, V la vitesse d'avancement du VSC et \cot la fonction cotangente. La représentation graphique de cette équation est un tube de morphologie similaire à celui observé pour les filaments possédant un SPK, d'où son nom d'équation *hyphoïde* [4] [111].

À l'extrême pointe de l'apex, la chitine et les glucanes synthétisés sont incorporés à la paroi (voir section 1.2.5, p.31) [4] [79]. L'insertion des polysaccharides nécessite un assouplissement de la paroi, impliquant le maintien d'un équilibre entre absorption de nouveaux matériaux et déformation de la paroi existante [39]. Martínez-Núñez *et al.* [112] ont proposé une hypothèse selon laquelle la chitine et les glucanes seraient soumis à l'hydrolyse par des chitinases et des glucanases à l'apex, permettant d'assouplir la paroi. Par ailleurs, cette activité enzymatique génère des extrémités libres de polymères, qui sont susceptibles d'être réticulées entre elles afin de commencer à rigidifier la paroi au niveau de la zone sous-jacente à l'extrême pointe. Enfin, les régions un peu plus éloignées connaissent un processus de maturation, au cours duquel des matériaux supplémentaires sont ajoutés et réticulés avec les polymères existants, produisant alors une paroi plus épaisse, plus rigide et moins extensive (figure 1.35) [112] [98] [67].

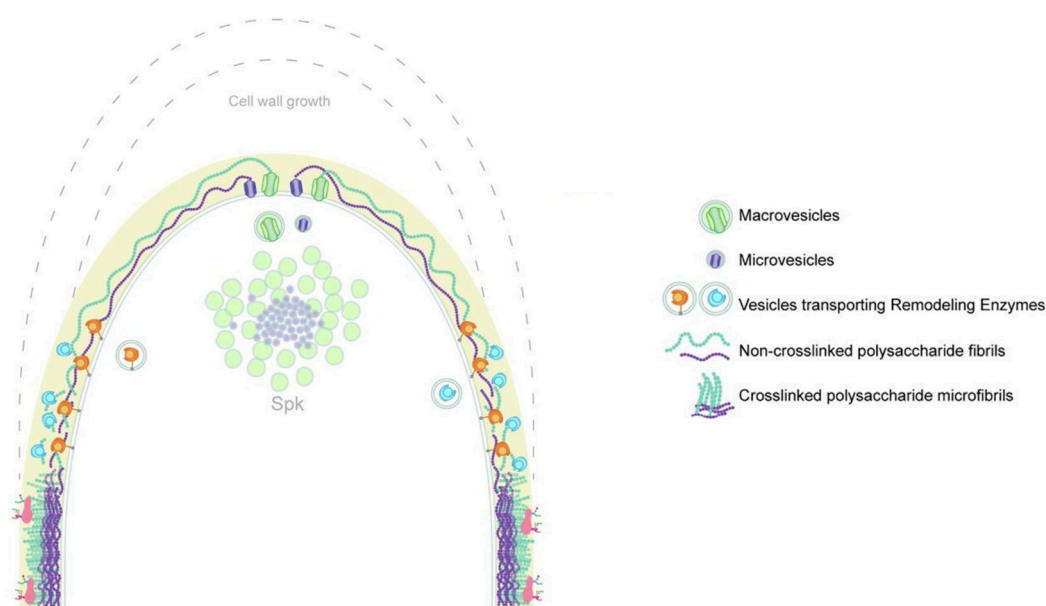


FIG. 1.35 – Modèle de croissance de l'apex. Les enzymes représentées en bleu et orange sont des chitinases et glucanases. Voir le texte pour les détails (adapté de [98]).

1.2.8 Exocytose

Sécrétion au niveau de l'extrémité apicale

Le mode de croissance polarisé des champignons filamenteux nécessite l'apport constant de matériel par des vésicules sécrétoires au niveau de l'apex, mais aussi des septa. Elles y déversent leur contenu en fusionnant avec la membrane plasmique : c'est l'exocytose (figure 1.36) [95] [71] [20] [19]. On notera que ce processus permet d'étendre la membrane apicale, mais aussi de libérer des cargaisons dans le milieu environnant, tels que des enzymes hydrolytiques permettant la digestion extracellulaire des nutriments (voir section 1.1.2, p.7) [113] [114].

La biogénèse et le transport des vésicules vers le SPK, puis vers la membrane plasmique restent encore mal compris. Une question encore ouverte concerne la voie métabolique qu'empruntent

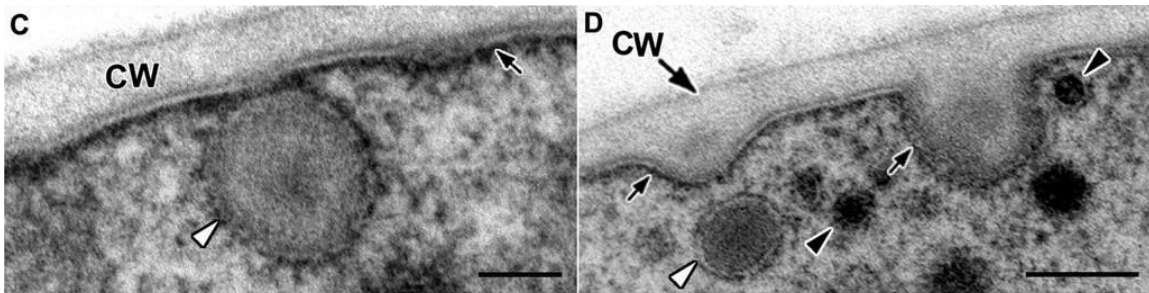


FIG. 1.36 – Exocytose de vésicules sécrétoires chez *N. crassa*. Les macrovésicules (têtes de flèches blanches) et les microvésicules (têtes de flèches noires) sont ancrées au niveau de la membrane plasmique (flèche noire) juste avant l'exocytose. CW : paroi cellulaire. Barres d'échelle : 40 nm à gauche, 100 nm à droite (adapté de [104]).

les vésicules sécrétoires. On suppose que la plupart suivent la voie classique de la sécrétion [98] [65] [29]. Au cours de celle-ci, les protéines et les lipides empaquetés dans les vésicules transitent à travers le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi, et rejoignent leur destination finale [114] [29].

Le RE est un réseau de tubes continus, constituant un point d'entrée pour les protéines nouvellement synthétisées lors de la traduction. Suite au repliement des protéines, elles sont extrudées du RE dans des vésicules et transportées vers l'appareil de Golgi, dans lequel elles sont à nouveau modifiées et triées, avant de se diriger vers leur destination finale [87] [114] [115] [71].

Vésicules sécrétoires

La formation de la vésicule sécrétoire, son transport, l'accostage et la fusion à la membrane cible nécessitent l'action coordonnée de protéines GTPases Rab (notamment Sec4 qui interagit avec la membrane) et des SNARE (« soluble NSF [N-ethylmaleimide-sensitive factor] attachment protein [SNAP] receptor »). Le t-SNARE, côté membrane cible, et le v-SNARE, côté vésicule, interagissent pour faciliter la fusion des membranes. La vésicule est par ailleurs également amarrée à la membrane grâce à l'exocyste, un complexe d'attachement octamérique (figure 1.37) [29] [98] [113].

Rôle du calcium

Enfin, il a été montré chez plusieurs champignons, dont *A. nidulans* et *N. crassa*, que l'apex ne s'étend pas de manière continue mais oscillatoire [40] [116]. Takeshita *et al.* [116] ont développé un modèle dans lequel le niveau intracellulaire de calcium Ca^{2+} varie de façon pulsée. Le calcium favorisant la fusion des vésicules sécrétoires avec la membrane plasmique, l'exocytose (et donc la croissance) intervient de façon oscillatoire à l'apex.

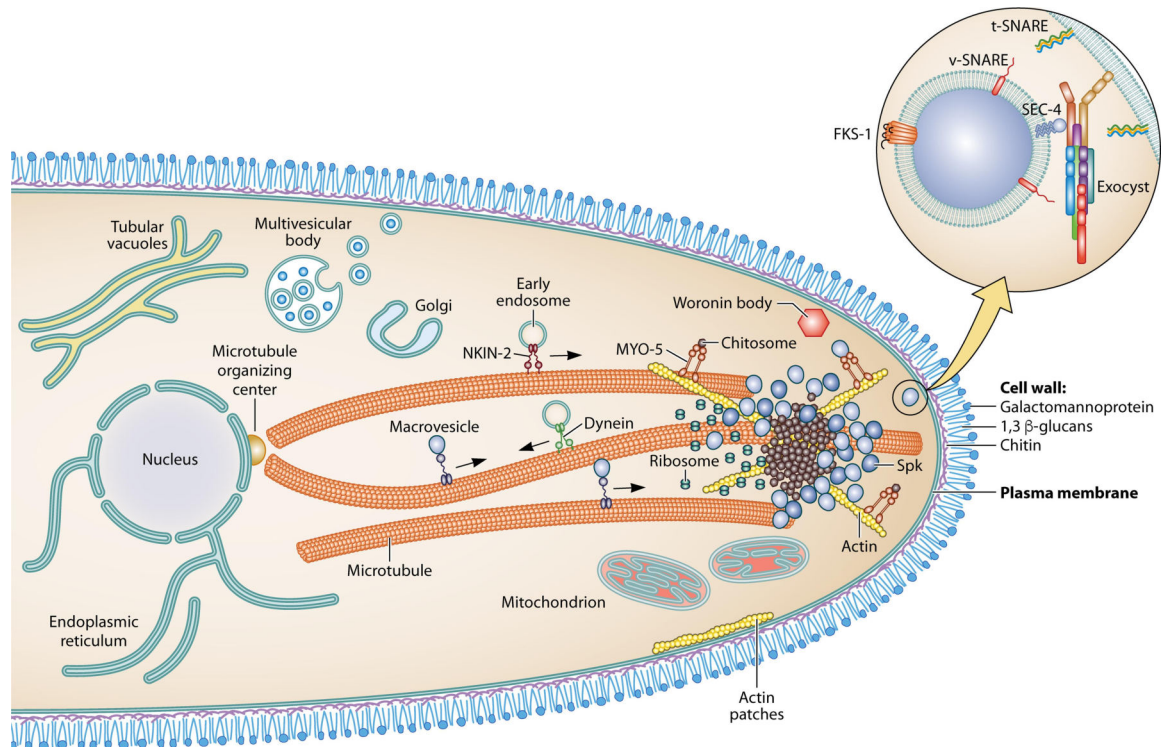


FIG. 1.37 – Schéma représentant le processus de croissance apicale, impliquant notamment le transport de vésicules sécrétoires en direction du SPK. Elles délivrent ensuite les précurseurs de la paroi par exocytose, avec notamment l'action des SNARE (voir le texte). NKIN2 appartient à la famille des kinésines, et MYO-5 des myosines [29].

1.2.9 Endocytose

Internalisation de la membrane plasmique

L'endocytose est un processus au cours duquel se produit une internalisation de la membrane plasmique, créant une vésicule qui peut être recyclée ou dégradée. L'endocytose est bien connue chez les cellules animales, et a longtemps été décrite comme absente chez les champignons, notamment à cause de la forte pression de turgescence des hyphes, qui rendrait difficile la déformation interne de la membrane.

Ce processus d'internalisation de la membrane plasmique a été reconnu, en complément de l'exocytose, comme essentiel à la croissance apicale depuis une vingtaine d'années [117] [113] [71] [104]. L'endocytose a lieu principalement sur une zone bien précise située juste en amont de l'apex, appelée le collier subapical (entre 1 et 5 µm comparativement au SPK chez *A. nidulans*). Il s'agit d'une région riche en patches d'actine (voir section 1.2.4, p. 25), qui entourent la vésicule en formation (figure 1.38). L'endocytose a également lieu au niveau des septa et des points de branchement [118] [29] [113].

Endosomes

Les endosomes précoces sont les structures vésiculaires qui prennent en charge les vésicules issues de l'endocytose au niveau de la membrane plasmique. Les endosomes se déplacent en

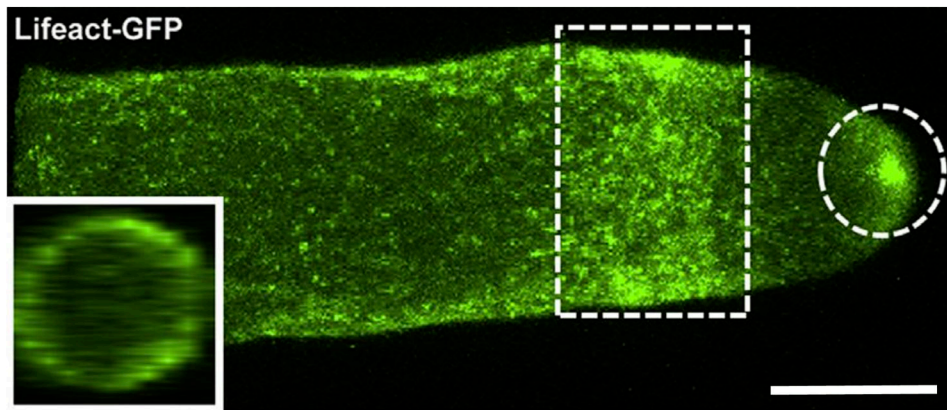


FIG. 1.38 – Hyphe de *N. crassa* marquée au colorant Lifeact-GFP, révélant l'actine. L'actine est présente au niveau du SPK (cercle) et du collier subapical (rectangle). La coupe transversale au milieu du collier subapical (encart) montre que les patches d'actine sont distribués uniformément sur la circonférence du collier. Barre d'échelle : 5 μm [119].

permanence le long des microtubules grâce aux kinésines-3 et aux dynéines, et transportent les vésicules d'endocytose vers l'appareil de Golgi. Celui-ci est ainsi une plateforme de croisement entre la voie d'exocytose et la voie d'endocytose. Les vésicules peuvent ensuite être renvoyées à la membrane plasmique pour recyclage, ou bien être dirigées vers les vacuoles pour dégradation [29] [114].

Rôle de l'endocytose

L'endocytose a été décrite comme permettant de retirer et de recycler la membrane apportée en excès à l'apex par le bombardement incessant des vésicules d'exocytose. La croissance repose ainsi sur un équilibre délicat entre exocytose pour étendre la paroi, et endocytose pour réguler la quantité de membrane plasmique. De plus, l'endocytose permet de recycler les précieux marqueurs de polarité (voir section 1.2.6, p.33) et les enzymes ancrées dans la membrane plasmique (voir section 1.2.5, p.31) qui sont déplacés vers la région subapicale lorsque l'extrémité s'étend [117] [29] [67] [118].

1.3 Méthodes d'observation du mycélium

La caractérisation d'une structure mycélienne est complexe, notamment du fait de sa croissance indéfinie. Les hyphes persistent en effet sur des durées potentiellement très longues, et donnent naissance à une structure rapidement complexe [2] [120].

Traditionnellement, les mycéliums sont décrits à l'échelle macroscopique par le biais de grandeurs peu adaptées telles que la masse ou le diamètre apparent du thalle. Celui-ci agrège l'espace colonisé par les hyphes avec les régions non occupées du fait de sa nature filamenteuse. De telles mesures ne reflètent pas la complexité réelle du mycélium, et ne permettent pas de

différencier avec précision la croissance de différentes espèces, notamment en début de croissance, lorsque le thalle est à peine visible à l'œil nu [121] [122].

Dans la littérature regroupant les travaux à l'échelle microscopique, on distingue une période allant jusqu'aux années 2010 environ, dans laquelle les études rapportent des relevés manuels sur les images du mycélium. Les contraintes techniques ne permettaient pas l'automatisation des relevés, comme l'extraction du nombre d'apex par exemple. L'imagerie s'appuie alors sur des techniques optiques en lumière blanche pour l'observation du thalle complet, et sur l'introduction de radionucléides pour l'exploration de l'espace intracellulaire [123]. Les études sont généralement localisées sur une région du mycélium, ou sur une image à un instant donné (voir par exemple [124] [51] [125] [126] [55] [127]).

Après l'introduction de l'observation en fluorescence et de l'imagerie numérique accompagnées de l'automatisation des processus d'acquisition et du traitement des images, une nouvelle période expérimentale s'est ouverte il y a une quinzaine d'années. De nombreux dispositifs ont été développés avec pour objectif l'extraction de grandeurs dynamiques caractéristiques du réseau à partir d'images du mycélium. L'architecture du réseau à l'échelle microscopique commence petit à petit à être considérée comme une caractéristique fonctionnelle, et la compréhension de la dynamique du thalle représente un enjeu actuel [42]. Les études sont alors menées à l'échelle de l'hyphes (voir par exemple [128] [129] [130]), ou à l'échelle du mycélium en deux dimensions ([131] [121] [122]), ou trois dimensions ([132] [133]). De plus, l'observation quantitative du mycélium sert de support au développement de la modélisation de réseaux fongiques (voir section 5.1, p.149) [132].

1.3.1 Dispositifs d'acquisition d'images

L'extraction de grandeurs caractérisant le réseau de manière fiable dépend en grande partie de la qualité des images du mycélium. L'observation des champignons dans leurs habitats naturels est souvent complexe dans la mesure où ils se développent généralement dans des environnements opaques, tels que le sol ou des tissus végétaux. La plupart des travaux sont ainsi initiés à partir de cultures en laboratoire, sur des milieux synthétiques et en conditions contrôlées. Certaines études sont cependant menées dans des conditions davantage fidèles à l'environnement réel du champignon, notamment dans le cas de mycéliums de grande taille tels que les décomposeurs de bois. Ces derniers peuvent être observés sur des microcosmes de sol, composés de terre tamisée, comprimée et non stérile, ou bien directement sur le terrain (figure 1.39) [52].

Observation de cultures sur milieu solide

La prise d'images en laboratoire est facilitée par l'utilisation de milieux de culture transparents et par un large choix de dispositifs optiques simples d'utilisation, tels qu'un microscope, une caméra ou un scanner [73]. L'observation non invasive du mycélium permet d'obtenir une collection d'images au cours du temps et ainsi de caractériser la dynamique de croissance [131].



FIG. 1.39 – À gauche, le basidiomycète *P. velutina* se développant sur la surface d'un sol comprimé (plateau de $24 \times 24 \text{ cm}^2$). La croissance s'effectue à partir d'un petit bloc de bois, et un bloc plus important constitue une source de nourriture. À droite, expériences menées sur *Clitocybe nebularis* dans son environnement naturel [52].

La restriction de la croissance mycélienne en deux dimensions facilite considérablement l'obtention et le traitement des images, et cette approche est fréquemment choisie dans les études [73]. La croissance plane peut être imposée par une très faible épaisseur de milieu de culture [121] ou bien en plaçant une membrane entre le milieu solide et le mycélium. Les membranes peuvent être de différentes natures ; la cellophane, le polycarbonate et la nitrocellulose sont parmi les plus utilisés [134] [135]. Certains dispositifs utilisant la microscopie confocale permettent d'observer l'évolution du mycélium en trois dimensions, offrant ainsi une représentation plus fidèle de la dynamique réelle du champignon [132] [73]. La tomographie à rayons X permet également d'observer le réseau en trois dimensions, en reconstruisant les volumes à partir d'une série de mesures effectuées depuis l'extérieur [133] [131].

La croissance mycélienne est généralement initiée en inoculant le milieu de culture avec un petit bloc de mycélium issu d'une culture antérieure [122] [132] [131] ou bien à l'aide d'une suspension de spores [135] [129]. Le choix du mode d'inoculation est important dans la mesure où il influe sur le développement du champignon. De fait, si la concentration initiale de spores est par exemple trop élevée, le mycélium aura très rapidement un aspect trop dense pour analyser correctement l'image. La plupart des études se limitent d'ailleurs à une observation sur les 72 premières heures de croissance, car si les hyphes à la périphérie du thalle restent souvent facilement distinguables les uns des autres, le centre du mycélium est quant à lui rapidement trop dense. De plus, des hyphes aériennes apparaissent et la mise au point sur le mycélium plan ne permet pas de les analyser [73].

Cependant, dans le cas d'espèces à croissance très lente, comme les basidiomycètes lignivores, l'expérience peut être menée sur des durées bien plus longues. Par exemple, Boddy *et al.* [24]

ont quantifié les réponses du réseau mycélien du basidiomycète *P. velutina* face à des attaques de collemboles (arthropodes) sur 7,5 mois, en culture sur un sol non stérile de $57 \times 57 \text{ cm}^2$. Cette croissance dans des conditions nutritives réelles et sur une longue durée a été analysée afin de mieux appréhender la capacité de résilience du réseau par le biais de la réallocation de la biomasse.

Enfin, un enjeu majeur de l'observation du mycélium réside dans la capacité à obtenir des images du réseau complet, tout en conservant une résolution suffisante pour analyser la dynamique des hyphes individuelles à l'échelle microscopique. Celles-ci possèdent en effet des diamètres de quelques micromètres, tandis que le mycélium s'étend rapidement sur des surfaces de plusieurs centimètres. Afin de concilier les deux échelles, des images en haute résolution peuvent être enregistrées sur des portions successives du mycélium, avant de les assembler pour obtenir une image du réseau complet [73] [134] [42].

Cas particulier de la microfluidique

Afin de répondre à l'enjeu d'une meilleure compréhension des dynamiques du réseau fongique, les puces microfluidiques se présentent comme des outils émergents très prometteurs, notamment dans les domaines de la médecine et des biotechnologies. Ces dispositifs s'appuient sur la manipulation de petites quantités de liquide en circulation dans un réseau de canaux de taille microscopique, dans des conditions contrôlées de température, de lumière et de débit. Les environnements microstructurés sont préalablement définis par le manipulateur, qui les construit à partir de polydiméthylsiloxane (PDMS), un matériau inerte et transparent. La conception de la puce microfluidique combine design informatique, lithographie et liaison par plasma [136] [52]. En 2011, Held *et al.* [137] ont proposé des travaux pionniers en étudiant les stratégies d'exploration de *N. crassa* dans une structure microfluidique en trois dimensions, très différente de la surface homogène plane des milieux sur boîte de Petri.

De tels dispositifs microfluidiques sont communément utilisés pour l'étude de bactéries, de cellules végétales ou humaines (sang, cellules souches). Depuis une quinzaine d'années, l'approche microfluidique se développe spécifiquement pour les champignons, mais reste encore relativement rare. La manipulation microfluidique présente l'avantage de pouvoir isoler les hyphes les unes des autres, et de surveiller en temps réel les croissances individuelles ainsi que les « prises de décisions » avec une précision microscopique (figure 1.39). Par ailleurs, le motif de la puce permet de mimer les habitats des champignons, tels que le sol ou des végétaux, mais aussi de modifier facilement et rapidement les conditions de croissance [136] [52] [138]. À titre d'exemple, les travaux récents de Aleklett *et al.* [139] s'intéressent à étudier le comportement exploratoire des hyphes dans le labyrinthe formé par les pores du sol. Les hyphes de sept champignons basidiomycètes ont pour cela été observées sur une puce microfluidique qui reproduit les pores du sol et son hétérogénéité spatiale (« Soil Chip »). La durée d'observation de 70 jours a permis d'extraire les vitesses de croissance, la longueur parcourue et les longueurs entre les branchements.

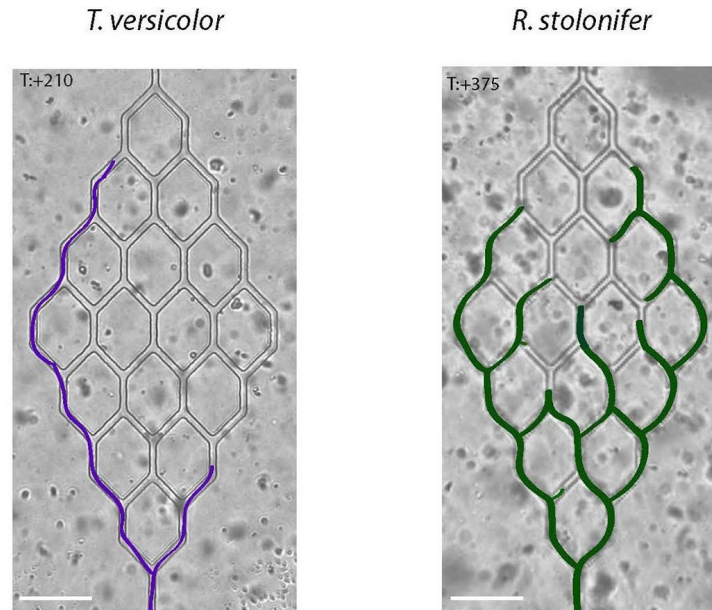


FIG. 1.40 – Exemple de dispositif microfluidique. Les hyphes des champignons *Trametes versicolor* et *Rhizopus stolonifer* sont contraintes dans un labyrinthe en « nid d'abeille ». Les stratégies de croissance adoptées par les deux espèces à l'intérieur du labyrinthe sont différentes. Barre d'échelle : 100 μm . [140]

1.3.2 Traitement des images et extraction de grandeurs caractéristiques du mycélium

Procédure de traitement d'images communément employée

Les images du mycélium sont ensuite analysées afin d'en extraire certaines grandeurs caractéristiques. Initialement, les images étaient traitées à la main, limitant ainsi la quantité de mesures effectuées. En 1974 par exemple, Trinci *et al.* [141] ont étudié le mycélium de plusieurs champignons filamenteux à partir de mesures réalisées sur des images imprimées agrandies. En 1988, la procédure est facilitée par les travaux de Adams *et al.* [142], proposant une analyse d'images semi-automatique pour la mesure des longueurs entre les points de branchements par exemple. De nombreux outils spécifiques de la structure filamenteuse se sont depuis développés, améliorant considérablement l'accès à la dynamique de croissance de mycéliums variés [122] [121].

La première étape du traitement d'images consiste généralement à les binariser par une opération de seuillage, facilitée sur des images très contrastées. Pour cela, l'usage de la fluorescence est une option intéressante puisqu'elle permet la visualisation d'un mycélium brillant sur un fond noir [121] [132]. Suite à cette opération, les impuretés éventuellement présentes sur le fond de l'image sont éliminées, et la structure mycélienne seule est isolée (figure 1.41). Le traitement peut être poursuivi par une étape de squelettisation (« skeletonization »), au cours de laquelle chaque filament est réduit à une épaisseur d'un pixel [129].

La deuxième étape est l'extraction d'un graphe à partir de la structure mycélienne, qui représente une collection d'objets (les vertex), ainsi que les relations qui les lient (les arêtes) (figure 1.41). Chaque vertex possède un degré en fonction du nombre de relations qui le lient à

ses voisins. Le graphe permet ainsi d'obtenir des grandeurs simples caractéristiques du réseau, telles que la longueur totale du mycélium ou le nombre de vertex en fonction de leur degré [131] [122]. Par ailleurs, le graphe peut être complexifié en conférant aux arêtes un poids relatif à l'épaisseur de l'hyphe, notamment pour les espèces capables de développer des cordons mycéliens (voir section 1.1.3, p. 13, figure 1.41) [73] [42].

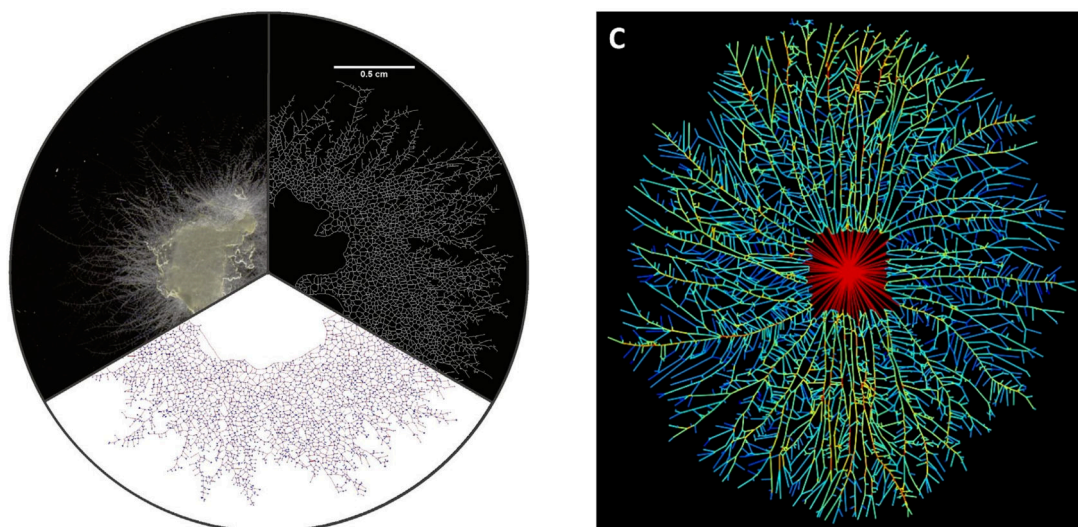


FIG. 1.41 – À gauche, le mycélium de *R. solani* après 25 h de croissance *in vitro* (tiers gauche), sous représentation binarisée (tiers droite), et le graphe correspondant (tiers bas). À droite, le graphe extrait à partir du mycélium de *Phallus impudicus* en culture sur un sol compressé. Les nœuds sont connectés par des segments colorés selon l'épaisseur du cordon mycélien, entre 50 μm (bleu) et 500 μm (rouge) [73].

Exemples d'analyses d'images

Vidal-Diez de Ulzurrun *et al.* [121] ont développé le logiciel « Fungal Feature Tracker » (FFT) permettant d'analyser une collection d'images de mycélium en croissance en deux dimensions, et d'en extraire la longueur totale des hyphes, le nombre d'apex et l'aire couverte par le mycélium (enveloppe convexe). Le logiciel propose également de quantifier le nombre de spores présentes sur l'image, et fournit la morphologie de chacune, en indiquant notamment leurs longueurs et leurs circularités. Cet outil fonctionne à partir d'images issues de dispositifs variés. L'extraction des informations sur le réseau est basée sur la procédure décrite ci-dessus (figure 1.42).

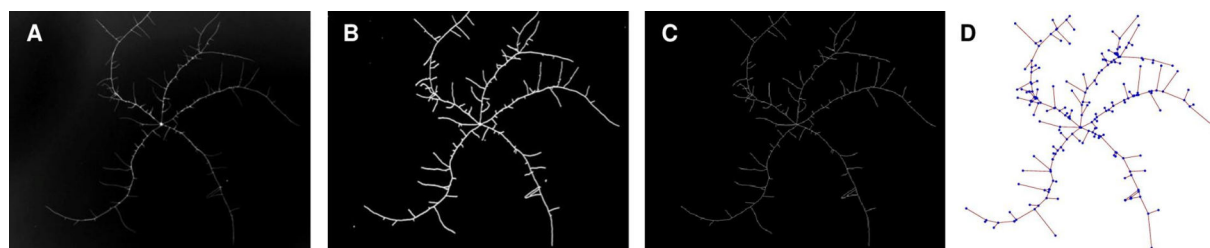


FIG. 1.42 – Étapes de traitement d'images avec le logiciel FFT. (A) Image originale du mycélium de *Arthrobotrys oligospora*. (B) Image binarisée. (C) Réseau squelettisé. (D) Graphe mathématique associé, avec les nœuds en bleu, et les hyphes (segments) en rouge [121].

Du *et al.* [132] ont observé le développement du champignon basidiomycète *Postia placenta*, un décomposeur de bois très commun. Cette étude est parmi les rares à combiner une approche spatiale et temporelle de grande envergure. En effet, la croissance du mycélium a été suivie par microscopie confocale et en fluorescence en trois dimensions, sur une période de 17 jours. Grâce à une projection du réseau en deux dimensions, les auteurs ont notamment quantifié la vitesse des apex, les angles de branchement, et les longueurs séparant deux sites de branchement (figure 1.43). Des travaux postérieurs de modélisation du réseau de *P. placenta* se sont par ailleurs appuyés sur la dynamique de croissance extraite grâce à ce dispositif [143] [144].

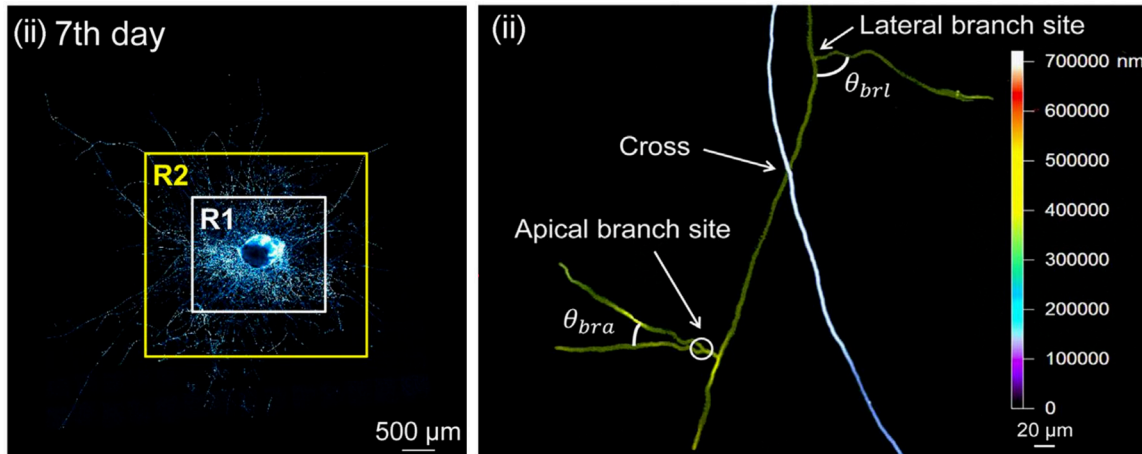


FIG. 1.43 – À gauche, image en fluorescence du mycélium de *P. placenta* après 7 jours de croissance. Les régions R1 et R2 permettent de séparer les hyphes récentes des anciennes. À droite, la profondeur selon l'axe z est associée à une couleur, l'analyse étant effectuée en trois dimensions. Les angles θ_{bra} et θ_{brl} formés par des branchement apicaux et latéraux respectivement sont définis (adapté de [132]).

1.3.3 Analyse du mycélium dans un contexte industriel

Les champignons sont massivement exploités dans le domaine des biotechnologies : ils sont cultivés en conditions contrôlées afin d'extraire des produits qui seront commercialisés. La morphologie du mycélium étant étroitement liée au rendement pour une certaine molécule d'intérêt, la caractérisation du thalle représente un enjeu majeur dans plusieurs domaines industriels. De plus, dans une perspective de productivité optimale, il est intéressant de cerner les paramètres de culture qui favorisent la croissance du mycélium [122] [4] [134].

Rôle des champignons filamenteux dans l'industrie

Les cultures de champignons en bioréacteurs produisent des composés très variés : acides organiques, antibiotiques et autres médicaments, protéines et enzymes, vitamines, lipides, ou encore produits chimiques [25] [3]. L'acide citrique, très utile dans le secteur agroalimentaire, est par exemple efficacement produit par *A. niger* depuis une centaine d'années [3]. Différentes espèces appartenant au genre *Penicillium* sont d'une grande importance économique du fait de leur utilisation pour la production de pénicilline (*P. chrysogenum*), ou de fromages (*P. roqueforti*, *P. camemberti*) [25].

Par ailleurs, les champignons sont de plus en plus considérés pour leur efficacité dans la dégradation de polluants environnementaux dans les sols et les effluents liquides, tels que les eaux usées et les surfaces contaminées par des pesticides. L'avantage de ces organismes réside dans le fait qu'ils minéralisent totalement le polluant, et les constituants chimiques sont alors renvoyés dans l'atmosphère et le sol sous forme de CO₂, d'ammonium, de chlorures et d'eau [4] [25]. Certaines espèces du genre *Aspergillus* et *Trichoderma* sont employées pour la biodétérioration de polymères synthétiques comme le plastique [3]. D'autre part, les résidus agricoles et forestiers constituent une biomasse abondante que les champignons peuvent dégrader pour la production de biocarburants notamment [3].

Enfin, les champignons offrent des propriétés prometteuses dans la production de biomatériaux, notamment pour les emballages et l'isolation thermique et acoustique. Les parois des hyphes sont en effet structurées par des chaînes de chitine et de glucanes (voir section 1.2.5, p.31), des polymères parmi les plus résistants des tissus organiques. Les matériaux obtenus à partir de mycélium sont à la fois flexibles et résistants, et peuvent être facilement dégradés dans la nature [3].

Morphologies en pelote et mycélium dispersé

La culture liquide en bioréacteur est devenue le mode dominant en bio-industrie au cours du XX^e siècle, notamment du fait du gain de place et du contrôle des paramètres précis en regard des cultures solides. Au cours de ce type de cultures liquides et agitées, le mycélium peut adopter toute une collection de morphologies très différentes, allant de la forme mycélium dispersé, ou libre, jusqu'aux agrégats d'hyphes, appelés pelotes (« pellets ») et pouvant atteindre plusieurs millimètres de diamètre (figure 1.44). La morphologie adoptée par le microorganisme résulte d'un processus combinatoire alliant le génotype du champignon, le mode de culture (bioréacteur fermé ou continu) et les paramètres de culture tels que l'agitation mécanique, la concentration initiale en spores, la température, le pH, ou encore la composition du milieu [128] [134] [145].

Il a été observé que la forme qu'adopte le mycélium est directement liée à sa productivité pour un composé en particulier. Par exemple, la production de la molécule GFP (« green fluorescent protein ») chez *A. niger* est favorisée par de petites pelotes, et la pénicilline est quant à elle extraite majoritairement lorsque *P. chrysogenum* est sous forme de mycélium libre. Généralement, la sécrétion au sein des pelotes s'atténue rapidement à cause de limitations diffusionnelles en dioxygène et en nutriments au cœur de l'agrégat. Seule la couronne extérieure de la structure reste active et assure la croissance [128] [134] [133].

Dans ce contexte de recherche de productivité accrue, la compréhension du rôle des facteurs extérieurs sur la morphologie du mycélium joue un rôle clé pour l'optimisation des processus de fermentation. La quantification précise et rapide des formes mycéliennes complexes en croissance dans les bioréacteurs représente un enjeu pour les industriels [134].

Cairns *et al.* [145] ont par exemple développé le système d'analyse d'image automatisé « Morphology of pelleted and dispersed growth », permettant de quantifier l'hétérogénéité des

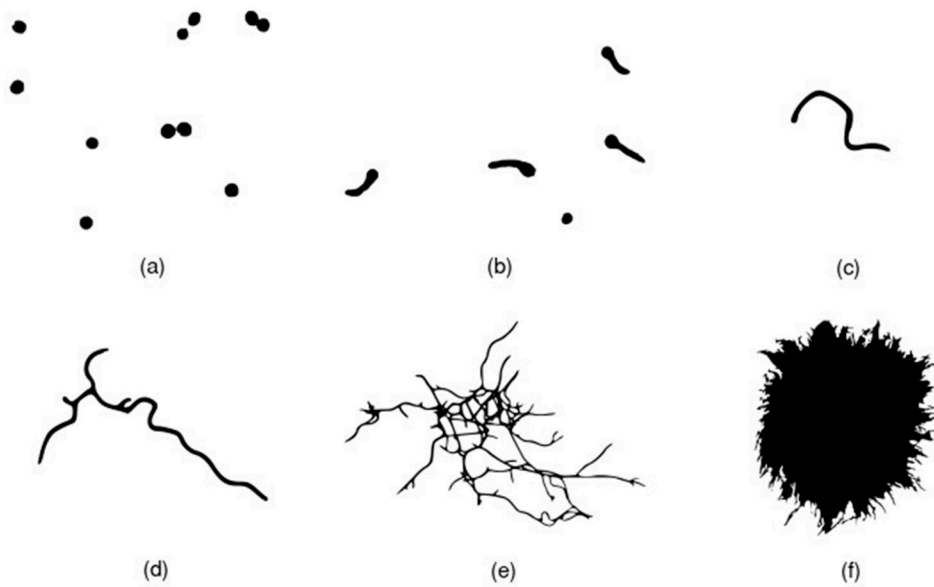


FIG. 1.44 – Différentes morphologies fongiques rencontrées en bioréacteur. (a) spores (diamètres généralement inférieurs à $10\ \mu\text{m}$), (b) tubes germinatifs, (c) et (d) hyphes, (e) mycélium, (f) pelote (jusqu'à plusieurs millimètres de diamètre) (adapté de [134]).

cultures liquides entre formes pelotes et formes libres. Des paramètres sont également générés pour caractériser chaque structure individuelle (diamètre, aire, rapport de forme).

Schmideder *et al.* [133] se sont intéressés à la diffusion de substances au sein des pelotes d'*A. niger*, par le biais d'une observation tomographique à rayons X des pelotes lyophilisées. La tortuosité de la structure ainsi qu'un facteur de diffusion ont pu être déduits grâce à ces travaux.

1.4 Modèle d'étude et travaux antérieurs menés au laboratoire

Nous nous intéressons à présent au dispositif expérimental développé dans notre laboratoire pour étudier la structure et la dynamique du réseau mycélien du champignon filamentueux *Podospora anserina*.

1.4.1 Le champignon modèle *Podospora anserina*

Présentation de l'espèce

Notre organisme d'étude est le champignon *Podospora anserina* (figure 1.45). Moins célèbre que les espèces *N. crassa*, *A. nidulans*, ou *Magnaporthe grisea*, il s'agit néanmoins d'un modèle d'étude de laboratoire depuis plus d'un siècle, utilisé comme support à la compréhension de processus biologiques variés, tels que la germination des spores, la formation des sporophores,

ou la reproduction sexuée [10].

P. anserina est un ascomycète, appartenant à la classe des *Sordariomycetes* et à l'ordre des *Sordariales*, tout comme *N. crassa*. Les spores sexuées des ascomycètes sont produites dans des structures assimilables à des sacs appelées asques (« askos » signifie « sac » en grec), et sont de ce fait nommées « ascospores » [4] [10].

P. anserina est un champignon saprotrophe coprophile, capable d'utiliser de la matière végétale morte comme source de carbone et d'énergie. Il se développe favorablement sur des crottes d'animaux herbivores très variés, et plus rarement dans le sol. En général, les ascospores de *P. anserina* sont présentes sur des plantes ingérées par les animaux. En passant dans leur tube digestif, elles reçoivent le signal induisant la germination, et peuvent ensuite développer un mycélium une fois à l'extérieur.

La croissance végétative de *P. anserina* est limitée par la sénescence. Ce processus se manifeste par la mort des cellules apicales et un arrêt définitif de la croissance [10].

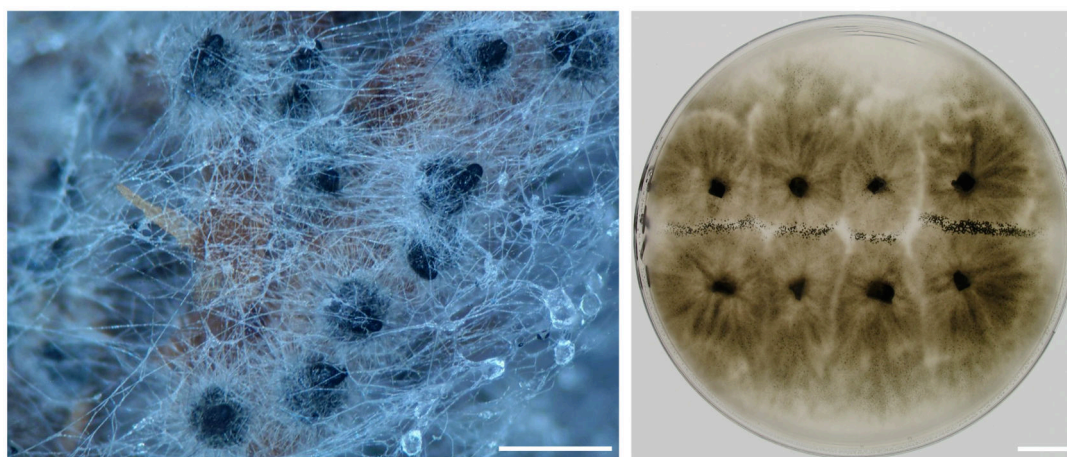


FIG. 1.45 – À gauche, *P. anserina* en croissance dans son environnement naturel. Les hyphes aériennes et les périthèces sont facilement identifiables (barre d'échelle : 0,5 mm). À droite, huit thalles de *P. anserina* en culture sur une boîte de Petri en conditions standards de laboratoire (les surfaces noires au centre des thalles sont les inocula). Les périthèces sont visibles à la frontière entre les quatre thalles supérieurs et inférieurs (barre d'échelle : 1 cm). [10]

Cycle de vie

Il existe chez *P. anserina* des thalles de type sexuel *mat +*, *mat -*, ou *mat +/mat -*. Cet organisme est hermaphrodite : chaque mycélium différencie à la fois des structures de reproduction femelle (les ascogones) et mâle (les spermaties) (figure 1.46). La reproduction sexuée ne peut avoir lieu qu'en présence des deux types sexuels, c'est-à-dire uniquement entre les ascogones et les spermaties provenant chacun d'un type sexuel opposé. *P. anserina* ne produit pas de spores asexuées.

La fécondation initie le développement de l'ascogone qui devient un sporophore. C'est à l'intérieur de ce dernier, appelé périthèce notamment chez *P. anserina* (figure 1.47), que vont s'effectuer les différentes étapes conduisant à la formation des asques. Ceux-ci contiennent

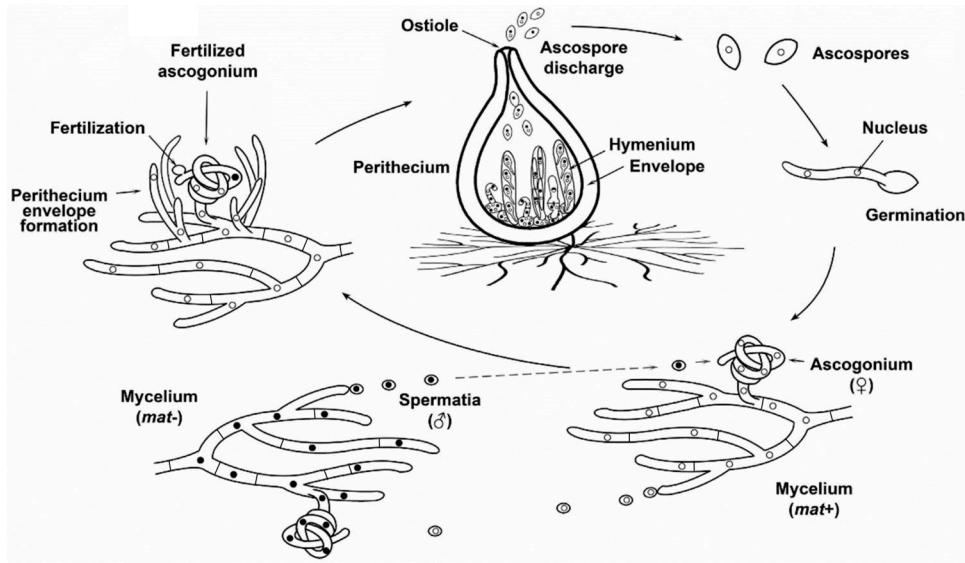


FIG. 1.46 – Cycle de vie de *P. anserina*. Voir le texte pour les détails (adapté de [146]).

généralement quatre ascospores, liées entre elles par un filament d'actine. Elles seront donc éjectées simultanément une fois le périthèce mature (figure 1.48) [10].

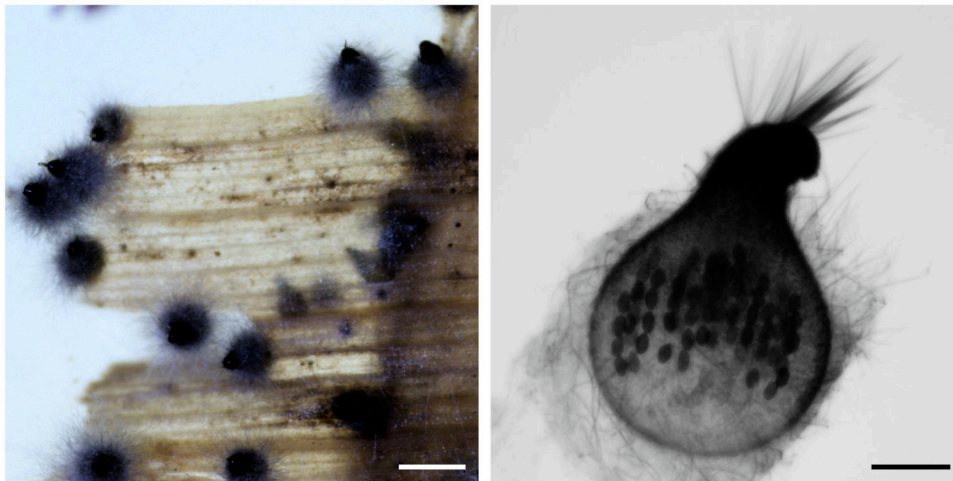


FIG. 1.47 – À gauche, *P. anserina* en croissance sur *Guibourtia demeusei* (copeaux). Les périthèces sont facilement visibles (structures noires). Barre d'échelle : 300 μm . À droite, un périthèce de *P. anserina*, en forme caractéristique de poire. Les ascospores sont visibles à l'intérieur de la structure. Barre d'échelle : 100 μm [10].

Les quatre ascospores d'un même asque de *P. anserina* portent généralement chacune des noyaux des deux types sexuels *mat+* et *mat-*, et développent donc un mycélium autofertile. Mais dans environ 1% des cas, l'asque renferme trois ascospores avec des noyaux des deux types sexuels, et deux ascospores de taille légèrement inférieure avec des noyaux d'un seul type sexuel (figure 1.48). Le mycélium issu de celles-ci sera donc autostérile. *P. anserina* est une espèce pseudo-homothallique : la plupart des ascospores produisent un thalle autofertile (homothallisme), pour lequel la reproduction sexuée peut avoir lieu grâce à la présence de deux

noyaux sexuellement compatibles (hétérothallisme) [10] [12].

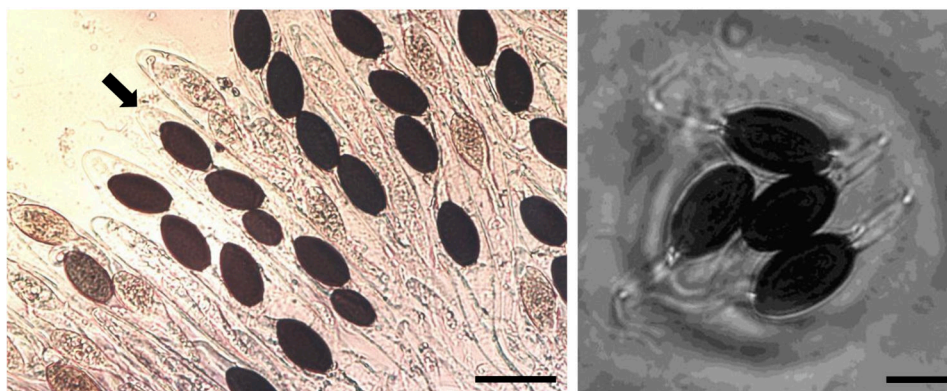


FIG. 1.48 – À gauche, des asques de *P. anserina*, contenant généralement quatre ascospores alignées. Certains asques en contiennent davantage, et un exemple avec cinq ascospores est indiqué (flèche) : trois « grosses ascospores » et deux « petites ascospores » (barre d'échelle : 50 μm). À droite, quatre ascospores issues d'un même asque, après éjection du périthèce mature (barre d'échelle : 20 μm) [10].

À l'issue de mitoses successives, une ascospore mature contient environ 30 noyaux, et est protégée par une couche de mélanine sur la paroi. La germination se produit au niveau du pore de germination, situé à une extrémité de l'ascospore ovale [10].

Un organisme modèle

P. anserina constitue une excellente espèce modèle pour mener des études en laboratoire. Ce champignon non pathogène se cultive facilement sur un milieu synthétique à base de dextrine (un polysaccharide issu de l'hydrolyse de l'amidon), à 27°C et 70-80 % d'humidité. Dans de telles conditions favorables, sa croissance est d'environ 7 mm.j⁻¹. Son cycle de vie est rapide, puisque 7 jours suffisent entre la germination et la production d'une nouvelle génération d'ascospores. Par ailleurs, son génome, réparti sur sept chromosomes et un chromosome mitochondrial, est entièrement séquencé et annoté [147]. De nombreux outils cytologiques et la construction de mutants sont maîtrisés au laboratoire.

1.4.2 Dispositif d'observation du mycélium de *P. anserina* préexistant au laboratoire et premiers travaux

Dans l'optique d'analyser la dynamique de croissance du champignon *P. anserina*, un dispositif d'acquisition d'images du mycélium en croissance dans des conditions contrôlées a été mis au point au laboratoire, avant mon arrivée. Une procédure de traitement des images a également été développée, comme nous le détaillerons ensuite. Le dispositif expérimental permet d'observer le réseau d'hyphes en croissance en deux dimensions pendant environ 24 heures, grâce à l'acquisition d'images successives du thalle complet, avec une période de 20 minutes environ. La haute résolution des images donne accès à la dynamique des hyphes individuelles.

La mise au point de l'expérience et l'analyse des images a réuni au sein du laboratoire les compétences de biologistes et de physiciens. Ces travaux ont par ailleurs impliqué des

mathématiciens (notamment Yves D'Angelo, LJAD, Université Côte d'Azur et Amandine Véber, MAP5, Université Paris Cité et École polytechnique), intéressés par la caractérisation de la dynamique d'expansion du mycélium pour le développement de modèles mathématiques de ce réseau. Dans le cadre de ce projet interdisciplinaire, un article a été publié à partir de travaux réalisés avant mon arrivée au laboratoire : « Hyphal network whole field imaging allows for accurate estimation of anastomosis rates and branching dynamics of the filamentous fungus *Podospora anserina* » [148]. Nous présenterons dans cette partie les éléments clés développés dans cet article.

Dispositif expérimental

Le dispositif d'acquisition d'images (figure 1.49) a été élaboré et construit au laboratoire, notamment avec l'aide de Frédéric Filaine (ingénieur d'études au laboratoire). Il est présenté succinctement dans ce paragraphe ; une description détaillée du matériel est donnée dans la section 2, p.61.

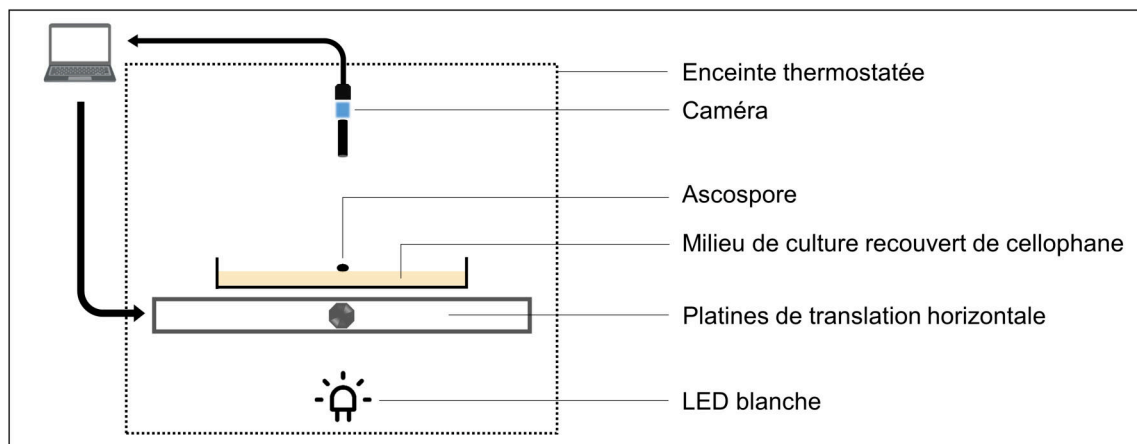


FIG. 1.49 – Dispositif d'acquisition d'images du mycélium en croissance.

Dans notre expérience, une ascospore est placée sur une boîte de Petri avec un milieu de culture solide, immédiatement après sa germination. Contrairement à des systèmes d'observation où un petit échantillon de mycélium est prélevé sur une culture ([131] par exemple), le recours à l'ascospore présente l'avantage de pouvoir initier plusieurs expériences avec des objets biologiques similaires et dans le même état physiologique. De plus, l'image acquise peut être analysée dans son intégralité, alors que l'inoculum de mycélium doit être délimité et exclu de l'analyse.

La croissance du mycélium qui se développe suite à la germination de l'ascospore est guidée en deux dimensions du fait de la présence d'une membrane de cellophane entre le milieu de culture et l'échantillon biologique. Les hyphes ont cependant accès aux nutriments du milieu de culture qui peuvent traverser la feuille de cellophane.

Une LED blanche située au-dessous de l'échantillon permet l'acquisition des images du mycélium en champ clair, à l'aide d'une caméra équipée d'un objectif (grossissement $\times 4$). Après

quelques heures de croissance, l'acquisition d'une seule image (appelée *tuile*) ne couvre pas la surface complète du mycélium. Afin d'obtenir une visualisation de la totalité du réseau (appelée *panorama*), la boîte de Petri peut être déplacée sous la caméra grâce aux platines de translation horizontale sur lesquelles elle repose. Le déplacement des platines et l'acquisition des images sont entièrement automatisés. Tout le dispositif est placé dans une enceinte thermostatée à 27°C pour les expériences en conditions de culture standards.

On notera que si les travaux présentés dans l'article [148] sont issus d'expériences en conditions standards, le dispositif présente l'avantage de pouvoir être adapté en fonction de la condition de culture choisie. Les paramètres de température ou d'éclairage peuvent par exemple être modulés, comme nous l'évoquerons dans les sections 2 et 3.

Traitement des images

L'assemblage de 108 tuiles (9×12) fournit un panorama, c'est-à-dire une image de la totalité du mycélium de dimensions $1 \times 1 \text{ cm}^2$ environ. Les panoramas sont enregistrés avec une période de 17 minutes. Une expérience est menée sur une vingtaine d'heures, et regroupe ainsi environ 80 panoramas successifs. Un exemple de trois panoramas issus d'une collection d'images temporelles est présenté sur la figure 1.50. La figure 1.51 est une image du thalle à l'échelle macroscopique à la fin de l'expérience.

La fin de l'acquisition est déterminée par le moment où les hyphes croissent en dehors de la surface du panorama. Les dimensions de celui-ci sont choisies de telle sorte que globalement, la détection des hyphes individuelles soit possible à la fin de l'acquisition. Au-delà, le mycélium devient localement très dense et les hyphes ne sont plus différenciables les unes des autres.

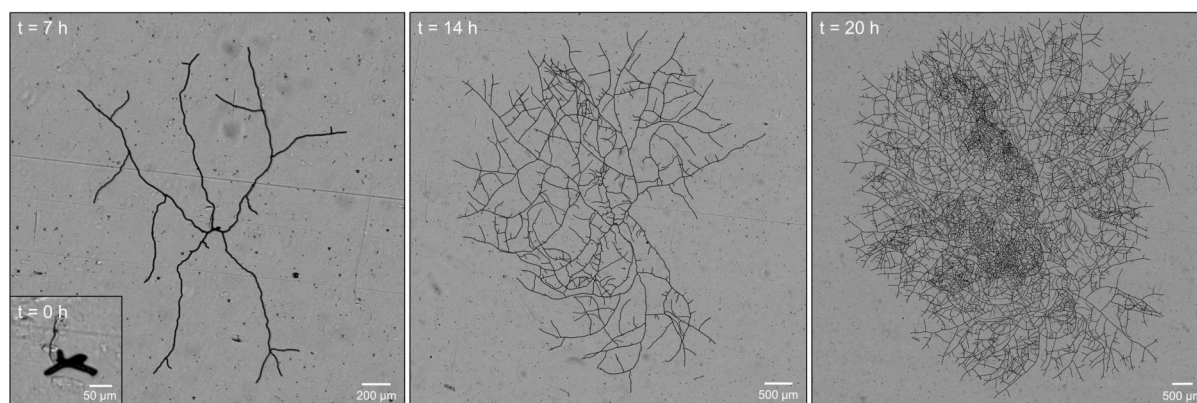


FIG. 1.50 – Panoramas du mycélium de *P. anserina*, issus d'une collection d'images pour une expérience en conditions standards. La durée de croissance est indiquée sur chacun. L'ascospore germée (encart) constitue le point de départ de l'expérience. Chaque panorama a les mêmes dimensions (108 tuiles assemblées, $1 \times 1 \text{ cm}^2$ environ). Les images à $t=0$, $t=7$ et $t=14$ h ont été rognées.

La collection temporelle de panoramas en niveaux de gris est ensuite binarisée, afin de s'affranchir des impuretés présentes sur le milieu de culture et de récupérer la structure mycélienne uniquement. Le réseau squelettisé peut alors être extrait, réduisant l'épaisseur des hyphes à 1 px. Enfin, l'étape de vectorisation permet d'extraire un graphe à partir du squelette

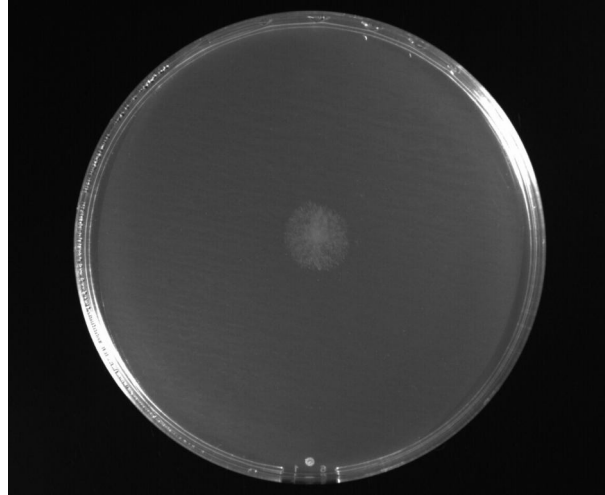


FIG. 1.51 – Mycélium en observation macroscopique après 24 h de croissance sur cellophane en conditions standards.

mycélien par une méthode de triangulation. Le degré de chaque vertex (les composants du graphe) est identifié, en limitant le degré maximum à 3. Les vertex de degré 1, ayant une unique connexion au réseau, sont les apex. Les hyphes sont constituées des vertex de degré 2. Les vertex de degré 3 possèdent trois connexions au réseau, et représentent les points de branchement, mais aussi les anastomoses. Le processus de vectorisation est fiable, comme montré sur la figure 1.52.

L'identification des différents vertex donne accès à trois grandeurs : le nombre d'apex A (vertex de degré 1), le nombre de nœuds géométriques N^g (vertex de degré 3), et la longueur totale du mycélium L (estimée à partir des nœuds de degré 2). La vectorisation de chaque panorama permet d'obtenir les évolutions temporelles de ces trois grandeurs.

La longueur du mycélium L est sous-estimée, étant donnée qu'elle est issue de la somme de distances euclidiennes L_l entre deux vertex de degré 2 : $L = \sum_{l=1}^{n_e} L_l$, avec n_e le nombre de vertex de degré 2. Plus la valeur de n_e est élevée, meilleure sera l'approximation de L . Il a ici été choisi une valeur de n_e telle que la longueur L varie d'au maximum 0,1% par rapport à la valeur de L calculée avec $n_e + 1$.

Par ailleurs, une difficulté relative aux vertex de degré 3 se pose, dans la mesure où les points de branchement et les anastomoses (« nœuds biologiques » N) ne sont pas dissociés des chevauchements d'une hyphe sur une autre [73]. L'ensemble des vertex de degré 3 identifiés sont désignés comme des « nœuds géométriques » N^g , parmi lesquels se trouve la population N . Les vertex de degré 4 ne pouvant pas être identifiés par l'algorithme, les chevauchements sont détectés comme deux vertex de degré 3 très proches. Afin d'estimer la proportion de nœuds N , les vertex de degré 3 proches l'un de l'autre sont exclus (en fixant la distance n qui les sépare), et on obtient le nombre de nœuds restants N_n^g . En faisant varier n entre 5 et 50 px (soit environ d'un demi-diamètre à cinq diamètres d'hyphes), le nombre de nœuds biologiques N parmi N^g est estimé à 80%.

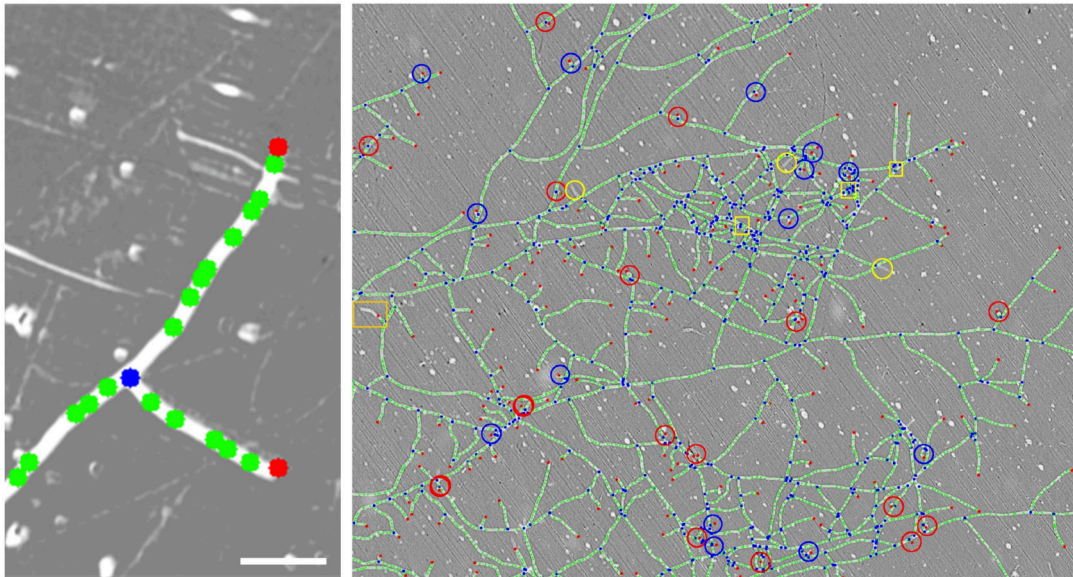


FIG. 1.52 – Résultat de la vectorisation, superposé à l'image du mycélium. Les points rouges sont les apex, les points bleus les nœuds connectant trois branches et les hyphes sont constituées par les segments connectant les points verts. À gauche, superposition au niveau d'un branchement (barre d'échelle : 50 μm). À droite, les cercles indiquent les apex ambigus, qui sont identifiés comme réels (bleu) ou faux positifs (rouge) grâce à la dynamique de croissance. Les carrés jaunes correspondent à des nœuds identifiés, mais non existants sur le mycélium. Les cercles jaunes indiquent des branches non identifiées (le nœud et la branche sont manquants). Le rectangle orange correspond à une portion d'hyphe non détectée [148].

Enfin, la dynamique d'extension du mycélium peut être étudiée par géomatique, à l'aide d'un outil GIS (« Geographic Information System »), pour lequel chaque panorama est défini comme une donnée géographique. Les images en niveaux de gris sont à nouveau binarisées et l'identification de la structure mycélienne permet d'extraire les surfaces intra-thalles S_i délimitées par les hyphes (figure 1.54).

Principaux résultats

L'article présente l'analyse de trois thalles obtenus à partir d'expériences en conditions de culture standards. Les principaux résultats de l'étude sont ici résumés. Tout d'abord, les grandeurs caractéristiques de la croissance A , N^g et L sont représentées au cours du temps pour les trois expériences sur la figure 1.53. Les derniers points expérimentaux, caractérisant le mycélium à la fin de l'expérience, correspondent à des valeurs d'environ : $A = 10^3$, $N^g = 10^4$ et $L = 1$ m.

Si les grandeurs A et N^g , qui reflètent la complexité du réseau mycélien, semblent croître de manière exponentielle dès le début de l'expérience, la longueur L , associée à la production de matière, connaît une phase initiale de latence d'environ 5 h. Cette durée est mise en évidence sur la figure 1.53D, où le minimum du ratio entre A et L est atteint aux alentours de 5 h. La dynamique exponentielle de la longueur du mycélium suite à la phase de latence est bien connue chez les espèces fongiques [128] [134] [131] [121]. On notera d'ailleurs qu'intervient ensuite une phase stationnaire, pour laquelle la croissance ralentit significativement, lorsque les ressources s'épuisent, ou en raison de l'accumulation d'un déchet métabolique [4] [134]. Nous

n'avons pas accès à cette phase de croissance, puisqu'au-delà de la fin de l'expérience choisie, le réseau atteint une densité trop importante, et la détection des vertex n'est plus fiable.

L'évolution des points expérimentaux pour les trois grandeurs A , N^g et L est ajustée avec la fonction exponentielle suivante : $X = X_0 \exp(\alpha_X t)$, où X représente A , N^g ou L , et α est le taux de croissance. On déduit de l'ajustement que les trois grandeurs A , N et L doublent toutes les $2, 11 \pm 0,09$, $1,61 \pm 0,01$, et $2,27 \pm 0,03$ h respectivement.

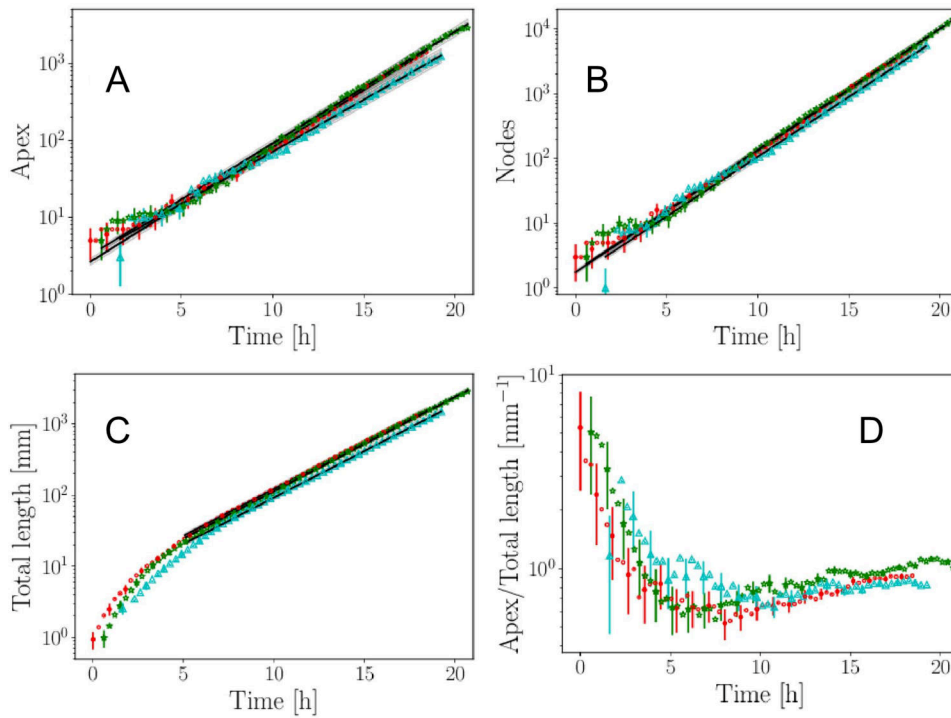


FIG. 1.53 – Évolutions temporelles du nombre d'apex A (A), du nombre de nœuds N^g (B) et de la longueur totale du mycélium L (C) pour trois répliqués en conditions standards (échelle semi-logarithmique). Les points rouges, cyans et verts correspondent respectivement à une expérience. Les ajustements sont les lignes noires avec l'erreur associée en ombre grise (un écart-type). La figure D représente le ratio de A et L au cours du temps pour les trois expériences (adapté de [148]).

De plus, le réseau a été étudié par le biais d'une approche locale : un anneau d'épaisseur choisie est centré sur l'ascospore, puis sectionné en 60 surfaces identiques. L'analyse des surfaces individuelles met en évidence le fait que le comportement exponentiel du nombre d'apex, de nœuds, et de la longueur du mycélium est également observable localement. Les valeurs des taux de croissance dépendent de la région étudiée, étant donné que le thalle ne présente pas une densité homogène.

Enfin, l'approche géomatique offre une analyse complémentaire de la dynamique de croissance du réseau. Les surfaces S_i sont colorées sur la figure 1.54 A en fonction de leurs aires. Les plus grandes surfaces sont majoritairement à la périphérie du thalle, et les plus petites au centre, indiquant que la densité du mycélium est importante dans cette région. Il a également été montré que le processus de densification, traduit par le nombre de surfaces S_i , est lié à

l'évolution de la longueur du mycélium L . On peut par ailleurs extraire l'âge de formation des surfaces, et ainsi observer la croissance globalement radiale du thalle, avec les surfaces les plus récentes les plus proches du front de croissance (figure 1.54 B).

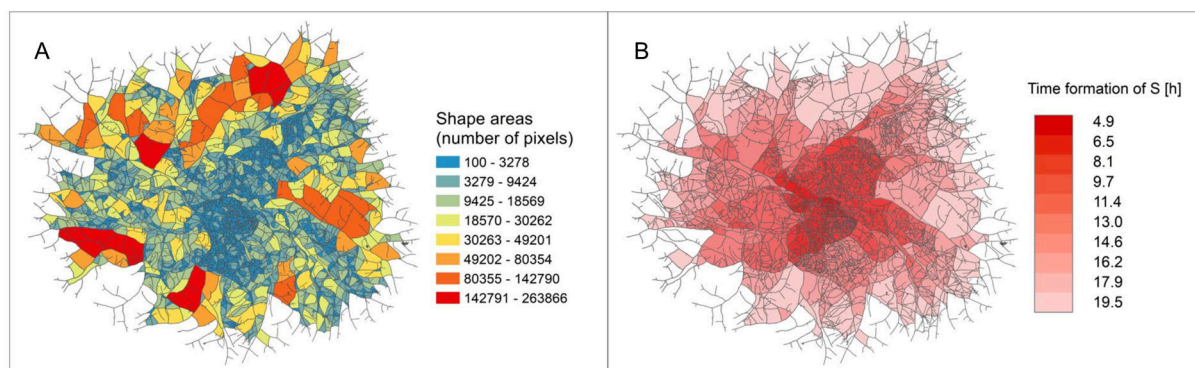


FIG. 1.54 – (A) Distribution spatiale des surfaces intra-thalles S_i , classées en huit catégories de couleurs selon leurs aires. (B) Représentation des surfaces S_i en fonction du moment de leur formation (adapté de [148]).

1.5 Objectifs du projet

Mon travail de thèse a été initié à partir du dispositif expérimental mis en place avant mon arrivée au laboratoire. Si la procédure d'acquisition des images est restée globalement identique (voir section 1.4.2, p. 52), des améliorations matérielles ont été apportées à l'installation. Tous les éléments du dispositif, les paramètres de fonctionnement, ainsi que la procédure de traitement des images seront détaillées dans le Chapitre 2, p. 61.

Comme décrit dans la partie précédente 1.4.2, des premières analyses portant sur la dynamique du réseau mycélien de *P. anserina* ont été menées à partir d'expériences en conditions de culture standards. Le dispositif expérimental ayant été construit au laboratoire, les paramètres affectant les conditions de croissance sont facilement ajustables. Ainsi, nous avons réalisé des expériences de croissance du mycélium sous des contraintes nutritives, osmotiques, lumineuses et de température. L'objectif était de chercher à caractériser l'architecture des réseaux issus de chaque contrainte à l'aide de grandeurs quantitatives, dont notamment la surface occupée par le mycélium. Ces analyses du réseau mycélien global sont présentées dans le Chapitre 3, p. 73, et ont fait l'objet d'un article à soumettre au journal PLOS Biology.

Par ailleurs, le mycélium étant constitué d'un ensemble d'hyphes interconnectées, son architecture globale est déterminée par le comportement de chaque hyphe. Nous nous sommes ainsi focalisés sur l'organisation et à la dynamique de croissance des hyphes individuelles, observables grâce à la haute résolution des images dont nous disposons. Les analyses ont été principalement menées à partir d'expériences en conditions standards. Le Chapitre 4, p. 101, s'intéresse tout d'abord à une étude sur la vitesse d'extension des apex, complétée par quelques

travaux concernant la vitesse de croissance du thalle global, présentés en annexe A. Nous analyserons ensuite la répartition des branchement le long de l'hyphe, et les interactions entre deux hyphes.

D'autre part, les caractéristiques du mycélium observées expérimentalement ont permis la calibration d'une simulation du réseau de *P. anserina*. L'avantage de la modélisation mathématique repose sur la possibilité de faire varier librement les paramètres, et d'observer les conséquences structurelles sur le réseau. En confrontation avec les observations expérimentales, cette approche a fait l'objet de deux études présentées dans le Chapitre 5, p. 149 : l'une concernant la distribution des angles de branchement (article publié dans Scientific Reports en 2022 [149]), et une autre discutant la densité des apex (à soumettre au journal Scientific Reports).

Enfin, un nouveau changement d'échelle nous a permis de considérer des structures intracellulaires des hyphes de *P. anserina*, grâce à la microscopie de fluorescence. Le dispositif expérimental a été mis en place au cours de ma thèse, et donne accès à l'observation dynamique des septa, des noyaux et du Spitzenkörper. Cette approche complémentaire cherche à établir des liens éventuels entre les comportements des hyphes observées en champ clair et ceux associés aux structures intracellulaires considérées. Les résultats préliminaires issus de ces travaux font l'objet du Chapitre 6, p. 199.

Les quatre chapitres de résultats présentés seront initiés par une courte introduction ainsi que par les méthodologies spécifiques à chacun. Le Chapitre 7, p. 221, conclura cette étude et présentera quelques perspectives.

Chapitre 2

Procédures expérimentales

2.1	Culture de <i>P. anserina</i> et préparation de l'échantillon pour observation	61
2.1.1	Culture de la souche sauvage de <i>P. anserina</i>	62
2.1.2	Préparation de l'ascospore pour l'acquisition des images	62
2.1.3	Culture et préparation des échantillons pour les souches mutantes de <i>P. anserina</i>	63
2.2	Acquisition des images du mycélium en champ clair	64
2.2.1	Observation à l'échelle microscopique	64
2.2.2	Observation à l'échelle macroscopique	66
2.2.3	Synthèse des conditions de culture	67
2.3	Traitement des images	68
2.3.1	Assemblage et binarisation	68
2.3.2	Vectorisation et extraction du graphe	68
2.3.3	Extraction des grandeurs caractéristiques de la croissance	69
2.4	Observation des hyphes en fluorescence	70
2.4.1	Fluorochromes et préparation de l'échantillon	70
2.4.2	Microscope en fluorescence	71
2.4.3	Traitement des images	72

2.1 Culture de *P. anserina* et préparation de l'échantillon pour observation

La mise en culture du champignon *P. anserina* ainsi que la préparation de l'échantillon pour l'acquisition des images du mycélium ont été présentées succinctement dans la section 1.4.2, p. 52, et seront détaillées ci-dessous. On notera que dans cette section, seules les procédures nécessaires à la réalisation de l'expérience sont décrites. De nombreuses ressources supplémentaires portant sur la culture de *P. anserina* sont disponibles dans la synthèse récente de Philippe Silar [10].

2.1.1 Culture de la souche sauvage de *P. anserina*

La souche sauvage de *P. anserina* utilisée dans cette étude est la souche « S » [150], dont le génome a été séquencé, annoté et publié en 2008 [147]. La souche sauvage est cultivée en routine sur un milieu M2 solide, dont la source de carbone est la dextrine à 0,55 % massique. La composition du milieu est la suivante : 0,25 g.L⁻¹ de phosphate de monopotassium (KH₂PO₄), 0,3 g.L⁻¹ de hydrogénophosphate de potassium (K₂HPO₄), 0,25 g.L⁻¹ de sulfate de magnésium (MgSO₄), 5,5 g.L⁻¹ de dextrine, 0,5 g.L⁻¹ d'urée, 0,05 mg.L⁻¹ de thiamine, 0,05 µg.L⁻¹ de biotine, 10 g.L⁻¹ d'agar, et une solution d'oligo-éléments (5 mg.L⁻¹ d'acide citrique, 5 mg.L⁻¹ de sulfate de zinc, 0,25 mg.L⁻¹ de sulfate de cuivre, 50 µg.L⁻¹ de sulfate de manganèse, 50 µg.L⁻¹ d'acide borique, 50 µg.L⁻¹ de molybdate de sodium et 1 mg.L⁻¹ d'alun de fer). Le pH est ajusté à 7 à l'aide d'une solution de phosphate de monopotassium, et le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

La formation de périthèces contenant les ascospores est initiée grâce à un croisement entre des souches des deux types sexuels *mat+* et *mat-*. De petits blocs de mycélium (environ 25 mm²) issus de chacun des thalles sont mixés ensemble avec 500 µL d'eau à l'aide d'un appareil de broyage FastPrep (Bio-Rad, 10 s à 5 000 rpm). La solution de mycélium fragmenté est répartie en cinq dépôts de 5 µL sur des boîtes de Petri de milieu M2. Après 7 jours de croissance en présence de lumière à 27°C, les périthèces matures expulsent des ascospores qui sont récoltées en plaçant une boîte de Petri avec une fine couche de milieu (appelée « couvercle d'agar ») au-dessus de la culture pendant quelques heures. Ces couvercles d'agar sont préparés avec 20 g.L⁻¹ d'agar et de 10 g.L⁻¹ de chlorure de sodium. Les ascospores ainsi récupérées sont conservées 5 jours maximum à 4°C.

2.1.2 Préparation de l'ascospore pour l'acquisition des images

Les ascospores sont récupérées individuellement sur le couvercle d'agar afin d'initier une nouvelle croissance. Une dizaine d'ascospores dikaryotiques (« grosses ascospores ») sont isolées à l'aide d'une pointe très fine, et sont déposées sur des boîtes de Petri contenant un milieu qui déclenche la germination (milieu G), préalablement recouvert d'un disque de cellophane (Amara Packaging). Le milieu G est composé de : 4,4 g.L⁻¹ d'acétate d'ammonium, 15 g.L⁻¹ de bacto-peptone, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 13 g.L⁻¹ d'agar. Il est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Les boîtes de Petri contenant les ascospores sont ensuite placées à 27°C. À partir de 4 heures d'incubation, la germination peut intervenir, et chaque ascospore est surveillée toutes les 30 minutes, jusqu'à observer la germination de l'une d'entre elles.

Cette dernière est alors transposée sur le milieu choisi pour l'expérience. Pour cela, la membrane de cellophane sur laquelle repose l'ascospore est déplacée à l'aide de pinces sur la nouvelle boîte de Petri, contenant une épaisseur d'environ 0,5 cm de milieu de culture. Dans le cadre de cette thèse, les milieux suivants ont été utilisés comme support de croissance :

- Le milieu standard M2.
- Le milieu M0 (milieu pauvre), de composition identique à celle du milieu M2, à l'exception de la dextrine qui est absente.

- Le milieu M2 auquel est ajouté du chlorure de potassium (KCl) à $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$.
- Le milieu M3 (milieu glucose), de composition identique à celle du milieu M2, à l'exception de la dextrine qui est remplacée par du glucose à la même concentration ($5,5 \text{ g.L}^{-1}$).

Afin d'éviter le dessèchement du milieu au cours de l'expérience, ce qui provoque une réduction de son épaisseur, et donc la perte de la mise au point de la caméra qui enregistre les images du mycélium, environ 2/3 du milieu solide sont retirés de la boîte de Petri et remplacés par le même milieu sous forme liquide (sans agar). Le milieu liquide est ajusté à la hauteur du milieu solide. La boîte de Petri est recouverte d'un couvercle. Cependant, la visualisation au travers de celui-ci génère des aberrations optiques délicates à réduire. Le couvercle est donc percé d'une ouverture circulaire d'environ 2 cm de diamètre, située au-dessus de l'ascospore.

2.1.3 Culture et préparation des échantillons pour les souches mutantes de *P. anserina*

Des expériences ont également été menées avec trois souches mutantes de *P. anserina* : $\Delta pah1 \Delta pah5$, $\Delta kef1$ et $\Delta PaMpk1 \Delta PaMpk2 \Delta PaMpk3$. Les phénotypes des trois souches observés à l'échelle macroscopique diffèrent de celui de la souche sauvage (figure 2.1).

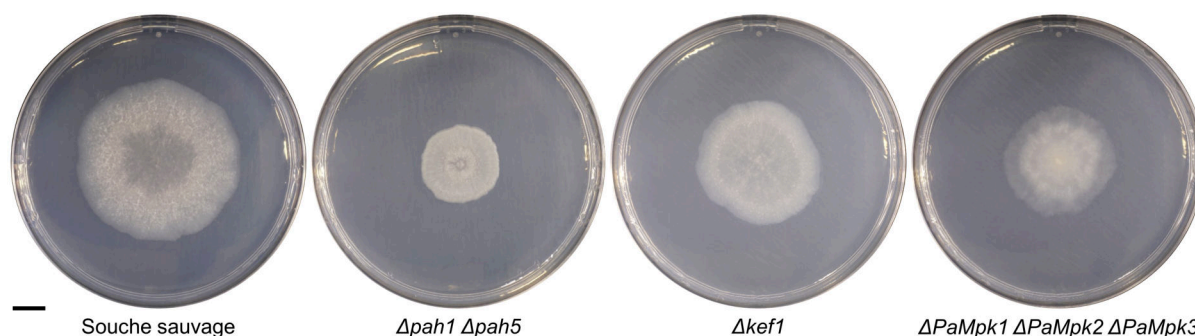


FIG. 2.1 – Thalles de souches sauvage et mutantes de *P. anserina* après 3 jours de culture sur milieu M2 solide recouvert d'une membrane de cellophane. Les croissances ont été initiées par un dépôt central d'une solution de mycélium fragmenté. Barre d'échelle : 1 cm.

La souche $\Delta pah1 \Delta pah5$ a été décrite dans [151]. Les gènes *pah1* et *pah5* (« *Podospora anserina* homeobox ») sont des homéogènes, essentiels à la morphogénèse du mycélium et au développement des organes sexuels. Ils codent des protéines de régulation agissant comme des facteurs de transcription, les homéoprotéines, qui sont capables de se lier à l'ADN. *pah1* est le premier homéogène identifié chez un ascomycète filamentueux. La délétion de ce gène provoque un mycélium avec un nombre de branchements particulièrement élevé [152]. Le phénotype du double mutant de délétion $\Delta pah1 \Delta pah5$ est identique à celui du simple mutant $\Delta pah1$ [151].

La deuxième souche mutante étudiée $\Delta kef1$ a été décrite dans [153]. Le gène *kef1* est également appelé *Pahmg9*, pour « *Podospora anserina* high-mobility-group box ». Le génome de *P. anserina* contient 12 gènes « high-mobility-group box » (HMGB), codant des protéines HMGB. Cette famille de protéines inclut des protéines de structure de la chromatine ainsi que des facteurs de transcription impliqués dans des fonctions diversifiées, allant de la détermination du sexe

à la signalisation immunitaire extracellulaire [153]. La délétion du gène *Pahmg9* provoque une réduction de la croissance, et un mycélium ondulé. De plus, la souche $\Delta Pahmg9$ présente un mycélium avec un nombre accru d'anastomoses, d'où le nom du gène *KEF1* pour « KEep-on-Fusing 1 ».

Enfin, la troisième souche étudiée est le triple mutant $\Delta PaMpk1\Delta PaMpk2\Delta PaMpk3$, décrit dans [154]. Les trois gènes *PaMpk1* (Pa_2_13340), *PaMpk2* (Pa_5_5680) et *PaMpk3* (Pa_1_23930) sont des « mitogen-activated protein kinase » (MAPK). Les cascades enzymatiques MAPK sont utilisées par tous les eucaryotes dans les processus de développement ou pour répondre à des stress environnementaux. Trois kinases phosphorylent séquentiellement leurs cibles : les MAPKKK phosphorylent les MAPKK, qui phosphorylent à leur tour les MAPK. Enfin, celles-ci phosphorylent divers composants cellulaires, en particulier des facteurs de transcription, et modifient ainsi l'expression de gènes [154]. Chez *P. anserina*, trois cascades *PaMpk* ont été identifiées, incluant chacune une MAPKKK, une MAPKK et une MAPK. La souche $\Delta PaMpk1\Delta PaMpk2\Delta PaMpk3$ que nous étudions présente une triple délétion pour les trois gènes codant les MAPK de chaque cascade enzymatique : *PaMpk1*, *PaMpk2* et *PaMpk3*. Il a été observé que la croissance de cette souche est ralentie, et que le branchement et la trajectoire des hyphes sont altérés, de telle sorte que les branches sont particulièrement courbées et ont tendance à s'étendre vers le centre du mycélium [154].

Les trois souches mutantes étudiées étant stériles, le protocole de préparation des échantillons avant observation du mycélium diffère légèrement de celui décrit précédemment pour la souche sauvage. Pour chacune, la souche *mat-* est utilisée. À partir d'une culture fraîche sur milieu M2 solide, un petit bloc de mycélium est découpé à l'aide d'un cône pour pipette de 200 μ L. Le mycélium est mixé avec 500 μ L d'eau à l'aide d'un appareil de broyage FastPrep (Bio-Rad, 10 s à 5 000 rpm). La boîte de Petri contenant le milieu de culture choisi pour l'expérience est préparée en déposant une membrane de cellophane à la surface. Un dépôt de 2 μ L de la solution de mycélium est ensuite déposé sur le disque de cellophane. Enfin, de la même manière que pour la procédure à partir d'une ascospore, une partie du milieu solide est remplacée par du milieu liquide, et un couvercle percé est placé sur la boîte.

2.2 Acquisition des images du mycélium en champ clair

2.2.1 Observation à l'échelle microscopique

La boîte de Petri contenant l'ascospore germée est placée dans l'enceinte renfermant le dispositif d'acquisition d'images (figure 2.2). Ce dernier est globalement identique à celui décrit dans la section 1.4.2, p.52, mais des améliorations ont été apportées au niveau du système d'éclairage, du système de maintien de la température, de l'objectif et de la caméra. La membrane de cellophane placée entre le milieu et l'ascospore maintient la croissance des hyphes deux dimensions. De fait, les hyphes ne sont pas confinées, et peuvent avoir des déplacements

verticaux, notamment des chevauchements, mais restent ensuite toujours en contact avec la membrane. Dans ce dispositif, l'échantillon peut-être déplacé sous la caméra afin d'accéder à la surface totale du mycélium, comme décrit ci-après.

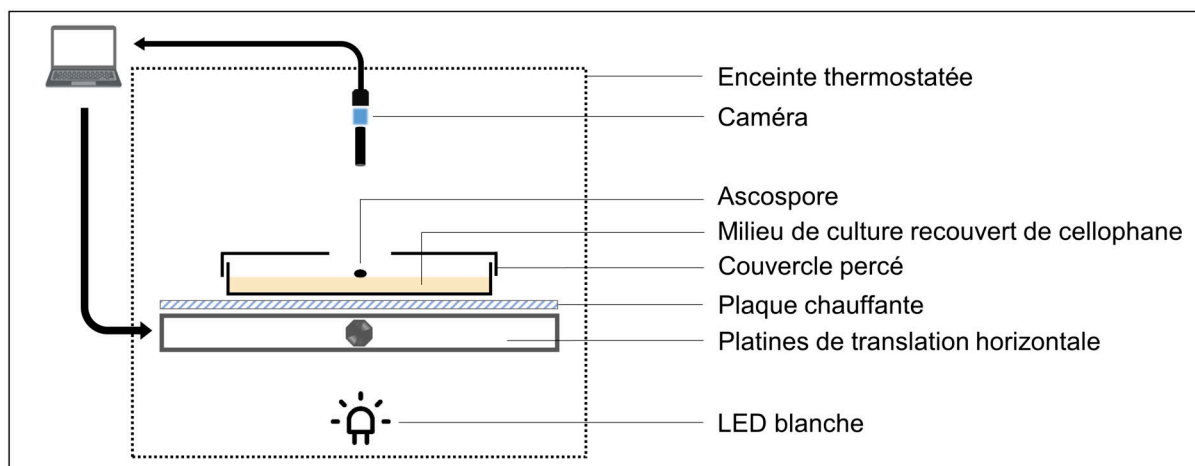


FIG. 2.2 – Système d'observation du mycélium en croissance à partir d'une ascospore sur boîte de Petri.

Éclairage

Le système d'éclairage placé sous l'échantillon est constitué d'une LED blanche MCWHL6-C1 (Thorlabs), dont le faisceau fait 50 mm de diamètre, et les paramètres d'utilisation sont $41 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$, 600 mA et $66 \cdot 10^3 \text{ lux}$. La LED est également utilisée en association avec un filtre optique neutre de densité optique 3 (NE2R30B, Thorlabs). Dans ce cas, l'intensité lumineuse par unité de surface est de 67 lux. L'éclairage peut être contrôlé de manière automatique afin d'être actif uniquement lors de l'acquisition des images. Le spectre de la LED MCWHL6-C1 est indiqué sur la figure 2.3.

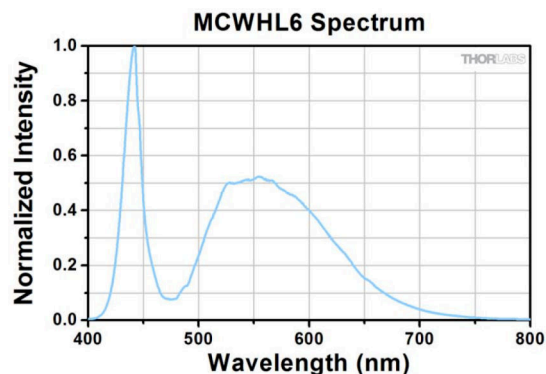


FIG. 2.3 – Spectre de la LED MCWHL6-C1 : intensité lumineuse en fonction de la longueur d'onde en nm.

Système de maintien de la température

La température est régulée grâce à trois systèmes imbriqués permettant d'obtenir une température de croissance la plus précise et constante possible.

- La température de la pièce est climatisée à $19 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Le dispositif intégral est placé dans une enceinte dont la température est maintenue par des échangeurs thermiques, la régulation desquels permettant de maintenir une température constante au voisinage de la température désirée, typiquement à moins de 1°C .

- Une plaque en verre chauffante Okolab H601 de dimensions 160×110 est placée sous la boîte de Petri (figure 2.2). La plaque permet de régler la température jusqu'à 60°C , avec une précision de $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$.

Les températures choisies pour nos expériences sont 19°C , 27°C et 35°C . L'humidité est mesurée autour de 70 % à proximité de l'échantillon.

Caméra et objectif

En comparaison avec le dispositif présenté dans la section 1.4.2, p. 52, un nouveau système de caméra et objectif a été installé, notamment afin de réduire le nombre d'images nécessaire à la visualisation du mycélium complet après 20 heures de croissance. Un objectif télécentrique VS-TC2-65 (Vital Vision) de grossissement $\times 2$ est associé avec une caméra monochrome (capteur CMOS, DMK 37AUX250, The Imaging Source). La distance de travail est de 65 mm, la profondeur de champ est de $300\ \mu\text{m}$ (pour une longueur d'onde de 500 nm). La résolution peut être calculée avec la taille du pixel renseignée par le fournisseur ($3,45\ \mu\text{m}.\text{px}^{-1}$) et le grossissement de l'objectif ($\times 2$). La valeur de la résolution est vérifiée expérimentalement en utilisant une image d'un objet de taille connue, nous donnant une valeur de $1,63\ \mu\text{m}.\text{px}^{-1}$. Les dimensions d'une image individuelle (appelée *tuile*) sont de $2\ 448 \times 2\ 048$ px, soit $3,99 \times 3,34\ \text{mm}^2$.

Platines de translation horizontale

L'échantillon peut être déplacé sous la caméra à l'aide de deux platines de translation horizontale (VT-80, Physik Instrumente). La plage de déplacement maximale est de 50 mm en x et en y , la précision est de $0,2\ \mu\text{m}$, et la reproductibilité est de $0,8\ \mu\text{m}$. La visualisation du mycélium complet (appelée *panorama*) nécessite l'acquisition de plusieurs tuiles. Le nouveau système de caméra et objectif a permis de réduire le nombre de tuiles à 3×4 , contre 9×12 tuiles auparavant. La durée totale comprenant le temps de déplacement d'une tuile à l'autre et l'acquisition de l'image est de 4 secondes. Ainsi la durée d'acquisition d'un panorama est de 48 secondes. Par ailleurs, le déplacement de l'échantillon est choisi de telle sorte que les tuiles se recouvrent de 20 %, afin d'optimiser le processus de reconstruction du panorama. La durée entre deux panoramas est réglée à 18 minutes ou à 4 minutes. L'expérience est stoppée après une durée typique de 20 heures, ce qui correspond à une collection de 70 panoramas environ. On notera que les dimensions du panorama, la durée de déplacement de l'échantillon, ainsi que la fréquence d'acquisition des panoramas peuvent être modifiées par l'opérateur.

2.2.2 Observation à l'échelle macroscopique

Un dispositif similaire à celui permettant l'acquisition d'images à l'échelle microscopique a été développé pour suivre la croissance du mycélium à l'échelle de la boîte de Petri. Une caméra monochrome enregistre des images dont la résolution est calculée grâce au diamètre connu de la boîte de Petri, soit $90\ \mu\text{m}.\text{px}^{-1}$. Les dimensions des images sont de $1\ 280 \times 960$ px, soit $11,5 \times 8,6\ \text{cm}$. Les images sont acquises toutes les 30 minutes pendant une durée totale de 6 jours.

D'autre part, des images du mycélium sur la boîte de Petri dans différentes conditions de croissance sont enregistrées quotidiennement dans une chambre à UV UVIDOC HD5-20MX Electronic Darkroom (Uvitec). Seule la lumière blanche de l'appareil est utilisée pour acquérir les images. Ce dispositif permet d'obtenir un fort contraste sur les images, et est ainsi particulièrement adapté pour visualiser les thalles grêles. Les échantillons sont ensuite replacés dans les conditions de culture spécifiques de l'expérience.

2.2.3 Synthèse des conditions de culture

Toutes les conditions de culture choisies pour mener les expériences d'observation du mycélium en champ clair sont résumées dans le tableau 2.1. Pour chaque condition, l'expérience est reproduite en triplicat. La membrane de cellophane est systématiquement utilisée. Les désignations des conditions font référence aux termes utilisés dans les parties de résultats.

TAB. 2.1 – Tableau récapitulatif des conditions de culture. Les appellations indiquées dans la colonne « Condition » font référence aux termes utilisés dans les parties de résultats. S : souche sauvage ; $\Delta 1$: souche mutante $\Delta pah1\Delta pah5$; $\Delta 2$: souche mutante $\Delta kef1$; $\Delta 3$: souche mutante $\Delta PaMpk1\Delta PaMpk2\Delta PaMpk3$. Éclairage neutre : 67 lux ; éclairage intense : 66.10^3 lux.

Souche	Condition	Inoculum	Source de carbone	Éclairage	Température
S	C1	1 ascospore	dextrine (M2)	neutre	27°C
	C2	1 ascospore	\emptyset (M0)	neutre	27°C
	C3	1 ascospore	dextrine (M2) + KCl (0,3 M)	neutre	27°C
	C4	1 ascospore	dextrine (M2)	intense	27°C
	C5	1 ascospore	dextrine (M2)	neutre	19°C
	C6	1 ascospore	dextrine (M2)	neutre	35°C
	C7	1 ascospore	dextrine (M2)	\emptyset	27°C
	C8	1 ascospore	glucose (M3)	neutre	27°C
	C9	4 ascospores (asque)	dextrine (M2)	neutre	27°C
	stress ponctuel 2 h	1 ascospore	dextrine (M2)	intense 6 → 8h	27°C
	stress ponctuel 4 h	1 ascospore	dextrine (M2)	intense 6 → 10h	27°C
$\Delta 1$	C1	mycélium fragmenté	dextrine (M2)	neutre	27°C
$\Delta 2$	C1	mycélium fragmenté	dextrine (M2)	neutre	27°C
$\Delta 3$	C1	mycélium fragmenté	dextrine (M2)	neutre	27°C

2.3 Traitement des images

2.3.1 Assemblage et binarisation

Les tuiles sont assemblées à l'aide d'une macro ImageJ créée spécifiquement pour cet usage, afin de reconstruire les panoramas de dimensions $11,7 \times 11,4 \text{ mm}^2$ (3×4 tuiles). L'alignement entre les tuiles est facilité par un recouvrement partiel entre elles, mais augmente le nombre d'images à acquérir. Après une étude systématique de recherche d'un optimum, nous avons fixé le recouvrement à 20% (figure 2.4). Les panoramas en niveaux de gris sont ensuite binarisés par une étape de segmentation. Ce processus permet de s'affranchir des impuretés présentes sur l'image, et de conserver ainsi uniquement la structure du mycélium (figure 2.4).

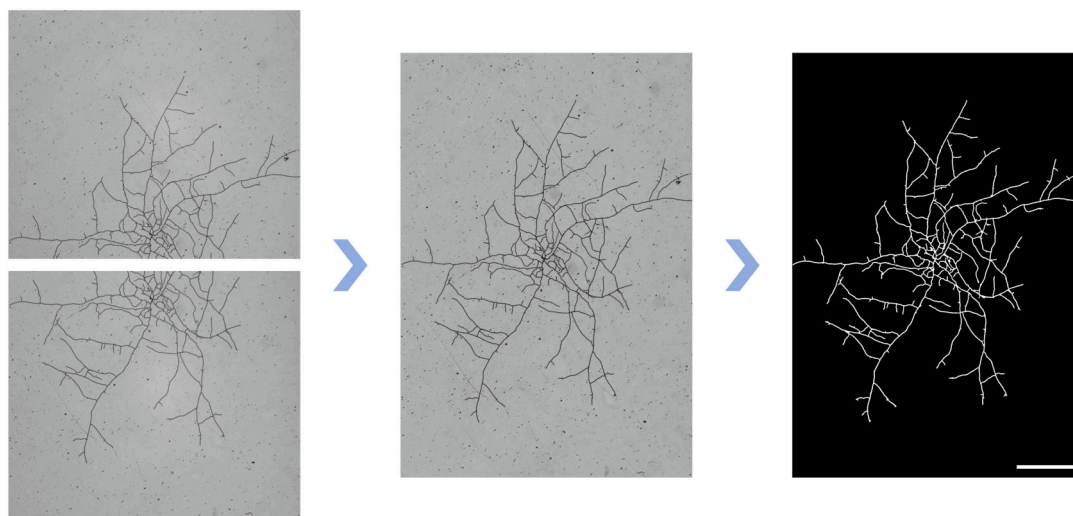


FIG. 2.4 – Le recouvrement entre les deux tuiles (de dimensions $3,99 \times 3,34 \text{ mm}^2$) est de 20%. L'image du mycélium est reconstruite par assemblage des tuiles. Le panorama est ensuite binarisé (barre d'échelle : $500 \mu\text{m}$).

2.3.2 Vectorisation et extraction du graphe

La vectorisation des images permet de convertir le réseau mycélien en structure de graphe, composé de liens (arêtes) et de sommets (vertex). La procédure utilisée ici est basée sur un travail de Lasser *et al.* [155]. À partir des panoramas binarisés, une triangulation de Delaunay est effectuée, permettant de discrétiser le réseau en une succession de triangles juxtaposés. Ceux-ci peuvent être de trois types, comme mis en évidence sur la figure 2.5 :

- Une unique arête en commun avec un autre triangle (rouge), *i.e.* il existe une seule connexion au réseau. Ce vertex est associé aux apex.
- Deux arêtes en commun (violet), *i.e.* il existe deux connexions au réseau. Ce vertex est associé aux branches.
- Trois arêtes en commun (jaune), *i.e.* il existe trois connexions au réseau. Ce vertex est associé aux intersections (points de branchements et anastomoses).

Lors de la reconstruction, nous limitons volontairement le nombre de connexions au réseau

à trois, ce qui correspond aux branchements et aux anastomoses, qui sont les phénomènes biologiques comptant le plus de connexions. Ainsi, un chevauchement apparaîtra comme deux triple connexions très proches l'une de l'autre.

Les triangles violets, représentant les branches, sont fusionnés avec leurs voisins lorsqu'ils sont inférieurs à une certaine dimension.

Un centre est ensuite déterminé pour chaque triangle afin de reconstruire le squelette du réseau en définissant les vertex, qui constituent le graphe. Pour les triangles comptant une seule connexion (rouges), le centre est le sommet opposé à cette arête. Pour les triangles associés aux branches (violets), le centre est choisi de telle sorte qu'il appartienne à la bissectrice de l'angle délimité par les deux arêtes connectées, et qu'il soit à égale distance de l'arrière-plan entourant l'hyphe (pixels noirs). Pour les triangles associés aux intersections (jaunes), la même procédure est effectuée, mais en considérant la ligne de bisection de l'angle la plus longue.

Pour les triangles représentant les branches (violets), deux centres voisins sont fusionnés en un seul point, en prenant la distance moyenne entre les deux centres. Cette étape permet d'alléger la redondance des points et donc la structure du graphe, tout en maintenant une bonne approximation du réseau (figure 2.5).

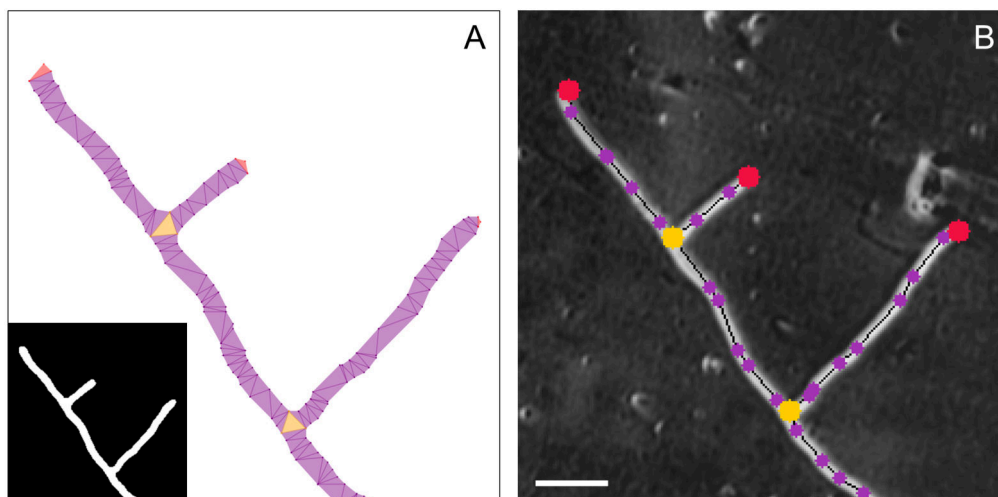


FIG. 2.5 – (A) Suite à l'étape de binarisation (encart), l'image est vectorisée. Une triangulation de Delaunay définit trois classes de triangles, en fonction du nombre d'arêtes « intérieures » ou « extérieures » (rouge, jaune et violet). Un centre est extrait pour chaque triangle. (B) Graphe extrait à partir de la triangulation, superposé sur l'image originale du mycélium. Les vertex de degré 1 (apex) sont en rouge, les vertex de degré 3 (intersections) en jaune et les vertex de degré 2 (branches) en violet (reliés par une ligne noire). Barre d'échelle : 50 μm .

2.3.3 Extraction des grandeurs caractéristiques de la croissance

Le graphe associé au mycélium comprend trois natures de points différentes : les apex (vertex de degré 1), les nœuds constituant les branches (vertex de degré 2) et les intersections (vertex de degré 3).

Il est alors possible d'extraire le nombre d'apex A , le nombre d'intersection N , et la longueur

totale du mycélium L , correspondant à la somme des segments reliant les vertex de degré 2.

La vectorisation est appliquée à chaque panorama, donnant ainsi accès à l'évolution temporelle des trois grandeurs caractéristiques $A(t)$, $N(t)$ et $L(t)$. La longueur du mycélium L est sous-estimée, étant donnée qu'elle est définie comme la somme de distances euclidiennes L_l entre deux vertex de degré 2 : $L = \sum_{l=1}^{n_e} L_l$, avec n_e le nombre de vertex de degré 2. Plus la valeur de n_e est élevée, meilleure sera l'approximation de L . Une valeur de n_e a été choisie telle que la longueur L varie d'au maximum 0,1% par rapport à la valeur de L calculée avec $n_e + 1$.

2.4 Observation des hyphes en fluorescence

L'observation en fluorescence des hyphes de *P. anserina* est focalisée sur trois structures cellulaires : les septa, les noyaux et le Spitzenkörper (SPK). Chaque élément est observé individuellement grâce à un fluorochrome différent. Un exemple d'image obtenue pour chacune des trois structures est présenté sur la figure 2.6.

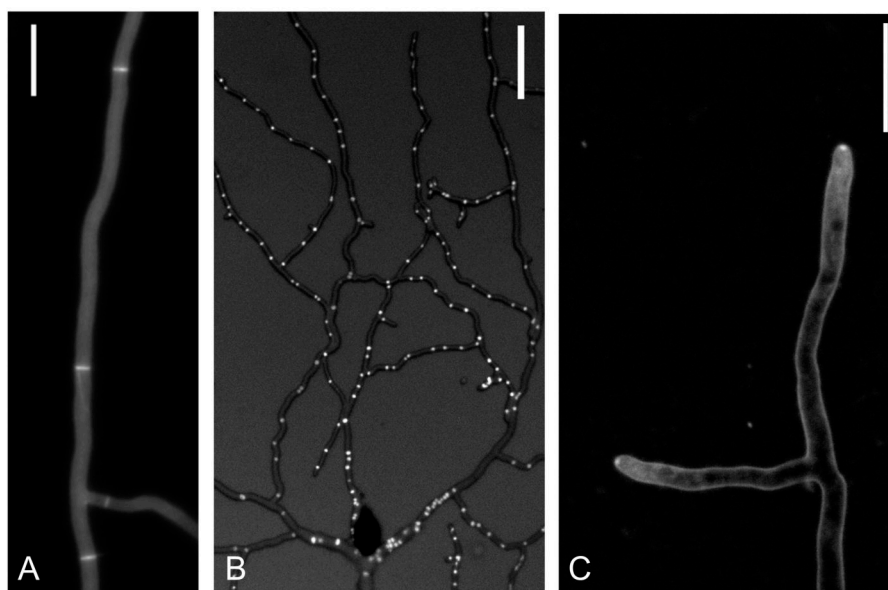


FIG. 2.6 – Observation des septa (A), des noyaux (B) et du SPK (C) sur des hyphes de la souche sauvage de *P. anserina*. Voir le texte pour les marqueurs fluorescents utilisés. Barres d'échelle (A) et (C) : 20 μm ; (B) : 50 μm .

2.4.1 Fluorochromes et préparation de l'échantillon

Toutes les observations en fluorescence sont effectuées à partir d'un mycélium en croissance sur une membrane de cellophane (Amara Packaging) afin de guider la croissance des hyphes en deux dimensions. Un petit bloc de mycélium est broyé avec 500 μL d'eau à l'aide d'un appareil de broyage FastPrep (Bio-Rad, 10 s à 5 000 rpm). Un dépôt de 2 μL de mycélium est placé sur le

disque de cellophane recouvrant le milieu de culture solide (milieu riche M2 ou milieu pauvre M0). L'échantillon est incubé à 27°C pendant 6 heures avant observation.

Septa

Les septa sont visualisés sur les hyphes de la souche sauvage de *P. anserina*, ainsi que sur les trois souches mutantes $\Delta pah1\Delta pah5$, $\Delta kef1$ et $\Delta PaMpk1\Delta PaMpk2\Delta PaMpk3$. On utilise ici le colorant fluorescent bleu Calcofluor-White, noté CFW (Fluorescent Brightener 28 de Sigma-Aldrich, ref. F3543), présenté dans la section 6.2.2, p.204. On dépose 5 μ L de colorant à la concentration 25 μ M sur le mycélium, et l'observation en fluorescence est menée immédiatement après.

Noyaux

La souche *PaMCM1-GFP* disponible au laboratoire a été utilisée pour l'observation de la dynamique des noyaux (travaux sur cette souche non encore publiés par l'équipe). Chez *P. anserina*, le gène *Pamcm1* code la protéine MCM1, qui appartient à la famille des protéines « MADS box », des facteurs de transcription qui contrôlent plusieurs processus de développement chez les plantes, les animaux et les champignons [156]. Ces protéines contiennent un domaine de liaison à l'ADN. Les noyaux peuvent ainsi être visualisés grâce la protéine de fusion MCM1-GFP exprimée par la souche mutante *PaMCM1-GFP*. La GFP (« Green Fluorescent Protein ») est présentée dans la section 6.3.2, p.211.

Spitzenkörper

Le SPK est marqué grâce au colorant fluorescent rouge FM 4-64 (N-(3-triéthylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diéthylamino) phényl) hexatriényl) dibromure de pyridinium) de Invitrogen (ref. T13320). Les propriétés du colorant sont détaillées dans la section 6.4.1, p.216. On dépose 5 μ L de colorant à la concentration 10 μ M sur le mycélium, et l'observation en fluorescence est menée immédiatement après.

2.4.2 Microscope en fluorescence

Le microscope en fluorescence est composé des éléments suivants (figure 2.7) :

- Un microscope droit OpenStand H275OSM (Prior Scientific) équipé d'une platine permettant le déplacement en x , y , z . La gamme de déplacement horizontale est de 125 \times 75 mm et la résolution de déplacement est de 1 μ m.
- Une plaque en verre chauffante Okolab H601 adaptée à la platine du microscope.
- Un anneau chauffant Okolab placé autour de l'objectif.
- Un couvercle en plastique placé au-dessus de l'échantillon et entourant l'objectif.
- Une source lumineuse CoolLED adaptée à chaque fluorochrome (voir tableau 2.2).
- Un set de filtres excitation / miroir dichroïque / émission (Semrock) adapté à chaque fluorochrome (voir tableau 2.2).

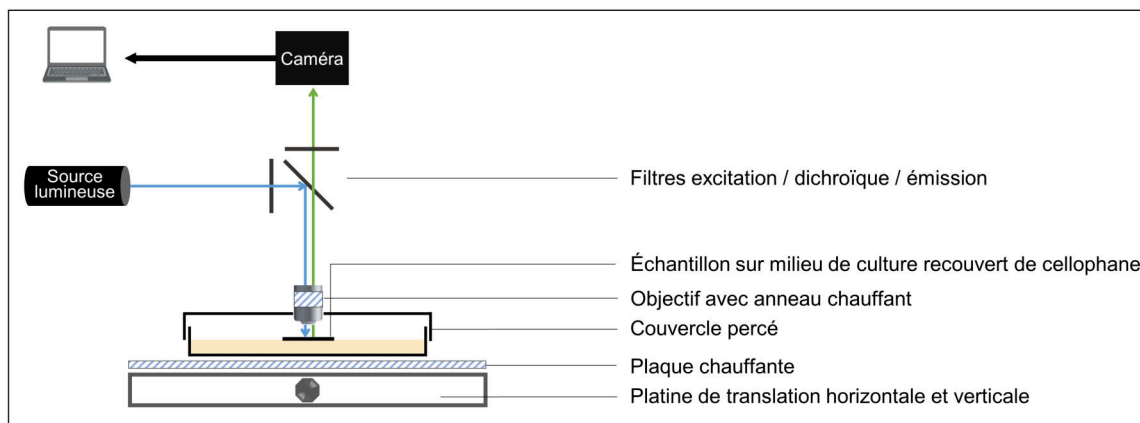


FIG. 2.7 – Schéma du dispositif d'observation en fluorescence.

- Une caméra CMOS Moment (Photometrics), avec une résolution de $4,5\mu\text{m.px}^{-1}$. Les dimensions des images sont de $3200 \times 2200\text{px}$. L'activation de la source lumineuse est synchronisée avec l'acquisition des images.
- Deux objectifs Zeiss ont été utilisés :
 - * Objectif N-Achroplan $10\times/0,25$ (profondeur de champ à 500 nm : $8,5\mu\text{m}$, distance de travail : 6,5 mm, résolution des images : $0,45\mu\text{m.px}^{-1}$)
 - * Objectif N-Achroplan $63\times/0,95$ (profondeur de champ à 500 nm : $0,5\mu\text{m}$, distance de travail : 0,17 mm, résolution des images : $0,072\mu\text{m.px}^{-1}$)

TAB. 2.2 – Paramètres associés à chaque structure cellulaire observée. λ : longueur d'onde.

Paramètres	Septa	Noyaux	SPK
Fluorochrome	CFW	GFP	FM 4-64
λ filtre d'excitation [nm]	350 - 405	450 - 490	550 - 570
λ miroir dichroïque [nm]	410 - 550	485 - 535	580 - 800
λ filtre d'émission [nm]	415 - 480	495 - 525	575 - 800
λ_{max} source lumineuse [nm]	365	470	565
Intensité source lumineuse [%]	10	20	20
Temps d'exposition [ms]	100	100	100

2.4.3 Traitement des images

L'acquisition des images s'effectue à l'aide du logiciel Micro-Manager, qui permet de contrôler le déplacement de la platine du microscope et la fréquence d'acquisition. Généralement, quatre images sont enregistrées pour couvrir la surface d'intérêt, avec un recouvrement de 10% ($5760 \times 3960\text{px}$). Les images acquises sont ensuite assemblées avec une macro ImageJ. La période d'acquisition des images est de 15 ou 30 secondes. Les mesures sont ensuite directement effectuées sur les collections temporelles d'images à l'aide du logiciel ImageJ.

Chapitre 3

Contraintes de croissance

3.1	Introduction	73
3.2	Procédure d'analyse des données expérimentales	74
3.3	Influence de l'environnement de croissance	75
3.3.1	Influence de l'éclairage	76
3.3.2	Influence de la source de carbone	78
3.3.3	Influence du nombre initial d'ascospores	78
3.4	Article	80
3.5	Discussion	99

3.1 Introduction

Si le réseau mycélien des champignons filamenteux adopte une architecture particulièrement adaptée à la colonisation des milieux et à la recherche efficace de ressources, il n'en reste pas moins que le développement de cette structure végétative peut être entravé par plusieurs facteurs. D'une part, le mycélium est confronté à des conditions environnementales potentiellement très variables au cours de sa croissance, par exemple au niveau des paramètres de température, de pH, d'humidité, de rayonnement UV, de la disponibilité des nutriments, ou de la présence de substances toxiques dans le milieu [157] [158] [159]. Les hyphes peuvent également être soumises à des contraintes mécaniques, comme des obstacles sur leurs trajectoires, ou un confinement dans les pores du substrat de croissance [4] [138]. D'autre part, les champignons filamenteux évoluent dans des habitats parfois très convoités par d'autres organismes, et il se met alors en place une compétition pour la colonisation du substrat entre les différentes espèces. Le mycélium peut être la cible d'attaques par des organismes tels que les nématodes [160] ou les collemboles (petits arthropodes) [161] par exemple.

Dans ce contexte de croissance sous contraintes permanentes, la survie des champignons dépend de leur capacité d'adaptation [16]. La production de métabolites secondaires par certaines espèces est une réponse adaptative bien connue, notamment dans le cadre de la compétition entre espèces (voir section 1.1.2, p.7) [7]. Par ailleurs, la plasticité du réseau d'hyphes permet une réorganisation du mycélium afin d'assurer la survie du champignon soumis à des stress

plus ou moins intenses, ponctuels et combinatoires. L'architecture du réseau pourrait finalement être considérée comme étant en partie une conséquence de l'environnement de croissance [24] [122].

Les aspects variables qu'adopte le thalle de *P. anserina* en fonction des conditions de croissance ont largement été décrits à l'échelle macroscopique, après plusieurs jours de croissance [10]. À l'aide de notre dispositif présenté dans la section 2.2, p. 64, nous nous sommes attachés à réaliser l'acquisition de collections d'images du mycélium en croissance à l'échelle microscopique dans différentes conditions. À partir de ces expériences, l'objectif de ce travail était de quantifier des différences entre ces réseaux sur les 20 premières heures de croissance suivant la germination de l'ascospore. Les résultats principaux de ces travaux sont présentés dans cette section sous la forme d'un article intitulé « Characterization of spatio-temporal dynamics of the constrained network of the filamentous fungus *Podospora anserina* using a geomatics-based approach », qui sera soumis au journal PLOS Biology. Nous présenterons préalablement la procédure d'analyse des images utilisée, ainsi que quelques résultats complémentaires. Les panoramas obtenus dans les conditions de culture étudiées ici sont présentés en annexe B, p. 235.

3.2 Procédure d'analyse des données expérimentales

Cette première partie est consacrée à la présentation détaillée de l'analyse des données extraites à partir des images du mycélium dans différentes conditions de croissance. Comme présenté précédemment, le traitement automatisé des images permet d'extraire le nombre d'apex A , le nombre de nœuds N , et la longueur totale du mycélium L au cours du temps. On notera que la grandeur ici notée N correspond au nombre de nœuds géométriques N^g , c'est à dire associant les branchements, les anastomoses et les chevauchements (voir section 1.4.2, p. 52).

Les incertitudes sur les points expérimentaux sont estimées de la manière suivante :

- L'incertitude associée au temps est évaluée comme la durée nécessaire pour enregistrer toutes les images (tuiles) à assembler pour reconstruire une image du mycélium complet (panorama), soit $\sigma_t = 12 \times 4 = 48$ s (voir section 2.3, p. 68).
- Les grandeurs A et N sont considérées comme des variables aléatoires suivant une loi de Poisson, d'où $\sigma_A = \sqrt{A}$ et $\sigma_N = \sqrt{N}$.
- On estime que L est la somme de $A + N$ segments de longueur moyenne $\langle \ell \rangle$, avec $\langle \ell \rangle = \frac{L}{A+N}$. On a alors $\sigma_L = \sqrt{(A+N)} \frac{L}{A+N}$.

La méthode d'ajustement des points expérimentaux a été améliorée par rapport à celle présentée dans la section 1.4.2, p. 52, afin de mieux correspondre à la dynamique observée. On introduit tout d'abord un temps de décalage t_0 , qui permet de prendre en compte le fait que le moment de l'acquisition de la première image par rapport à l'instant réel de la germination n'est pas rigoureusement identique pour toutes les expériences. En effet, la mise en œuvre de l'expérience implique une certaine durée de préparation de l'échantillon suite à la germination

de l'ascospore, potentiellement différente d'une expérience à l'autre. Le temps t_0 permet de réajuster au niveau du temps toutes les collections de données A , N et L les unes par rapport aux autres. Les points expérimentaux sont ajustés à l'aide d'une fonction exponentielle en base 2, afin de respecter la forme d'arbre binaire du réseau où une hyphe se dédouble au niveau d'un branchement :

$$X(t) = X_0 2^{\frac{(t+t_0)}{\tau_X}}$$

avec $X = A$, N ou L , et $1/\tau_X$ les taux de croissance respectifs. Le temps d'ajustement t_0 est choisi manuellement de manière à obtenir simultanément des valeurs de A_0 , N_0 et L_0 cohérentes avec les conditions biologiques initiales. Le nombre d'apex initial doit être dans la gamme de 2 à 3, afin de refléter le nombre d'hyphes issues de l'ascospore juste après la germination, comme indiqué sur la figure 3.1. La valeur de t_0 est estimée de sorte à obtenir $A_0 = 2$ et $A_0 = 3$ respectivement en conditions de culture standards. L'incertitude associée à t_0 est évaluée par la différence entre ces deux valeurs de t_0 , soit 1 heure. La valeur de N_0 doit quant à elle être proche de 1, et on considérera L_0 proche de 20 diamètres d'hyphes environ, soit 200 μm . De plus, l'ajustement est effectué sur une sélection de points expérimentaux, propre à chaque expérience. Après observation de l'évolution de A , N et L , on considère que la première heure de croissance correspond à une phase de latence, qui est exclue de l'ajustement exponentiel. De même, on observe que les points expérimentaux les plus tardifs n'appartiennent plus à la phase exponentielle, et sont donc exclus. Les paramètres d'ajustement extraits pour toutes les conditions étudiées dans cette section sont présentés dans l'annexe C, p. 237.

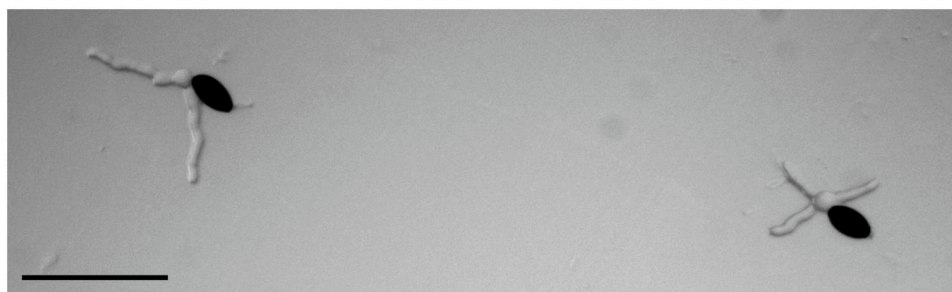


FIG. 3.1 – Suite à la germination, les premières hyphes issues de l'ascospore sont généralement au nombre de deux (gauche) ou de trois (droite) chez *P. anserina* (barre d'échelle : 100 μm).

3.3 Influence de l'environnement de croissance

Chaque condition de croissance étudiée est comparée à la condition de référence, définie comme étant les conditions de croissance optimales pour *P. anserina*, ou conditions standards, notée C1. Des images des différents mycéliums sont présentées en annexe B, p. 235 pour toutes les conditions de croissance étudiées. Les conditions analysées dans ce chapitre sont notées C1 à

C9 (voir section 2.2.3, p.67). Les conditions C1 à C6 font l'objet de l'article présenté ci-dessous (voir section 3.4). Nous analyserons tout d'abord trois conditions de croissance (C7 à C9), qui seront comparées à la référence (C1). Chaque expérience est reproduite en triplicats.

3.3.1 Influence de l'éclairage

La première condition de croissance étudiée est une expérience menée dans l'obscurité, notée C7. L'éclairage est néanmoins utilisé de manière très ponctuelle afin de pouvoir réaliser les acquisitions des images (voir section 2.2.1, p.64). L'objectif est de quantifier par l'extraction des grandeurs A , N et L si l'éclairage utilisé dans le dispositif expérimental en conditions standards a un impact sur la croissance du mycélium.

La procédure présentée ci-après est effectuée pour chaque triplicat des deux conditions C1 et C7, mais les figures détaillées sont présentées uniquement pour C1. Après avoir déterminé manuellement la valeur de t_0 pour chaque expérience, les paramètres de l'ajustement exponentiel τ et X_0 sont extraits pour chaque grandeur A , N et L , avec leurs incertitudes associées (figure 3.2 et tableau 3.1). Enfin, un ajustement moyen est calculé pour chaque condition pour les grandeurs A , N et L respectivement (figures 3.2, 3.3 et tableau 3.2).

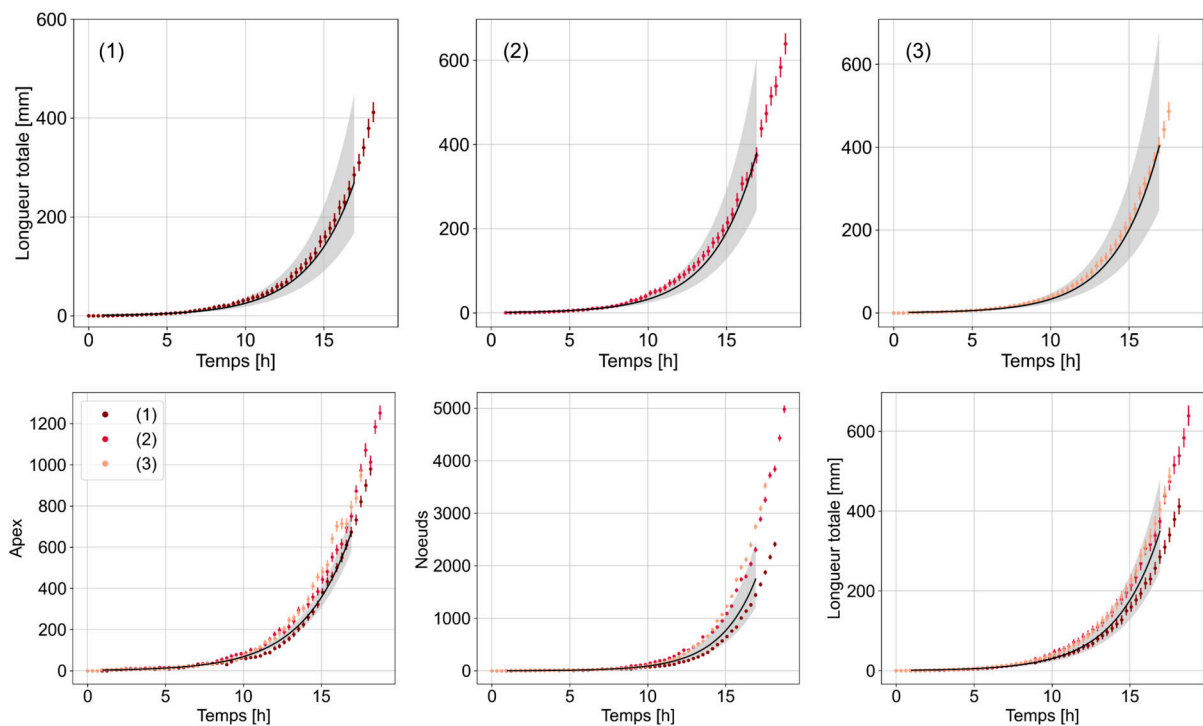


FIG. 3.2 – En haut, les trois figures représentent l'évolution de L au cours du temps pour les trois réplicats (1), (2) et (3) en C1. Les points expérimentaux sont marqués en rouge avec leurs barres d'erreur. L'ajustement exponentiel (voir texte) est indiqué par la courbe noire, qui délimite l'intervalle de points conservés pour l'ajustement. La surface grise représente l'erreur associée à l'ajustement (un écart-type). Les paramètres de l'ajustement sont résumés dans le tableau 3.1. En bas, les points expérimentaux A , N et L sont représentés au cours du temps, avec les trois réplicats sur la même figure. L'ajustement moyen avec l'incertitude associée sont indiqués par la courbe noire et la surface grise respectivement.

TAB. 3.1 – Valeurs des paramètres de l'ajustement exponentiel (voir texte) pour les trois grandeurs A , N et L , pour les trois réplicats de chacune des conditions C1 et C7. L'incertitude représente un écart-type. L'incertitude sur le temps de décalage t_0 est estimée à 1 heure.

Condition	Exp	t_0 [h]	A_0	τ_A [h]	χ_A^2	N_0	τ_N [h]	χ_N^2	L_0 [mm]	τ_L [h]	χ_L^2
C1	1	0	$2,03 \pm 0,46$	$2,09 \pm 0,12$	3,2	$1,07 \pm 0,35$	$1,68 \pm 0,08$	7,4	$0,84 \pm 0,30$	$2,03 \pm 0,13$	5,7
	2	0,9	$3,01 \pm 0,54$	$2,15 \pm 0,10$	8,2	$1,60 \pm 0,50$	$1,63 \pm 0,06$	7,7	$0,91 \pm 0,31$	$1,95 \pm 0,11$	3,9
	3	0	$2,38 \pm 0,48$	$2,03 \pm 0,11$	2,8	$1,21 \pm 0,37$	$1,57 \pm 0,07$	6,3	$0,88 \pm 0,31$	$1,92 \pm 0,12$	5,5
C7	1	0,3	$2,06 \pm 0,45$	$2,13 \pm 0,11$	3,1	$2,07 \pm 0,58$	$1,62 \pm 0,06$	9,4	$0,41 \pm 0,15$	$1,87 \pm 0,11$	11,0
	2	0,3	$2,42 \pm 0,44$	$1,98 \pm 0,09$	3,5	$1,57 \pm 0,43$	$1,51 \pm 0,05$	1,3	$0,76 \pm 0,25$	$1,85 \pm 0,10$	6,8
	3	0,3	$2,40 \pm 0,49$	$2,00 \pm 0,10$	4,0	$1,19 \pm 0,35$	$1,55 \pm 0,05$	8,2	$0,70 \pm 0,24$	$1,82 \pm 0,10$	8,0

Les valeurs des paramètres d'ajustement des triplicats sont compatibles à un écart-type près au sein d'une même condition (tableau 3.1). On peut alors comparer les ajustements moyens afin de confronter les deux conditions C1 et C7. Le paramètre le plus représentatif de la croissance est τ , dont les valeurs sont synthétisées dans le tableau 3.2. Les résultats indiquent que ces paramètres sont compatibles à un écart-type près entre les deux conditions, pour les trois grandeurs A , N et L respectivement. Ainsi, l'éclairage utilisé dans notre dispositif ne semble pas avoir d'effet sur la croissance du mycélium au cours des 20 premières heures de croissance, est peut être considéré comme neutre.

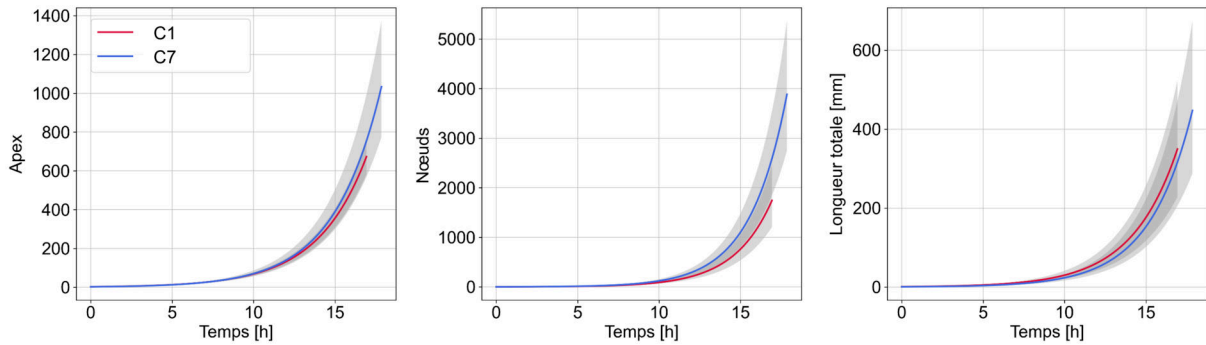


FIG. 3.3 – Ajustements moyens de A , N et L , calculés à partir des ajustements respectifs des trois réplicats pour chacune des conditions C1 (standards) et C7 (obscurité). La surface grise représente un écart-type. Voir tableau 3.2 pour les valeurs.

TAB. 3.2 – Valeurs des paramètres τ moyens extraits des ajustements de A , N et L pour les expériences C1 (standards) et C7 (obscurité). L'incertitude indiquée représente un écart-type.

Condition	$\hat{\tau}_A$ [h]	$\hat{\tau}_N$ [h]	$\hat{\tau}_L$ [h]
C1	$2,09 \pm 0,06$	$1,62 \pm 0,04$	$1,96 \pm 0,07$
C7	$2,02 \pm 0,06$	$1,56 \pm 0,03$	$1,84 \pm 0,06$

3.3.2 Influence de la source de carbone

La deuxième condition de croissance étudiée est une expérience où la source de carbone du milieu de culture est modifiée, afin de quantifier si la croissance du mycélium en est affectée au cours des 20 premières heures suivant la germination. En conditions standards, le milieu contient de la dextrine, un polysaccharide obtenu par hydrolyse de l'amidon. Dans cette expérience notée C8, la dextrine est remplacée par du glucose dans des proportions identiques (voir section 2.1.2, p. 62).

Une procédure similaire à celle présentée ci-dessus pour la condition C7 est appliquée ici. Sur la figure 3.4, seuls les ajustements moyens sont représentés, avec les valeurs des paramètres résumées dans le tableau 3.3. Les valeurs détaillées pour chaque expérience sont présentées dans l'annexe C, p. 237. La comparaison des taux de croissance moyens entre les conditions C1 et C8 ne permet pas de mettre en évidence de différences, en considérant une incertitude d'un écart-type.

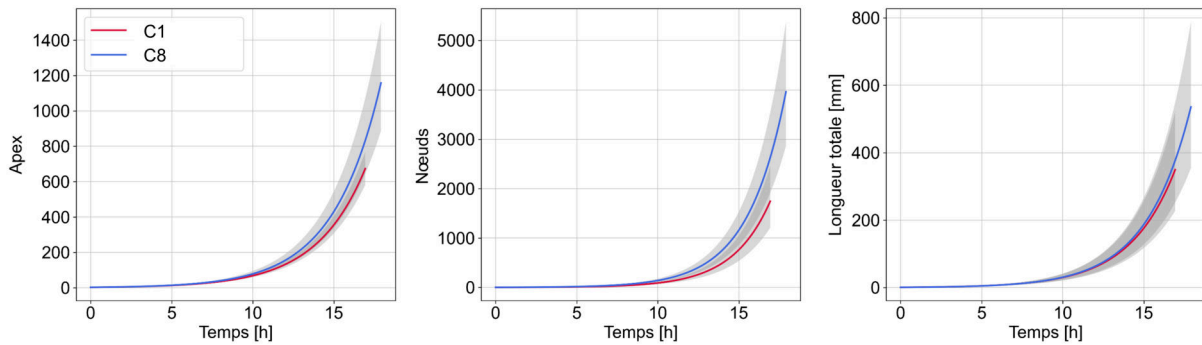


FIG. 3.4 – Ajustements moyens de A , N et L , calculés à partir des ajustements respectifs des trois réplicats pour chacune des conditions C1 (standards) et C8 (glucose). La surface grise représente un écart-type. Voir tableau 3.3 pour les valeurs.

TAB. 3.3 – Valeurs des paramètres τ moyens et A_0 , N_0 et L_0 moyens, extraits des ajustements de A , N et L pour les expériences C1 (standards), C8 (glucose) et C9 (asque). L'incertitude indiquée représente un écart-type.

Condition	\hat{A}_0	$\hat{\tau}_A$ [h]	\hat{N}_0	$\hat{\tau}_N$ [h]	\hat{L}_0 [mm]	$\hat{\tau}_L$ [h]
C1	$2,42 \pm 0,28$	$2,09 \pm 0,06$	$1,24 \pm 0,22$	$1,62 \pm 0,04$	$0,88 \pm 0,18$	$1,96 \pm 0,07$
C8	$2,61 \pm 0,28$	$2,02 \pm 0,06$	$2,04 \pm 0,32$	$1,56 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,16$	$1,84 \pm 0,06$
C9	$10,20 \pm 1,12$	$2,17 \pm 0,06$	$4,51 \pm 1,32$	$1,70 \pm 0,04$	$2,33 \pm 0,34$	$2,06 \pm 0,07$

3.3.3 Influence du nombre initial d'ascospores

Chez *P. anserina*, les ascospores sont éjectées des asques généralement par groupe de quatre individus, liés entre eux par un filament d'actine (voir section 1.4.1, p.49) [10]. Dans cette expérience, le point de départ est constitué par quatre ascospores issues d'un même asque, contrairement à la condition standard C1 où une unique ascospore est isolée (figure 3.5). Les

quatre ascospores sont récupérées directement sur la boîte de Petri sur laquelle l'expérience va se dérouler : leurs positions ne sont pas modifiées par l'opérateur. Cette condition de croissance est notée C9 (voir section 2.2.3, p. 67).

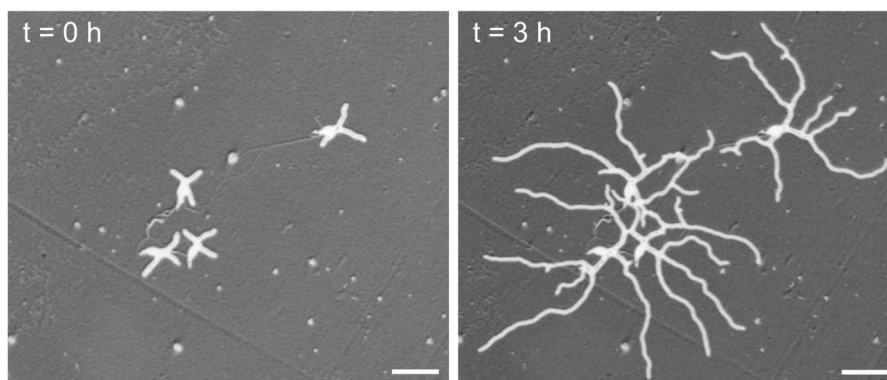


FIG. 3.5 – À gauche, première image d'une expérience initiée avec quatre ascospores issues d'un même asque. À droite, les quatre ascospores ont chacune développé un mycélium après 3 h de croissance. Barres d'échelle : 100 μm .

Les courbes obtenues par l'ajustement des points expérimentaux pour A , N et L sont représentées sur la figure 3.6 en échelle logarithmique, et les valeurs des paramètres moyens sont synthétisées dans le tableau 3.3. Les droites sont relativement parallèles, en accord avec les valeurs des taux de croissance comparables entre les conditions C1 et C9 à un écart-type près. En revanche, les conditions initiales sont différentes, puisque l'expérience C9 est initiée avec quatre ascospores : A_0 , N_0 et L_0 sont multipliés par quatre environ par rapport à C1. Cet écart initial est clairement mis en évidence par le décalage initial des droites selon l'axe des ordonnées.

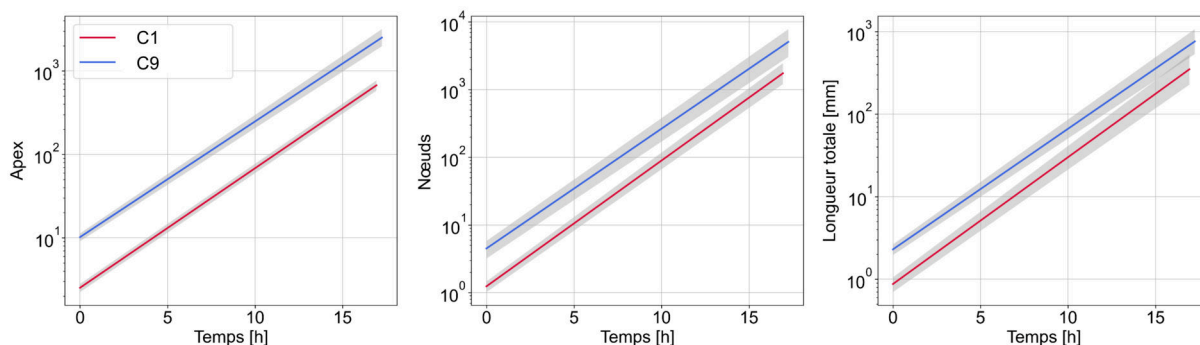


FIG. 3.6 – Ajustements moyens de A , N et L , calculés à partir des ajustements respectifs des trois réplicats pour chacune des conditions C1 (standards) et C9 (asque). La surface grise représente un écart-type. Voir tableau 3.3 pour les valeurs.

3.4 Article

La partie suivante est présentée sous la forme d'un article à soumettre à PLOS Biology, intitulé « Characterization of spatio-temporal dynamics of the constrained network of the filamentous fungus *Podospora anserina* using a geomatics-based approach ». Ce travail a été réalisé en collaboration avec Cécilia Bobée, géomaticienne au laboratoire. Les auteurs de cet article sont : Clara Ledoux, Cécilia Bobée, Éva Cabet, Pascal David, Frédéric Filaine, Sabrina Hachimi, Christophe Lalanne, Gwenaël Ruprich-Robert, Éric Herbert et Florence Chapeland-Leclerc.

Cette étude s'intéresse à la caractérisation du mycélium de *P. anserina* dans six conditions de croissance, nommées « condition 1 to 6 » dans l'article, et notées « C1 à C6 » dans ce manuscrit pour plus de clarté. La condition de référence dite « standard » correspond à C1. Les conditions de stress sont : milieu pauvre M0 (C2), stress osmotique lié à la présence de KCl dans le milieu (C3), contrainte lumineuse (C4), stress de température faible (C5) et élevée (C6). Les paramètres de ces conditions de culture sont détaillés dans l'article ci-dessous et dans la section 2.2.3, p. 67. Un rapide résumé des résultats est donné ci-après.

À l'issue de la procédure d'ajustement exponentiel appliquée à toutes les expériences, les taux de croissance sont comparés les uns par rapport aux autres. Néanmoins, les valeurs étant proches les unes des autres, cette approche se révèle insuffisante pour distinguer les mycéliums sans ambiguïté, et quantifier les dynamiques de croissance propres à chacun. Les images des réseaux mettent pourtant clairement en évidence des différences d'architecture du mycélium (voir annexe B, p. 235). Une méthode complémentaire est alors employée : l'analyse des surfaces délimitées par les hyphes, ou surfaces intra-thalles, définies dans l'introduction (voir section 1.4.2, p. 52). Cette approche géomatique offre l'avantage de proposer des grandeurs quantitatives et dynamiques, dont l'analyse combinée permet de caractériser spécifiquement le réseau issu de chaque condition. On travaillera notamment avec le nombre de surfaces intra-thalles, la somme de ces surfaces (aire totale), ou la densité d'hyphes.

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

3.5 Discussion

Nous nous sommes intéressés dans cette section à l'organisation du réseau mycélien de *P. anserina*, en tant que conséquence de la condition de culture. Bien que des différences d'architecture aient été mises en évidence d'une condition à l'autre, le comportement du mycélium reste probablement très différent de celui observé dans son environnement naturel, dans lequel les ressources sont inégalement réparties, et les conditions de température, d'humidité ou de lumière sont en permanente fluctuation [73].

Des ajustements exponentiels sont effectués à partir des données expérimentales pour le nombre d'apex A , le nombre de nœuds N , et la longueur totale L , afin de comparer les paramètres extraits d'une condition à l'autre, notamment le taux de croissance. La complexification rapide du réseau ne donne accès qu'à une phase initiale de la croissance mycélienne (environ les 20 premières heures). Au-delà de cette durée, la détection des hyphes individuelles est compromise du fait de la densité importante du réseau. La phase de croissance exponentielle est clairement identifiable sur l'intervalle de temps étudié. Les points expérimentaux les plus tardifs s'en éloignent, laissant supposer l'initiation d'une phase de ralentissement, suivie d'une phase stationnaire non observable ici.

Plusieurs conditions de croissance ont été étudiées en suivant une procédure identique. Tout d'abord, si l'analyse des expériences dans l'obscurité (C7) semble indiquer que la dynamique du mycélium est similaire à la référence (C1), on notera cependant que la lumière est une source d'information pour les champignons [162]. Par exemple, la sensibilité à la lumière est importante chez *P. anserina* pour l'orientation des périthèces [10], qui se développeront sur des échelles de temps bien plus longues que celles de nos expériences. De la même manière, l'utilisation du glucose comme source de carbone (C8) en remplacement de la dextrine ne semble pas induire de perturbations majeures du mycélium sur les premières heures de croissance. Cependant, un tel milieu diminue significativement la fertilité de *P. anserina*, phénomène qui ne sera observable qu'après plusieurs jours de croissance [10]. De plus, la membrane de cellophane recouvrant le milieu afin de maintenir la croissance en deux dimensions est partiellement consommée par *P. anserina*, puisque les hyphes percent ce support après 2 à 3 jours de croissance [10]. Les répercussions sur le mycélium propres à différentes sources de carbone pourraient ainsi être légèrement masquées par la présence de la cellophane. Une membrane alternative composée de polycarbonate [134] a été testée, mais la qualité des images s'en est trouvée nettement diminuée, du fait de l'opacité et de la nature « granuleuse » de ce support. Enfin, une expérience avec quatre ascospores issues d'un même asque a été menée (C9). Cette configuration peut se retrouver dans la nature. Contrairement à l'hypothèse intuitive selon laquelle les grandeurs A , N et L seraient multipliées par quatre, il semblerait que le mycélium issu de la germination de quatre ascospores initialement proches se comporte de manière similaire à celui développé à partir d'une unique ascospore. Seul le décalage initial lié à la présence de davantage de matériel biologique semble différencier ces deux conditions.

Dans l'article présenté dans ce chapitre, les cinq contraintes de croissance (C2 à C6) analysées en comparaison avec la condition de référence (C1) ont présenté des taux de

croissance relativement proches, limitant alors la distinction rigoureuse des mycéliums. L'approche complémentaire relative aux surfaces intra-thalles a permis de quantifier des caractéristiques de croissance propres à chaque réseau mycélien.

Par ailleurs, les expériences détaillées jusqu'ici ont été menées de telle sorte que la contrainte soit appliquée pendant toute la durée de l'acquisition d'images. Il peut s'avérer également intéressant d'observer l'impact de stress ponctuels sur la croissance, afin de déterminer par exemple si, suite à la contrainte, le mycélium récupère la dynamique de croissance initiale, et dans quels délais [158]. Nous avons réalisé deux expériences en ce sens, en appliquant une contrainte lumineuse dont on a pu constater l'effet sur la croissance (voir section 3.4, p. 80, condition C4) pendant 2 ou 4 heures, suite à 6 heures de croissance en conditions standards. Trois réplicats ont été effectués pour chacune ; un exemple pour un réplicat est donné sur la figure 3.7, représentant l'évolution temporelle de L . On constate un léger ralentissement de la croissance associé au déclenchement du stress, mais dans les deux cas, la dynamique de croissance semble reprendre de manière similaire à la condition standard (droite rouge) après environ 2 heures d'exposition à la lumière intense. On peut supposer que la durée d'exposition au stress est trop courte pour impacter significativement la croissance du mycélium. On peut également envisager que le mycélium mette en place des mécanismes adaptatifs lui permettant de se protéger du rayonnement. Par exemple, *P. anserina* produit de la mélanine, un pigment protecteur des hyphes contre les dommages engendrés par les rayonnements [163] [164]. D'autres stress ponctuels pourraient être envisagés, comme une contrainte de température, sur l'exemple d'études chez *N. crassa*, où les effets de variations brutales de températures ont été étudiés [165].

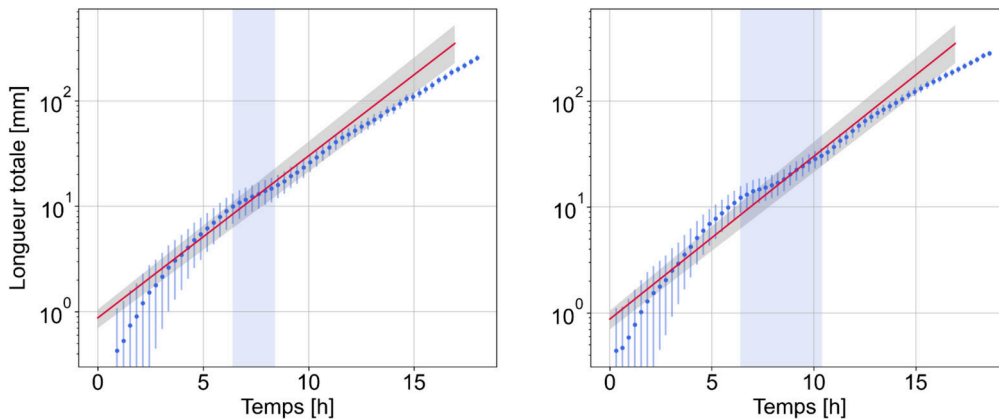


FIG. 3.7 – Évolution de L en échelle logarithmique pour une expérience avec un stress lumineux de 2 h (à gauche) ou de 4 h (à droite). Les points expérimentaux sont marqués en bleu ainsi que les barres d'erreur. La durée pendant laquelle l'éclairage intense est appliqué est délimitée par la surface bleu. La droite rouge représente l'ajustement exponentiel moyen de l'expérience C1, avec l'incertitude associée en gris (un écart-type).

Chapitre 4

Organisation et dynamique des hyphes

4.1	Introduction	101
4.1.1	Description qualitative du réseau mycélien	102
4.1.2	Mesures sur les images du mycélium	105
4.2	Vitesses de croissance	105
4.2.1	Procédure de relevé des coordonnées des apex	106
4.2.2	Branchement apical : apex exploratoire a_e	107
4.2.3	Branchement apical : apex d'exploitation a_o	108
4.2.4	Branchement latéral : apex a_{lat}	112
4.2.5	Synthèse	114
4.2.6	Discussion	116
4.3	Répartition des branchements le long de l'hyphe	118
4.3.1	Procédure de relevé des points	118
4.3.2	Branchements apicaux	120
4.3.3	Branchements latéraux	124
4.3.4	Répartition des nœuds apicaux et latéraux	127
4.3.5	Synthèse et discussion	129
4.4	Interactions entre les hyphes	134
4.4.1	Comportements d'un apex à proximité d'une hyphe	134
4.4.2	Point de contact entre les hyphes	135
4.4.3	Autotropisme négatif : dynamique d'évitement entre deux hyphes	140
4.4.4	Synthèse et discussion	144
4.5	Conclusion	147

4.1 Introduction

Le mycélium est une structure difficile à appréhender dans la mesure où sa croissance est indéterminée et sans limites dans le temps ou l'espace. La seule unité de référence est l'hyphe, qui croît et crée de nouvelles interactions avec ses voisines en permanence [30] [120] [2]. L'ensemble des hyphes forme ainsi un réseau vivant dynamique et complexe, et dont l'évolution

est déterminée par le comportement individuel de chaque hyphe ainsi que par l'arrangement de ces filaments entre eux [31] [18]. L'étude de la dynamique du mycélium nécessite alors l'analyse des propriétés locales des hyphes, dont les variations affectent l'ensemble de la structure.

La résolution des images nous donnant accès à la dynamique des hyphes individuelles, on s'intéresse dans cette partie à leurs vitesses de croissance d'une part, au processus de branchement d'autre part, et enfin, à leurs comportements lorsqu'elles se trouvent à proximité les unes des autres, et entrent éventuellement en contact.

4.1.1 Description qualitative du réseau mycélien

L'observation des images du mycélium en croissance révèle une extension des hyphes globalement rectiligne et radiale à partir de l'ascospore, qui constitue ainsi le point central du réseau. Elles sont également capables de bifurquer, notamment lorsqu'elles entrent dans le voisinage d'autres filaments de la colonie.

Branchements apicaux et latéraux

Les hyphes des champignons filamenteux présentent la capacité de pouvoir se ramifier. Le branchement est un processus simple à l'origine de la complexité morphologique du mycélium. Les ramifications augmentent la surface occupée par les hyphes, favorisant ainsi l'absorption de nutriments et les fusions éventuelles suite à la rencontre d'un apex avec la paroi d'une hyphe. Pour les modes de vie immobiles, il s'agit d'un moyen simple et efficace pour coloniser l'espace et accéder aux ressources dispersées [166] [167] [168].

Les branchements de *P. anserina* peuvent être de deux types différents : les branchements apicaux et les branchements latéraux. Les branchements apicaux se produisent au niveau d'un apex, qui donne naissance à deux nouvelles extrémités, et permettent l'exploration du milieu. Les branchements latéraux émergent le long de l'hyphe en amont de l'apex en croissance, et participent à la densification du réseau (figure 4.1). Ces deux types de ramification ont été observés chez de nombreux champignons filamenteux, dont *N. crassa* par exemple [166] [169] [73].

Les hyphes issues des branchements latéraux sont capables de réaliser à leur tour des branchements apicaux ou latéraux. Ces événements restent néanmoins plus rarement observés dans la mesure où la croissance de ces branches est rapidement interrompue lorsque l'apex crée une anastomose en rencontrant une autre hyphe (processus de fusion), ou lorsque l'apex s'arrête spontanément (voir 4.4.1, p. 134).

Branchements subapicaux

De nombreuses espèces de champignons filamenteux, parmi lesquelles *P. anserina* et *N. crassa*, présentent une particularité au niveau de leurs branchements à l'apex, qui sont nommés « subapicaux » [170]. Ce type de ramifications se caractérise par le fait que l'émergence des deux nouveaux apex n'est pas simultanée. Lorsque le nouvel apex apparaît, celui de l'hyphe

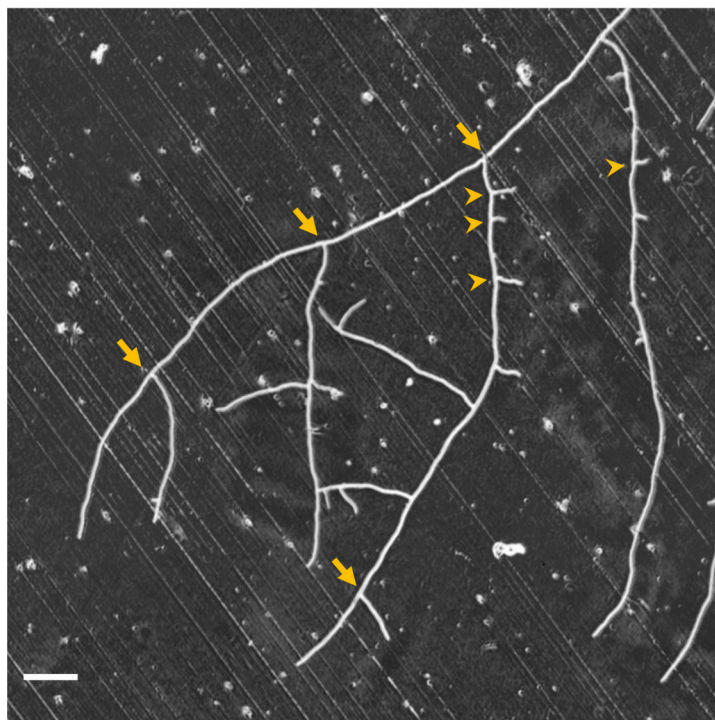


FIG. 4.1 – Les branchements apicaux qui se produisent à l’extrémité de l’hyphe sont indiqués par les flèches. Les branchements latéraux qui émergent à distance de l’apex sont indiqués par les pointes de flèche. Barre d’échelle : 100 μm .

mère a déjà dépassé le point de branchement (figure 4.2). Ce processus sera détaillé dans la section 4.3.2, p.120. De plus, comme le montre la figure 4.2, ce type de branchement produit généralement une hyphe qui suit la direction de l’hyphe mère, et une autre qui dévie significativement. Dans notre article [149] (voir section 5.2, p.151), nous avons respectivement nommé ces branches *hyphe exploratoire* et *hyphe d’exploitation*, et nous nous appuyerons sur ces appellations tout au long du manuscrit.

Les branchements « réellement apicaux », pour lesquels les deux apex apparaissent simultanément au niveau du nœud, sont nommés par certains auteurs « branchements dichotomiques » [171] [166]. Ce type de branchements existe chez *P. anserina* (figure 4.2) et *N. crassa*, mais est cependant beaucoup plus rare que les branchements subapicaux [170]. Nous utiliserons indifféremment les termes de « branchement apical » ou de « branchement subapical » pour la suite les analyses concernant le mycélium de *P. anserina*.

Autotropisme

La capacité de réorientation des hyphes en réponse à des indices extérieurs est essentielle au développement du mycélium. En effet, les hyphes sont rarement isolées et doivent être capables de réagir à la présence de sources de nutriments ou de compétiteurs par exemple [172]. En outre, l’orientation des hyphes est indispensable à la pénétration des tissus hôtes pour les espèces pathogènes. *Cochliobolus sativus* est par exemple un champignon ascomycète phytopathogène qui est capable de s’étendre en direction des racines de l’orge avant de les infecter. De plus, des

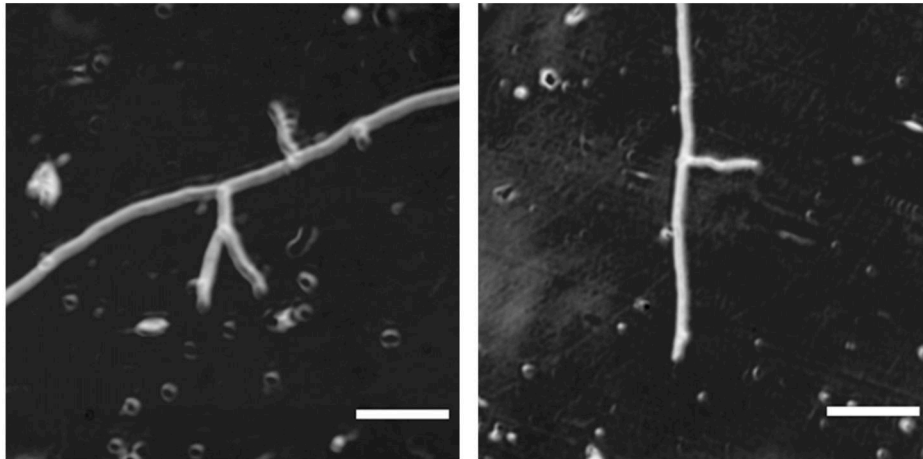


FIG. 4.2 – À gauche, un branchement dichotomique ; à droite, un branchement subapical chez *P. anserina* (barres d'échelle : 100 μm).

mutants du pathogène humain *C. albicans* présentant des défauts d'orientation se sont révélés moins performants pour pénétrer et endommager les cellules hôtes. L'orientation est également essentielle pour les espèces mycorhiziennes, dont les hyphes naviguent entre les cellules des racines, et doivent coordonner leur croissance avec celle des tissus végétaux [22].

Au sein du mycélium, l'orientation d'une hyphe est influencée par les hyphes voisines, avec lesquelles elle peut présenter des comportements d'attraction ou d'évitement, appelés autotropisme positif ou négatif respectivement (figure 4.3). Le phénomène d'attraction mène généralement au contact entre deux hyphes et peut alors aboutir soit à un chevauchement, soit à une anastomose [4] [22].

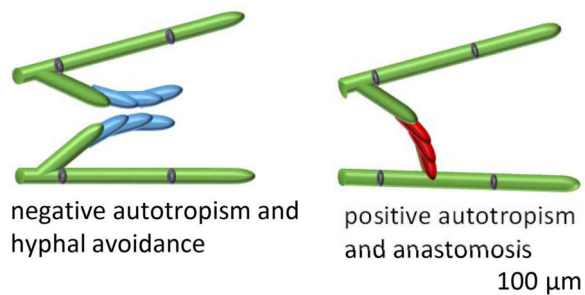


FIG. 4.3 – L'autotropisme négatif se traduit par un évitement entre les hyphes en croissance. L'autotropisme positif (lorsque les hyphes s'attirent) peut aboutir à une anastomose [73].

Les anastomoses interviennent chez la plupart des ascomycètes, et peuvent se produire entre deux apex, ou bien lorsqu'un apex est au contact de la paroi d'une hyphe. Dans les colonies matures, les anastomoses ont lieu principalement dans la région centrale du thalle. Suite au contact des deux hyphes, les parois sont remodelées, les membranes fusionnent, et les cytoplasmes respectifs se mélangent [173] [174] [12]. Ce processus est à l'origine, d'une part, du renforcement de l'architecture, de la résilience et de l'homéostasie du réseau, en permettant une meilleure circulation du cytoplasme et des signaux. D'autre part, les anastomoses initient le développement des structures reproductives à partir d'agrégats de plusieurs hyphes [166] [73] [173]. Sur nos images des premières heures de croissance du mycélium de *P. anserina*, seules des anastomoses entre un apex et une hyphe ont

été observées. Les fusions entre deux apex ont largement été décrites, notamment avec l'exemple des « conidial anastomosis tubes » (CATs) de *N. crassa*. Ces filaments issus de la germination de conidies sont attirés les uns par les autres et fusionnent par leurs apex, permettant ainsi de construire rapidement un mycélium connecté [22] [172]. En revanche, les anastomoses entre un apex et la paroi d'une hyphe sont moins décrites.

Au niveau du front de croissance du mycélium, les hyphes semblent s'éviter les unes les autres : elles dévient de leur trajectoire initiale, et le contact n'a pas lieu. Ce comportement pourrait favoriser l'exploration optimale de l'environnement : les hyphes tendraient ainsi à se répartir de manière à coloniser les nouvelles surfaces, et à ne pas toutes exploiter la même région [4] [74].

4.1.2 Mesures sur les images du mycélium

Les analyses sont faites à partir de collections d'images du mycélium de la souche sauvage de *P. anserina* en croissance en conditions standards (voir section 2.2.3, p.67), excepté mention contraire. Les expériences sont menées en microscopie en champ clair : l'échantillon est éclairé par une source lumineuse située sous ce dernier (voir section 2.2.1, p.64). La lumière incidente étant diffusée par la courbure des hyphes agissant comme un prisme, le mycélium apparaît en plus sombre sur les images. Sur les figures présentées ici, les intensités de gris ont été inversées, laissant apparaître le mycélium en blanc, afin de faciliter les relevés de points sur les images.

Le diamètre typique d'une hyphe est de 7 px, soit $11\ \mu\text{m}$ (avec une résolution des images de $1,6\ \mu\text{m}\cdot\text{px}^{-1}$). On rappelle que ce diamètre est néanmoins surestimé du fait de la diffusion du faisceau lumineux au niveau des hyphes. Le diamètre réel des hyphes, mesuré sur des images en fluorescence, se situe autour de $5\ \mu\text{m}$ (voir section 6.1.3, p.201).

Dans toute cette partie, l'incertitude sur la durée (ou l'intervalle de temps) est estimée comme la durée nécessaire pour effectuer l'acquisition de toutes les images constituant le panorama, qui est généralement composé de 12 tuiles. La durée comprenant l'acquisition de l'image et le déplacement jusqu'à la tuile suivante est de 4 secondes. Excepté mention contraire, l'erreur sur le temps est donc évaluée à : $\sigma_t = 48\ \text{s}$. L'incertitude sur les longueurs mesurées par relevés de coordonnées de points est estimée à un demi-diamètre d'hyphe, soit $\sigma_l = 3\ \text{px}$ ($5\ \mu\text{m}$).

4.2 Vitesses de croissance

Dans cette section, les analyses portent sur les vitesses de croissance à l'échelle de l'hyphe individuelle principalement. Les vitesses d'extension des hyphes seront déterminées par le biais de relevés de la position de l'apex sur les images successives. Trois types d'apex sont ici analysés : les deux apex issus d'un branchement apical, et l'apex issu d'un branchement latéral.

Ces deux types de ramification sont considérés comme strictement différents, et des paramètres de différenciation seront discutés par la suite.

4.2.1 Procédure de relevé des coordonnées des apex

Les apex sont nommés spécifiquement en fonction de leur nature. Comme évoqué précédemment, l'hyphes suivant la direction de l'hyphes mère est l'hyphes exploratoire (« exploratory hypha »), et l'autre branche est l'hyphes d'exploitation (« operating hypha »). Les apex aux extrémités de ces branches sont nommés a_e et a_o , pour « exploratory » et « operating » respectivement. Les apex issus de branchements latéraux sont notés a_{lat} (figure 4.4).

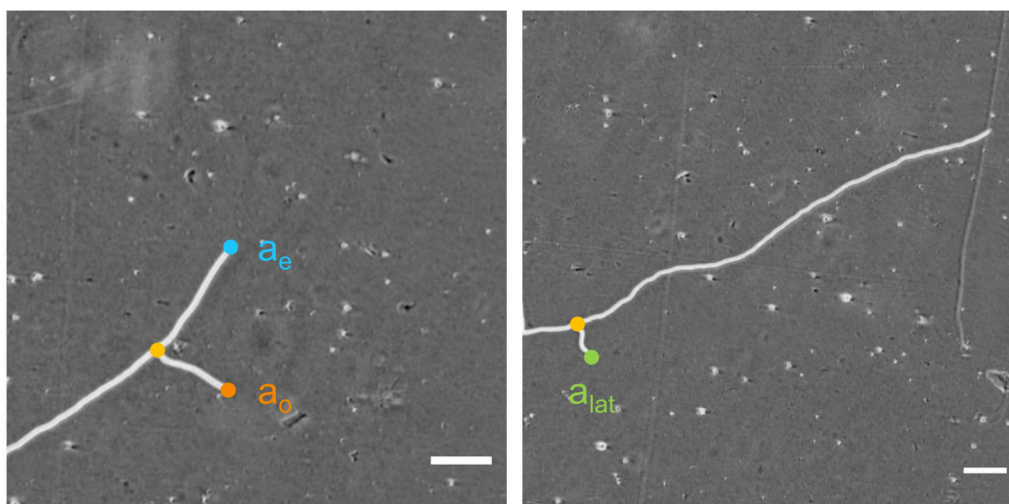


FIG. 4.4 – À gauche, un branchement apical, avec l'apex « exploratory » a_e en bleu et l'apex « operating » a_o en orange. À droite, un branchement latéral dont l'apex a_{lat} est marqué en vert. Les noeuds sont représentés par des points jaunes. Barres d'échelle : 100 μm .

Les mesures de vitesses sont réalisées à partir de collections d'images du mycélium en croissance en conditions standards. Les images sont enregistrées toutes les 4 minutes. Cette durée est inférieure à celle utilisée habituellement (environ 18 minutes, voir section 3, p. 73), notamment afin d'obtenir une meilleure résolution temporelle sur la dynamique des apex au moment du branchement.

Les coordonnées successives des apex sont relevées à l'aide du logiciel ImageJ et d'une macro développée spécifiquement (figure 4.5). Les distances mesurées sont des longueurs euclidiennes entre les points sélectionnés, et ne suivent donc pas la trajectoire exacte de l'hyphes. Les distances étant néanmoins très petites (environ deux diamètres d'hyphes au maximum), elles sont très proches des longueurs réelles. On réalise 20 suivis pour chaque type d'apex a_e , a_o et a_{lat} sur une durée typique de 3 à 4 heures. Le relevé des apex a_e débute environ 1 à 2 heures avant l'instant du branchement, afin d'étudier l'éventuel impact de celui-ci sur la vitesse de croissance. Le suivi des apex a_o et a_{lat} débute quant à lui dès l'apparition de l'apex au niveau du point de branchement. On considère qu'une nouvelle branche existe dès lors qu'elle émerge d'au moins 3 px (soit un demi-diamètre typique d'hyphes) par rapport à la paroi de

l'hyphe mère. Les relevés sont effectués jusqu'à ce que l'hyphe branche à nouveau, ou que l'apex s'arrête, ou bien qu'il rencontre une autre hyphe.

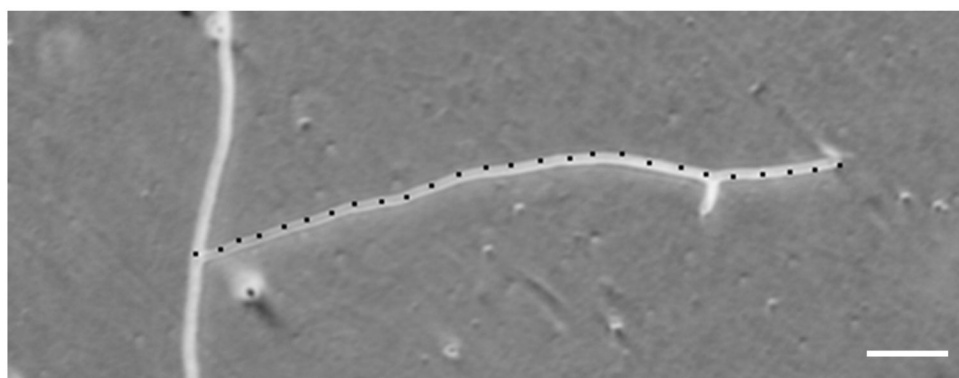


FIG. 4.5 – Les coordonnées de l'apex sont relevées sur chaque image successive à l'aide du logiciel ImageJ, et sont représentées ici par les points noirs (barre d'échelle : 100 μm).

4.2.2 Branchement apical : apex exploratoire a_e

On s'intéresse tout d'abord au comportement des apex a_e au cours du temps. Les dynamiques obtenues pour les 20 apex étudiés étant similaires, l'exemple d'un unique apex a_e sera détaillé ci-dessous.

L'évolution temporelle de la longueur de l'hyphe depuis le point initial du relevé est présentée sur la figure 4.6. Les suivis étant effectués indépendamment les uns des autres, le temps indiqué en abscisse est choisi de telle sorte que le moment du branchement propre à chaque hyphe soit le temps nul. De plus, la longueur est mesurée comme positive dès lors que l'apex a_e a dépassé le point de branchement. L'ensemble des points expérimentaux est ensuite traité à l'aide d'un filtre numérique Savitzky-Golay afin de lisser la courbe et d'en extraire la dérivée, soit l'évolution temporelle de la vitesse. Les paramètres du filtre sont un polynôme d'ordre 1 et une fenêtre glissante de trois points, ce qui revient à moyennner les trois points contigus.

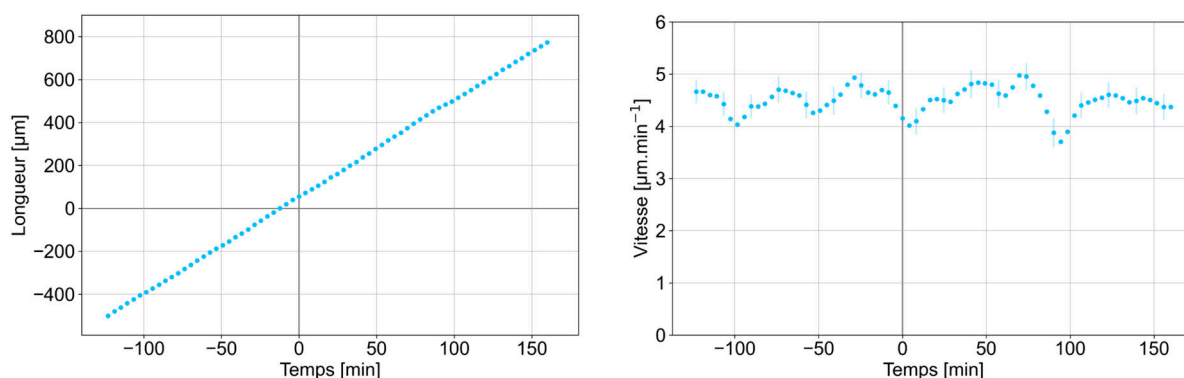


FIG. 4.6 – À gauche, longueur de l'hyphe a_e au cours du temps, avec $t = 0$ correspondant au moment du branchement. La longueur est positive lorsque le point de branchement est dépassé. Les barres d'erreur en abscisses et en ordonnées sont présentes mais de taille inférieure à celle du marqueur. À droite, vitesse V_{a_e} en fonction du temps, calculée à partir de la courbe des longueurs lissée.

Sur la figure 4.6, on n’observe pas de dérive temporelle de la vitesse de l’apex a_e , notée V_{a_e} . On estime la vitesse de cet apex comme la moyenne des vitesses successives mesurées, soit $V_{a_e} = 4,51 \pm 0,03 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. La même procédure de calcul de vitesse est appliquée pour les 20 relevés de trajectoires d’apex a_e , afin de déterminer une vitesse de croissance moyenne : $V_{a_e} = 4,592 \pm 0,008 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ (voir la figure synthèse 4.16).

Par ailleurs, on constate que le branchement intervenant lorsque $t = 0$ sur la figure 4.6 ne semble pas induire de perturbations particulières sur la dynamique de l’hyphe, telles qu’un ralentissement de croissance. Une diminution de la vitesse avant le branchement a pourtant été observée chez d’autres espèces fongiques, comme discuté dans la section 4.2.6, p.116. Afin de détecter d’éventuels phénomènes qui pourraient se produire lors du branchement chez *P. anserina* sur des durées inférieures à 4 minutes, un suivi est réalisé en augmentant la fréquence d’acquisition des images, qui sont alors enregistrées avec une période de 30 secondes. Les instants où se produisent des ramifications sont indiqués sur la figure 4.7 par des barres verticales. En prenant en compte les barres d’erreur associées aux points expérimentaux, la dynamique de croissance n’est pas spécifiquement altérée sur les périodes précédant ou suivant le branchement. La même procédure est appliquée pour trois autres expériences, et aboutit à une conclusion similaire. En se plaçant à la résolution des images dont nous disposons, les ralentissements éventuels n’apparaissent pas corrélés au processus de branchement.

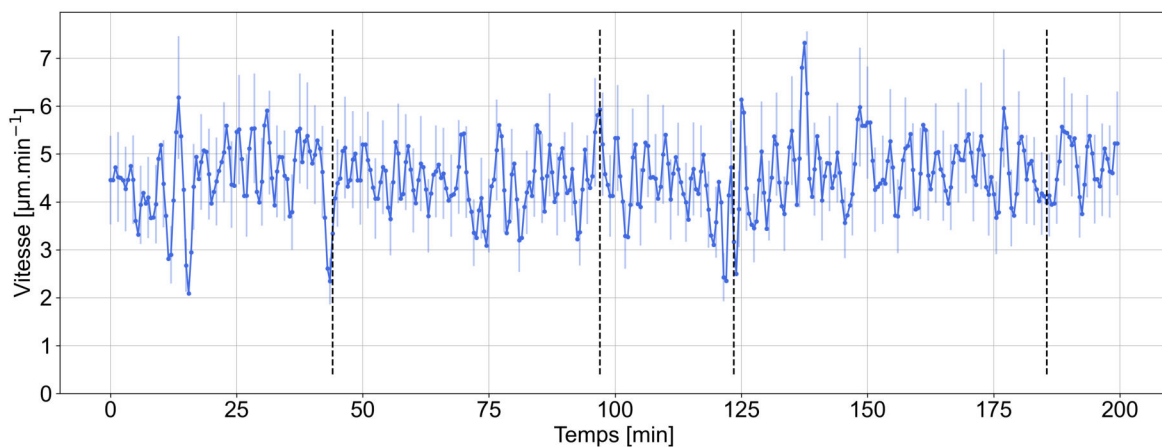


FIG. 4.7 – Vitesse en l’apex a_e en fonction du temps (après lissage de la courbe des longueurs par le filtre Savitzky-Golay). Les points expérimentaux sont reliés par une ligne. La période d’acquisition des images est ici de 30s. L’incertitude sur le temps σ_t est de 4s. Les barres d’erreur sont représentées tous les trois points. Les lignes verticales en pointillé indiquent les instants de branchement à 44, 97, 124 et 186min après le début du suivi.

4.2.3 Branchement apical : apex d’exploitation a_o

L’étude porte ensuite sur les apex a_o associés aux hyphes d’exploitation (« operating ») (figure 4.4). La procédure d’analyse est similaire à celle des apex a_e , et on s’appuiera également sur un exemple pour détailler l’analyse.

Sur la figure 4.8 est représentée l'évolution temporelle de la longueur de l'hyphe d'exploitation depuis le point de branchement. Contrairement au cas des apex a_e , les points expérimentaux ne présentent pas une allure tout à fait linéaire, notamment au début du suivi. Ce comportement est mis en évidence en représentant l'ajustement linéaire sur la deuxième moitié des points (droite noire). Les premiers points expérimentaux s'écartent clairement de la prolongation de cette droite (traits pointillés). Le coefficient de détermination R^2 , permettant de discuter la qualité de l'ajustement, est défini comme $R^2 = 1 - \frac{SS_r}{SS_t}$, avec SS_r la somme des carrés des écarts résiduels et SS_t la somme des carrés des écarts à la moyenne.

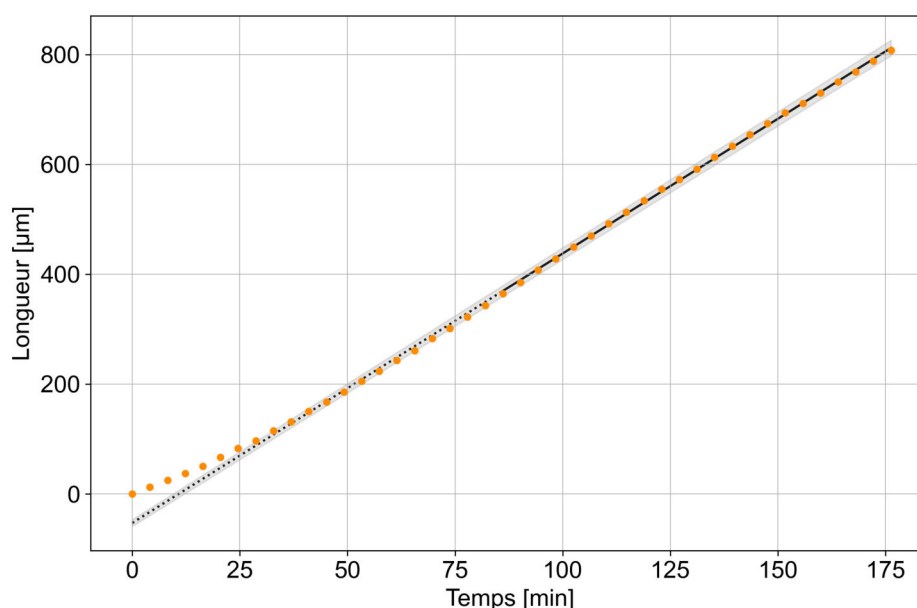


FIG. 4.8 – Longueur de l'hyphe a_o au cours du temps. L'instant initial correspond au moment du branchement. Les barres d'erreur sur les points expérimentaux sont inférieures à la taille des marqueurs. La deuxième moitié des points est ajustée avec une fonction affine (droite noire). La droite est prolongée (droite en pointillés). La surface grisée représente l'erreur associée à l'ajustement (un écart-type). $R^2 = 0,99$.

La représentation de la longueur en échelle logarithmique (figure 4.9) permet également de constater le comportement non linéaire au début de l'intervalle de temps étudié. Les deux droites noires en pointillés sont les droites de coefficient directeur 1, et normalisées sur le premier et le dernier point expérimental respectivement. Ces deux droites ont des ordonnées à l'origine différentes, et les points expérimentaux sont compris dans l'espace qu'elles délimitent. L'ensemble des points n'est donc pas aligné suivant une même droite en échelle linéaire, notamment du fait de la déviation prononcée des premiers points.

Après lissage des données avec le filtre Savitzky-Golay, la vitesse V_{a_o} est représentée sur la figure 4.10, et met en évidence la phase d'accélération initiale. Les points expérimentaux sont ajustés à l'aide de la fonction exponentielle

$$V_{a_o}(t) = V_0 (1 - \exp(-\tau t)) + \alpha$$

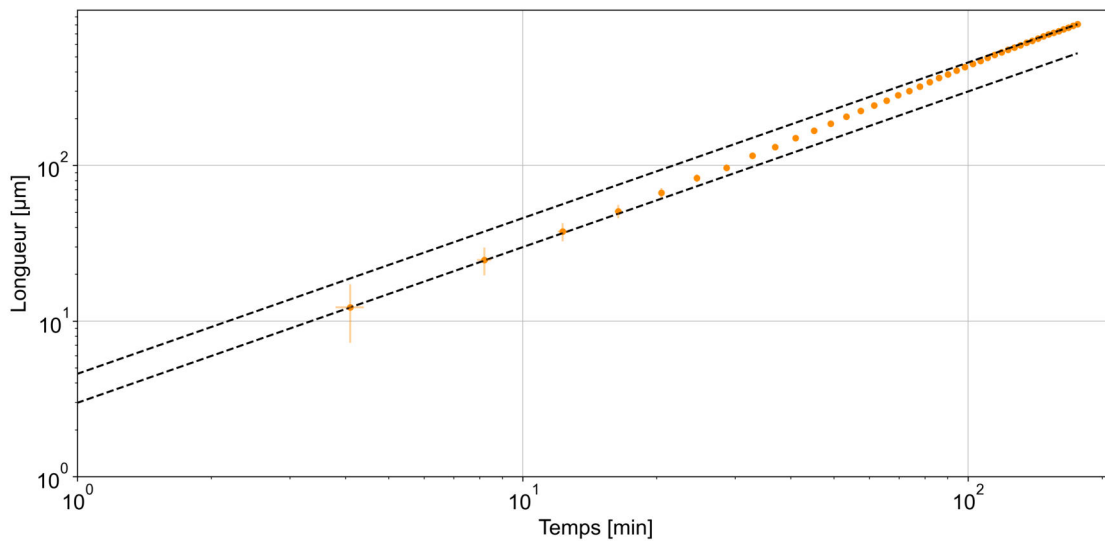


FIG. 4.9 – Longueur de l’hyphe a_o au cours du temps en échelle logarithmique. Les droites en pointillé ont pour coefficient directeur 1 et sont normalisées sur le premier et le dernier point expérimental respectivement.

avec $1/\tau$ la constante de temps, et V_0 la vitesse stationnaire. Le paramètre α permet de prendre en compte le décalage vertical des données, le point initial étant non nul. La vitesse de saturation obtenue à des temps élevés s’exprime donc comme $V_{sat} = V_0 + \alpha$. Pour cet apex, les paramètres de l’ajustement sont : $\tau = 0,035 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$, $V_{sat} = 4,96 \pm 0,23 \text{ µm.min}^{-1}$.

Afin d’estimer la durée de la phase d’accélération, on calcule le temps de latence t'_{a_o} pour lequel V_{a_o} vaut 90 % de la vitesse de saturation V_{sat} , c’est-à-dire : $V_{a_o}(t'_{a_o}) = 0,9 V_{sat}$. On obtient $t'_{a_o} = \frac{1}{\tau} \ln(10)$. Pour cet exemple, $t'_{a_o} = 66 \pm 4 \text{ min}$.

L’ajustement est réalisé pour les 20 suivis des apex a_o , et les coefficients de détermination R^2 sont compris dans la gamme 0,6 à 0,97. La moyenne des vitesses stationnaires obtenue est : $V_{sat} = 4,72 \pm 0,05 \text{ µm.min}^{-1}$; la moyenne des durées des phases d’accélération est $t'_{a_o} = 73,1 \pm 1,4 \text{ min}$.

La vitesse stationnaire des apex a_o ($V_{sat} = 4,72 \pm 0,05 \text{ µm.min}^{-1}$) et la vitesse des apex a_e ($V_{a_e} = 4,592 \pm 0,008 \text{ µm.min}^{-1}$) étant proches, on considèrera pour la suite une vitesse asymptotique moyenne typique pour les apex a_e et a_o issus de branchements apicaux : $V_{api} = 4,594 \pm 0,007 \text{ µm.min}^{-1}$.

Enfin, nous avons observé que la dynamique initiale des hyphes directement issues de la germination de l’ascospore semblait ralentie en comparaison avec des hyphes plus matures. Afin d’étudier la dynamique initiale précise du mycélium, la vitesse de chacune des premières hyphes issues de l’ascospore est analysée pour une des collections de panoramas. L’ascospore considérée ici donne naissance à trois hyphes, qui se ramifient très rapidement, et forment alors un mycélium constitué de six hyphes pour cet exemple. Les vitesses d’extension de ces dernières sont représentées au cours des 8 premières heures de croissance (figure 4.11). On constate l’existence d’une longue phase de latence durant laquelle les hyphes connaissent une période

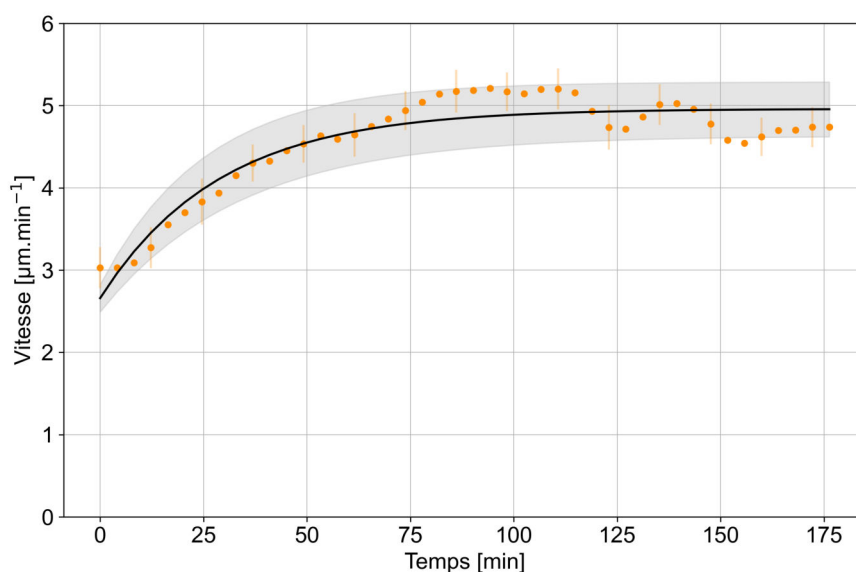


FIG. 4.10 – Vitesse de l’apex a_0 au cours du temps (après lissage de la courbe des longueurs). Les points expérimentaux sont ajustés avec la fonction $V_0(1 - \exp(-\tau t)) + \alpha$ (courbe noire). $1/\tau$ est la constante de temps, V_0 est la vitesse asymptotique, α correspond au décalage vertical des données. La surface grisée correspond à l’incertitude sur l’ajustement (un écart-type). $R^2 = 0,89$.

d’accélération, avant d’atteindre une vitesse stationnaire, dont la valeur semble cohérente avec la vitesse typique V_{api} (indiquée par la droite horizontale noire en pointillé sur la figure 4.11). Pour les six hyphes étudiées, la durée δt moyenne nécessaire pour atteindre 90 % de V_{api} est de $3\text{ h }40\text{ min} \pm 20\text{ min}$. On effectue pour chaque hyphe un ajustement linéaire de la vitesse $v(t) = at + b$ sur l’intervalle de temps δt . La moyenne des coefficients directeurs a extraits est de $0,012 \pm 0,005 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-2}$.

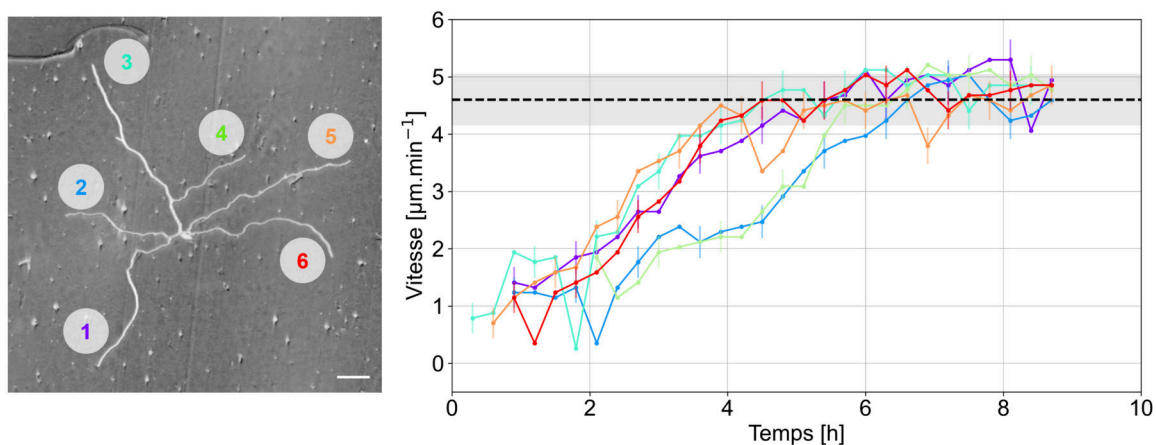


FIG. 4.11 – À gauche, image du mycélium après 5 h de croissance, dont les six premières hyphes sont numérotées (barre d’échelle : $100\mu\text{m}$). À droite, les vitesses individuelles des six apex sont représentées au cours du temps. Les couleurs correspondent à celles utilisées sur la figure de gauche et les points sont reliés pour plus de clarté. Le temps initial correspond à la première image enregistrée après la germination. La droite horizontale en pointillé indique la valeur moyenne de la vitesse V_{api} , avec l’écart-type de la distribution représenté par la surface grise.

4.2.4 Branchement latéral : apex a_{lat}

De manière similaire aux branchements apicaux, les dynamiques des apex a_{lat} issus de branchements latéraux sont analysées par l'étude de la longueur de l'hyphe et de sa vitesse $V_{a_{lat}}$ au cours du temps. Cependant, les branches latérales présentent des évolutions temporelles bien plus variables entre elles que les branches apicales, comme mis en évidence sur la figure 4.12, où les 20 hyphes analysées sont représentées. La moyenne des 20 points expérimentaux à chaque pas de temps est montrée en rouge.

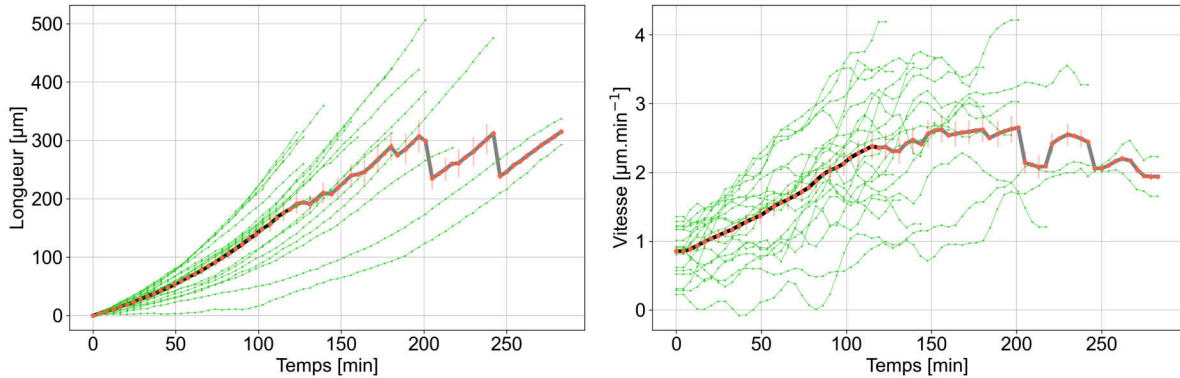


FIG. 4.12 – À gauche, longueurs des 20 hyphes latérales au cours du temps. Le temps initial correspond au moment du branchement pour chacune. Les points expérimentaux sont reliés pour plus de clarté (lignes vertes). Les points rouges correspondent à la moyenne des 20 échantillons avec les barres d'erreur représentées tous les deux points. La ligne noire indique la durée sur laquelle la moyenne est calculée avec la totalité de la collection. Au-delà, le suivi de certaines hyphes est déjà finalisé (ligne grise). À droite, vitesses $V_{a_{lat}}$ des 20 hyphes latérales (avec les mêmes conventions de représentation que pour les longueurs).

Globalement, deux comportements se distinguent : soit la courbe de la vitesse $V_{a_{lat}}$ semble passer par une phase de latence, puis atteindre un palier de saturation après accélération, comme pour les les apex a_o , soit l'apex connaît une phase d'accélération sur toute la durée du relevé. Deux exemples typiques de ces comportements sont représentés sur la figure 4.13. La suite de la dynamique n'est cependant pas accessible dans la mesure où les apex finissent par rencontrer une autre hyphe, mettant ainsi un terme au suivi.

Les données caractérisant la dynamique des apex a_{lat} étant limitées dans le temps, il est délicat de leur associer une vitesse stationnaire comme dans le cas des apex a_o . On choisit alors de considérer que les apex a_{lat} finissent par atteindre la vitesse V_{api} après un certain temps de latence $t'_{a_{lat}}$. Cette durée est estimée en prolongeant l'ajustement linéaire réalisé sur l'ensemble des points pour chaque suivi, comme montré pour l'exemple sur la figure 4.14, pour lequel $t'_{a_{lat}} = 300 \pm 10$ min. La moyenne des temps de latence sur les 20 relevés est : $t'_{a_{lat}} = 245 \pm 3$ min.

Par ailleurs, on cherche à étudier la relation éventuelle existant entre la vitesse de la branche latérale et la position du point de branchement sur l'hyphe. En particulier, la longueur entre

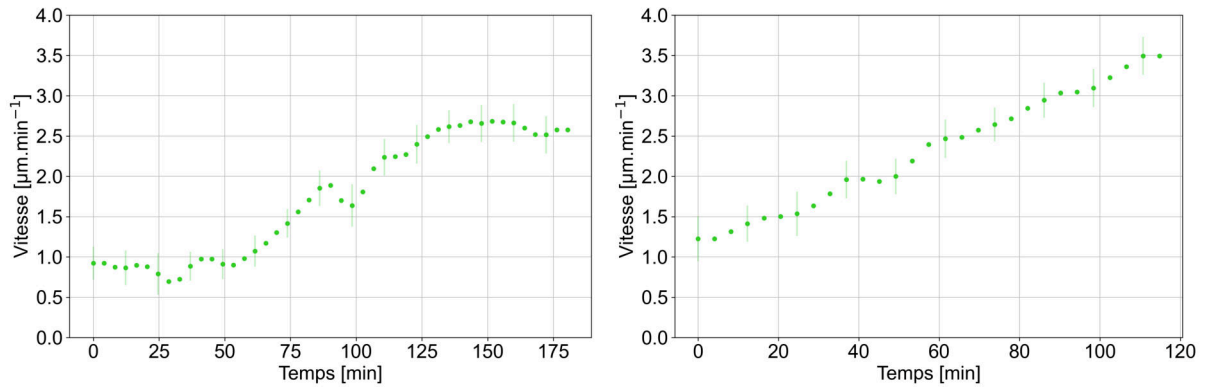


FIG. 4.13 – Deux exemples typiques d'évolution des vitesses d'hyphes latérales V_{alat} au cours du temps (après lissage de la courbe des longueurs). À gauche, la vitesse semble se stabiliser à 125 min environ ; à droite, la vitesse semble suivre une évolution croissante. Les barres d'erreur sont représentées tous les trois points.

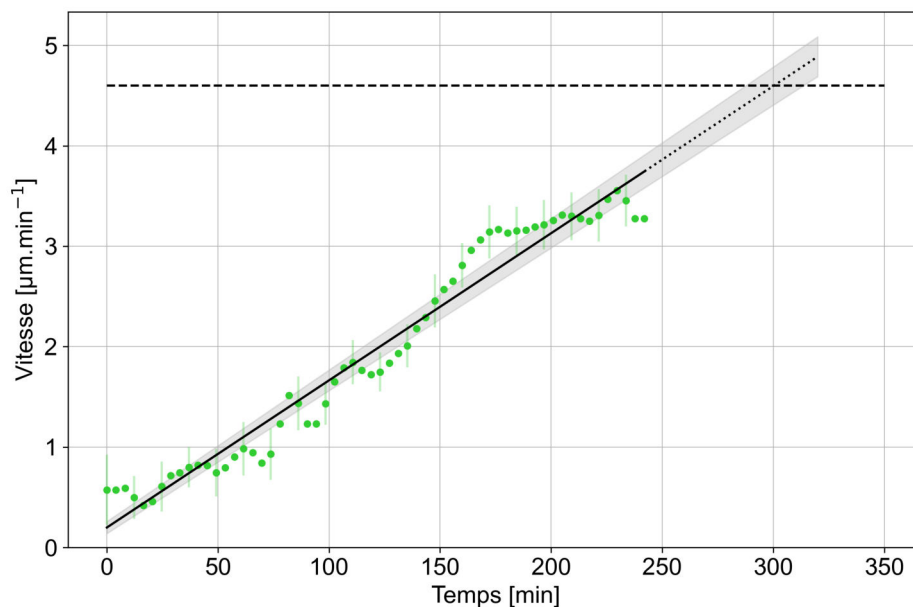


FIG. 4.14 – Vitesse V_{alat} au cours du temps (après lissage de la courbe des longueurs). Les points expérimentaux (verts) sont ajustés avec une fonction affine (droite noire). La droite est prolongée au-delà des points (droite en pointillé). La surface grisée représente l'erreur sur l'ajustement (un écart-type). La droite horizontale en pointillé a pour ordonnée V_{api} . Le temps de latence t'_{alat} nécessaire pour atteindre V_{api} depuis le moment du branchement vaut ici 300 ± 10 min.

l'apex de l'hyphes mère et le nœud latéral est systématiquement relevée au moment où apparaît la branche latérale (figure 4.15 A).

Pour les 20 échantillons, la vitesse de l'hyphes latérales est estimée par le biais d'un ajustement linéaire sur les longueurs, en se restreignant aux 115 premières minutes, qui correspondent à la durée totale du suivi le plus court (figure 4.12). De la même manière, l'accélération est extraite pour chaque hyphes par ajustement linéaire sur la vitesse.

La répartition des points sur la figure 4.15 B semble indiquer que les branches latérales les plus rapides sont celles positionnées les plus à proximité de l'apex de l'hyphes principale. Dans

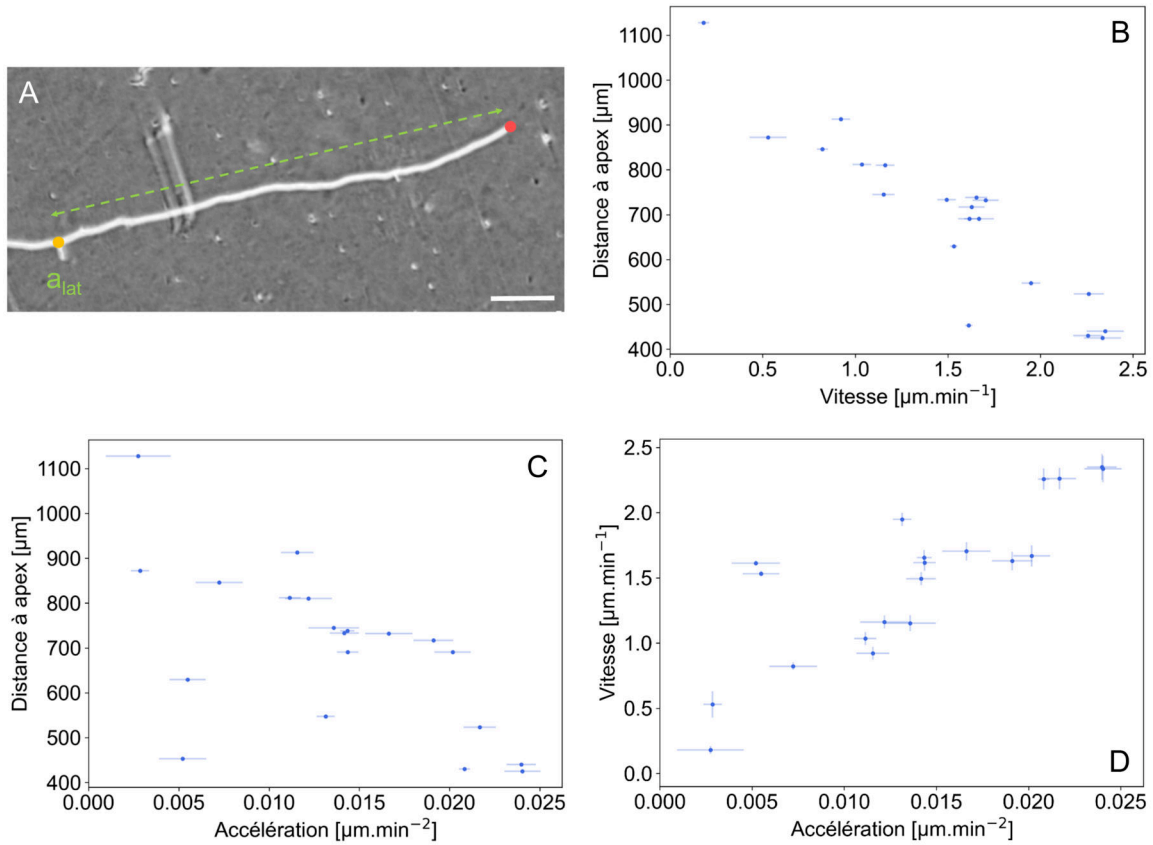


FIG. 4.15 – (A) Au moment du branchement latéral, la distance entre le nœud (point jaune) et l’apex de l’hyphe mère (point rouge) est relevée (barre d’échelle : 100 μm). (B) Distance entre le nœud latéral et l’apex en fonction de la vitesse $V_{a_{lat}}$ ou en fonction de l’accélération (C). (D) $V_{a_{lat}}$ en fonction de l’accélération. Les incertitudes sur les points expérimentaux sont calculées par bootstrap. $N = 20$.

une moindre mesure, une conclusion similaire peut être déduite concernant l’accélération de ces branches latérales (figure 4.15 C). On notera que la distance à l’apex mesurée est toujours supérieure à 500 μm environ. Cette longueur est caractéristique des branches latérales, qui n’émergent pas dans la région directement à proximité de l’apex. Cette propriété sera étudiée plus en détail dans une section suivante (voir section 4.3.3, p. 124). Enfin, la répartition des points sur la figure 4.15 D indique que la vitesse et l’accélération des hyphes latérales semblent être corrélées positivement.

4.2.5 Synthèse

La figure 4.16 A synthétise les résultats concernant les vitesses de croissance locales évoquées dans cette partie. On rappelle que V_{a_e} est calculée en moyennant les vitesses de l’apex au cours du temps, et la vitesse stationnaire V_{sat} des apex a_o est extraite à partir d’un ajustement exponentiel sur les données expérimentales. $V_{a_{lat}}$ est estimée par le biais d’un ajustement linéaire sur l’évolution temporelle des longueurs, mais uniquement sur un intervalle de temps donné pour chaque hyphe étudiée. Si les apex a_e et a_o présentent des distributions de vitesses similaires, la vitesse initiale des branches latérales $V_{a_{lat}}$ est quant à elle nettement inférieure.

Les moyennes et écarts-types des distributions pour chaque type d'apex sont indiqués dans le tableau 4.1.

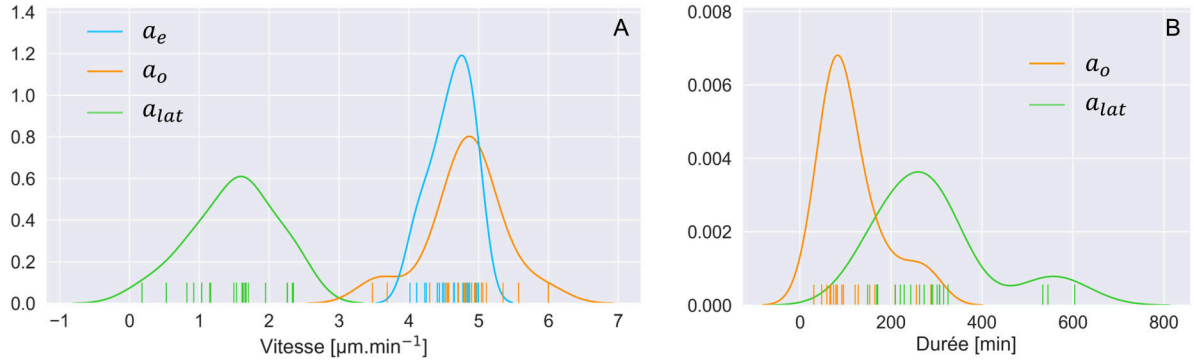


FIG. 4.16 – (A) Densités de probabilité estimées par noyau pour V_{a_e} (bleu, $N = 20$), V_{sat} (a_o) (orange, $N = 20$) et $V_{a_{lat}}$ (vert, $N = 20$). Les valeurs des collections sont indiquées par les traits verticaux. (B) Densités de probabilité estimées par noyau pour t'_{a_o} (orange, $N = 20$) et $t'_{a_{lat}}$ (vert, $N = 20$).

TAB. 4.1 – Moyennes et écarts-types des distributions des vitesses pour les trois types d'apex a_e , a_o et a_{lat} .

	V_{a_e}	V_{sat} (a_o)	$V_{a_{lat}}$
Moyenne [$\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$]	$4,592 \pm 0,008$	$4,72 \pm 0,05$	$1,34 \pm 0,01$
Écart-type [$\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$]	$0,29 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,08$	$0,58 \pm 0,09$

De même, la figure 4.16B synthétise les durées de latence des apex a_o et a_{lat} , aux termes desquelles les vitesses atteignent une valeur de saturation V_{api} . On rappelle que dans le cas des apex latéraux a_{lat} , cette durée d'accélération est extraite en s'appuyant sur l'hypothèse que ces apex finissent par croître à la vitesse V_{api} , bien que le relevé soit interrompu avant d'observer une telle dynamique. Les moyennes des durées de latence pour les 20 échantillons sont présentées dans le tableau 4.2.

Les apex a_o accélèrent sur une durée significativement plus courte que les apex latéraux, qui présentent quant à eux un temps de latence similaire d'environ 250 minutes.

TAB. 4.2 – Moyennes et écarts-types des distributions des durées t'_{a_o} et $t'_{a_{lat}}$ nécessaires pour atteindre la vitesse asymptotique V_{api} depuis le moment du branchement pour les apex a_o et les apex a_{lat} respectivement.

	t'_{a_o}	$t'_{a_{lat}}$
Moyenne [min]	73 ± 2	245 ± 3
Écart-type [min]	67 ± 11	124 ± 20

Par ailleurs, un travail complémentaire présenté en annexe A étudie la vitesse de croissance du thalle à l'échelle macroscopique de la boîte de Petri (plusieurs jours de croissance), ainsi

qu'à l'échelle du mycélium complet (20 premières heures de croissance). L'approche envisagée se différencie ainsi de l'analyse menée dans cette section, dans laquelle les vitesses d'extension des hyphes individuelles sont considérées.

4.2.6 Discussion

Les vitesses de croissance des différentes espèces de champignons sont communément calculées à partir de l'évolution temporelle du diamètre du thalle sur une boîte de Petri, qui reflète la progression du front de croissance [121]. Le thalle croît généralement de manière radiale et linéaire [4]. Ces estimations sont néanmoins imprécises dans la mesure où le diamètre n'est pas parfaitement circulaire, et la précision de la mesure est généralement de l'ordre du millimètre. La délimitation entre le thalle et le milieu de culture vierge est définie en estimant la région où le contraste est maximal sur l'image, et reste ainsi peu objective. Dans ce contexte, l'observation microscopique de la croissance des hyphes donne accès à des estimations de vitesses fiables, et permet de comparer la croissance de *P. anserina* avec d'autres espèces. Par exemple, les hyphes de *N. crassa* ont une vitesse d'élongation de $8,4 \pm 4,8 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ ($N = 10$), et celles d'*A. nidulans* de $0,5 \pm 0,2 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ ($N = 37$) [44].

Les comparaisons des vitesses d'élongation entre différentes espèces doivent cependant être considérées avec précaution, puisque les cultures sont menées dans certaines conditions, qui peuvent impacter sensiblement la dynamique de croissance. De plus, comme nous l'avons montré dans le cas de *P. anserina*, les vitesses diffèrent grandement en fonction de la nature de l'hyphe (apicale ou latérale). Par exemple, pour les vitesses de *N. crassa* et d'*A. nidulans* mentionnées ci-dessus, la nature des collections d'hyphes n'est pas précisée, et elles regroupent potentiellement des hyphes apicales et latérales. Les vitesses moyennes ainsi calculées ne sont pas forcément représentatives des hyphes les plus rapides. Comme nous l'avons observé pour *P. anserina*, le calcul de la vitesse moyenne d'un apex V_a en considérant l'ensemble des hyphes, donne lieu à une vitesse inférieure à celle prenant en compte des hyphes apicales exclusivement.

En outre, certaines études mettent en évidence une perturbation au niveau de l'hyphe exploratoire juste avant la formation d'un branchement apical. Sánchez-Orellana *et al.* [129] ont par exemple observé un fort ralentissement de 2 à 5 minutes avant un branchement apical chez *Trichoderma atroviride*. De même, une vitesse de croissance plus faible a été mesurée durant les 2 à 3 minutes précédant le branchement chez *A. niger* [127] et *A. nidulans* [171]. Ce ralentissement pourrait s'expliquer par les réarrangements de la zone apicale nécessaire à la préparation du branchement, avec notamment la réorganisation du Spitzenkörper (SPK) (voir section 1.2.7, p.34) [171].

Nos mesures réalisées sur les hyphes de *P. anserina* n'ont pas montré de ralentissement notable associé au branchement apical. De la même manière chez *N. crassa*, la branche exploratoire ne semble pas subir de perturbation lors de la formation d'un branchement apical. De plus, chez ce même champignon, il a été observé que pendant les 2 premières minutes suivant le branchement, l'apex de l'hyphe d'exploitation (branche émergente) est sensiblement plus lent ($0,076 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) que l'apex exploratoire ($0,214 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$) [170]. Pour *P. anserina*, nous avons montré que les apex

d'exploitation sont initialement plus lents que les apex exploratoires, car ils connaissent une période d'accélération d'environ 1 heure.

Araujo-Palomares *et al.* [175] ont travaillé sur le comportement de la protéine SPA-2 du polarisome (voir section 1.2.6, p.33) lors du branchement subapical chez *N. crassa*. On rappelle que chez *P. anserina* comme chez *N. crassa*, le branchement apical est majoritairement subapical, comme mentionné dans la section 4.1.1, p.102. Ce processus de branchement se traduit par l'apparition non simultanée des deux hyphes, comme montré sur la figure 4.17. Juste avant l'émergence de la nouvelle branche, ils ont détecté le détachement d'une sous-population de protéines SPA-2 du polarisome, qui semble ensuite initier l'émergence de la branche (figure 4.17). Les protéines du polarisome jouent un rôle important dans la nucléation et la polarisation des câbles d'actine, qui permettent ensuite de guider les vésicules depuis le SPK vers la paroi de l'apex en croissance. Ainsi, le petit détachement du polarisome recrute probablement les vésicules sécrétoires depuis le SPK de l'hyphe mère. La mise en place d'un SPK associé à la nouvelle branche pourrait nécessiter une certaine durée de latence durant laquelle la vitesse de l'apex est réduite, comme on l'observe pour les hyphes d'exploitation chez *P. anserina*.

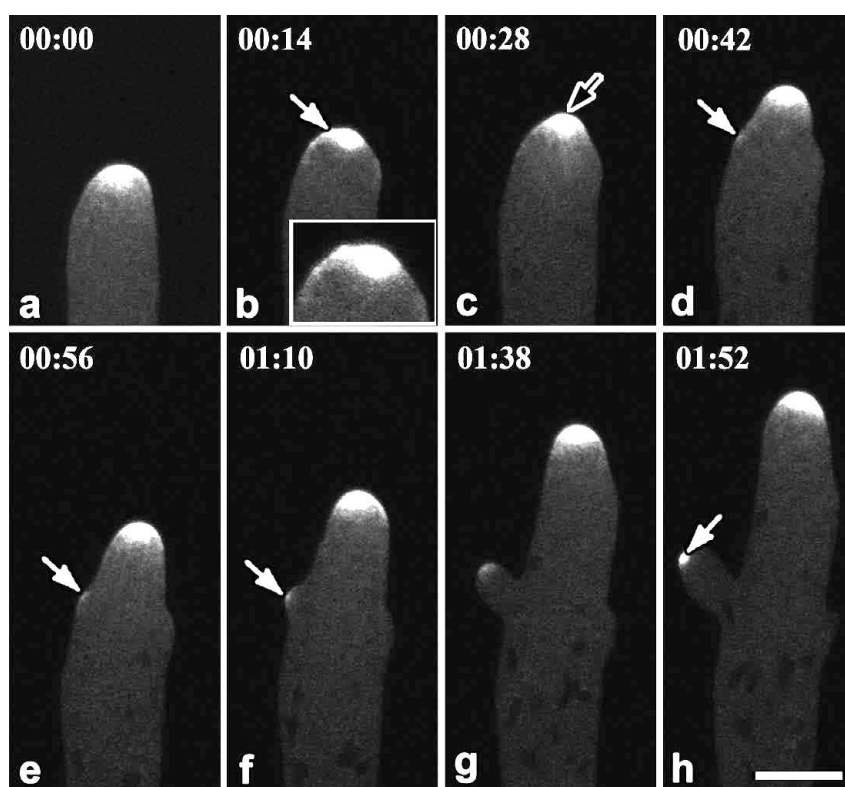


FIG. 4.17 – Chez *N. crassa*, une sous-population de protéines SPA-2 se détache du polarisome et semble initier la formation du branchement subapical (barre d'échelle : 10 μm) [175].

Enfin, les vitesses d'extension constituent un premier indicateur permettant de distinguer les branches apicales et latérales chez *P. anserina*. Sur la durée de suivi accessible sur nos images, la vitesse des hyphes latérales n'atteint pas celle des hyphes issues des branchements apicaux. On peut considérer cette période comme une phase d'accélération, au terme de laquelle

l'apex pourrait éventuellement atteindre la vitesse maximale V_{api} . Chez *A. nidulans*, une phase d'accélération de 30 minutes environ a été observée, suite à laquelle les hyphes latérales s'allongent avec une vitesse 20% plus faible que celle des hyphes apicales [171].

Nous avons également remarqué une influence de la position du nœud latéral sur la vitesse de croissance de l'hyphe latérale. Les branches les plus rapides semblent être les plus proches de l'apex de l'hyphe mère, c'est-à-dire la zone active, où la sécrétion d'enzymes lytiques est importante (voir section 1.1.2, p.7). Ces branches sont ainsi plus susceptibles de bénéficier d'un apport en nutriments en provenance de cet apex. Par ailleurs, les nutriments rendus disponibles par l'action des enzymes sécrétées constituent un bien commun accessible à plusieurs hyphes. En particulier, les branches exploratoires laissent après leur passage des nutriments qu'elles n'ont pas absorbés, et qui restent disponibles pour les premières hyphes latérales à accéder à ces régions [17]. Celles proches de l'apex sont ainsi prioritaires sur les plus lointaines, et donc davantage susceptibles de croître plus rapidement.

4.3 Répartition des branchements le long de l'hyphe

Cette section se focalise sur la répartition des branchements le long de l'hyphe en croissance, en distinguant les branches apicales et latérales. De manière similaire à l'étude des vitesses de croissance, les longueurs entre les nœuds sont déterminées à partir de relevés sur les images du mycélium. Celles-ci proviennent d'expériences utilisant la souche sauvage de *P. anserina*, soit en conditions standards sur le milieu de culture M2, soit sur le milieu pauvre M0 (voir section 2.1.2, p.62), comme précisé par la suite.

4.3.1 Procédure de relevé des points

Coordonnées des points de branchement

Les images sont analysées par le biais de relevés des coordonnées des nœuds de branchement à l'aide du logiciel ImageJ (figure 4.18). Grâce aux images successives du mycélium en croissance (période de 18 minutes), les points de branchements sont clairement identifiés par rapport aux chevauchements et aux anastomoses, qui sont quant à eux exclus de l'analyse. De la même manière que pour l'étude des vitesses d'extension, on considère qu'une nouvelle branche existe dès lors qu'elle émerge d'au moins 3px (soit un demi-diamètre typique d'hyphe) par rapport à la paroi de l'hyphe mère. On rappelle que l'incertitude sur les longueurs est $\sigma_L = 3px = 5\mu m$, soit environ un demi-diamètre d'hyphe.

Pour une même expérience, l'étude porte sur 10 hyphes, pour lesquelles tous les points de branchements sont récupérés. On définit une hyphe en choisissant à chaque nœud de branchement l'apex exploratoire, c'est-à-dire la branche qui suit le plus la direction de l'hyphe mère (voir section 4.2.1, p.106). Les longueurs mesurées sur les 10 hyphes sont cumulées, et on

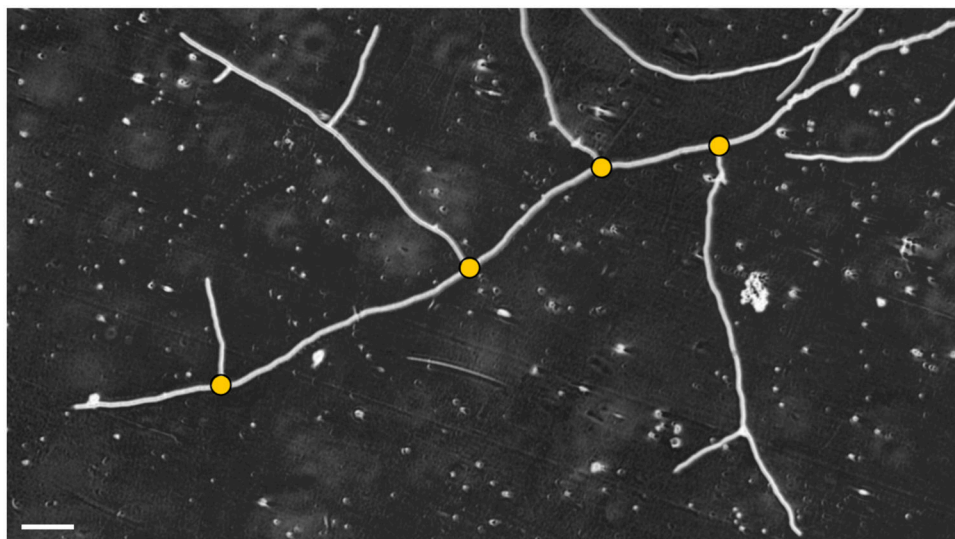


FIG. 4.18 – Sélection manuelle des points de branchement sur une image du mycélium (points jaunes). Les marqueurs sont volontairement grossis. Barre d'échelle : 100 μm .

dispose ainsi d'une collection de points pour l'expérience en milieu riche M2, et d'une autre pour la condition en milieu pauvre M0.

Dans notre étude, nous avons étudié les nœuds de nature apicale et latérale respectivement. Si les deux catégories sont décrites dans la littérature [166] [167] [73], aucun paramètre quantitatif n'est proposé pour les différencier. Nous choisissons de discriminer les nœuds apicaux et latéraux en vérifiant leur distance par rapport à l'apex exploratoire au moment du branchement. En effet, nous montrerons dans la section 4.3.3, p.124, que les branchements latéraux se produisent à une certaine distance minimale de l'apex (environ 500 μm). Toutes les branches émergeant à une distance plus proche de l'apex seront considérées comme apicales.

Tortuosité de l'hyphe

La tortuosité de chaque hyphe étudiée est calculée afin de quantifier leur caractère rectiligne. La tortuosité s'exprime comme le ratio entre la « longueur sinueuse » (réelle) et la longueur rectiligne de l'hyphe. La trajectoire réelle de l'hyphe est approximée par la somme des segments reliant les positions successives de l'apex à chaque image. La distance rectiligne est relevée entre le point initial de suivi et la dernière position de l'apex à la fin de l'acquisition. Cette longueur varie d'un échantillon à l'autre, mais se situe aux alentours de 4000 μm , soit environ 400 diamètres d'hyphes. La tortuosité est estimée pour les 10 hyphes de l'expérience sur milieu riche d'une part, et pour les 10 hyphes de l'expérience sur milieu pauvre d'autre part (figure 4.19). On notera que la valeur de la tortuosité est bornée à 1 au vu de sa définition.

Les moyennes et écarts-types des distributions sont $1,07 \pm 0,06$ et $1,06 \pm 0,04$ pour les milieux riche et pauvre respectivement. Ainsi, on pourra considérer que les trajectoires des 20 hyphes étudiées sont globalement rectilignes. Nous nous appuyons sur des distances rectilignes entre les coordonnées des points relevés, qui, bien que légèrement sous-estimées par rapport aux longueurs réelles, sont simples à extraire.

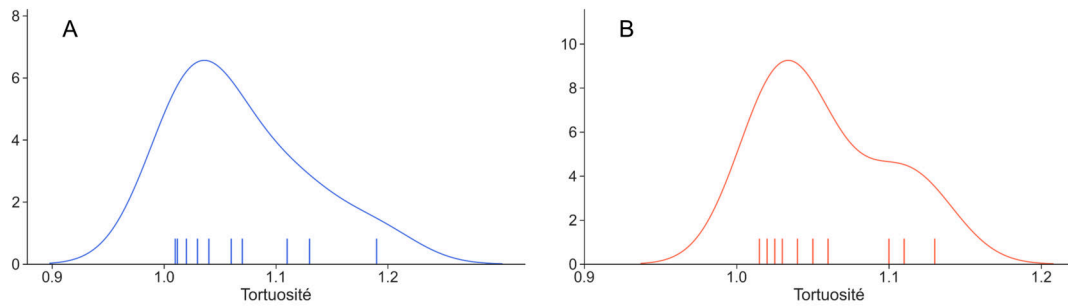


FIG. 4.19 – La tortuosité est calculée sur la portion d’hyphe définie par la position de l’apex au début du suivi et sa position finale. Une tortuosité valant 1 est caractéristique d’une ligne droite. Les mesures sont effectuées sur 10 hyphes en condition « milieu riche M2 » (A) et sur 10 hyphes en condition « milieu pauvre M0 » (B). Les courbes représentent les densités de probabilité estimées, et les traites verticaux indiquent les valeurs pour chaque hyphe.

Enfin, un exemple d’évolution temporelle de la tortuosité de trois hyphes distinctes est présenté figure 4.20. On observe que la tortuosité a tendance à croître avec le temps, puisque la longueur de l’hyphe augmente. Pour les trois hyphes, les courbes semblent ensuite converger vers une valeur comprise entre 1,05 et 1,1, suggérant que les trajectoires sont globalement rectilignes. Un comportement divergent indiquerait au contraire une trajectoire aléatoire de l’hyphe.

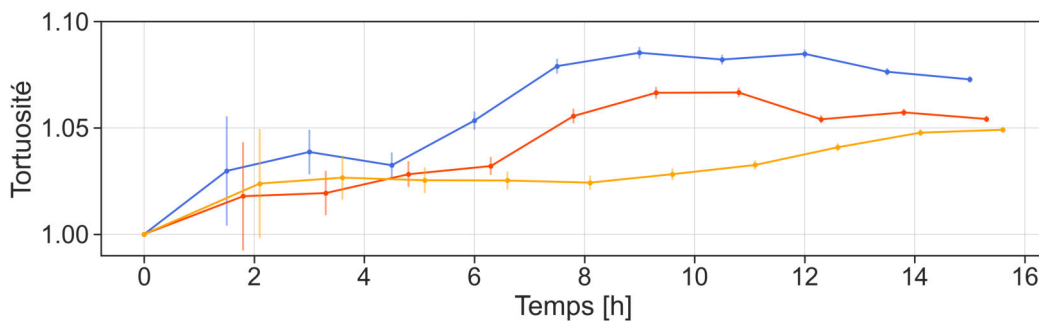


FIG. 4.20 – Évolutions temporelles de la tortuosité de trois hyphes. L’instant initial correspond au début du suivi de l’hyphe, où la tortuosité vaut 1. Les barres d’erreur en abscisse sont inférieures à la taille du marqueur. Les barres d’erreur en ordonnées sont calculées à partir d’une incertitude sur la longueur $\sigma_L = 5 \mu\text{m}$.

4.3.2 Branchements apicaux

On s’intéresse tout d’abord à la répartition des branchements apicaux uniquement ; les nœuds latéraux ne sont pas pris en compte.

Branchements subapicaux

Comme évoqué précédemment, les branchements des hyphes de *P. anserina* sont décrits comme subapicaux, dans la mesure où l’apex d’exploitation a_o émerge à un instant où l’apex exploratoire a_e a déjà dépassé le point de branchement. Sur la figure 4.21, les longueurs des hyphes associées à a_e et à a_o respectivement sont représentées, avec le moment du branchement correspondant

au temps nul. Pour les 20 branchements subapicaux étudiés, on peut mesurer la distance $\Delta\ell$ entre le nœud et a_e au moment où a_o apparaît. La longueur minimale de détection de l'hyphe associée à a_o est d'un demi-diamètre d'hyphe ($5\mu\text{m}$), mais peut être supérieure à cette valeur du fait de la résolution temporelle ($11\mu\text{m}$ mesurés au maximum parmi les 20 relevés).

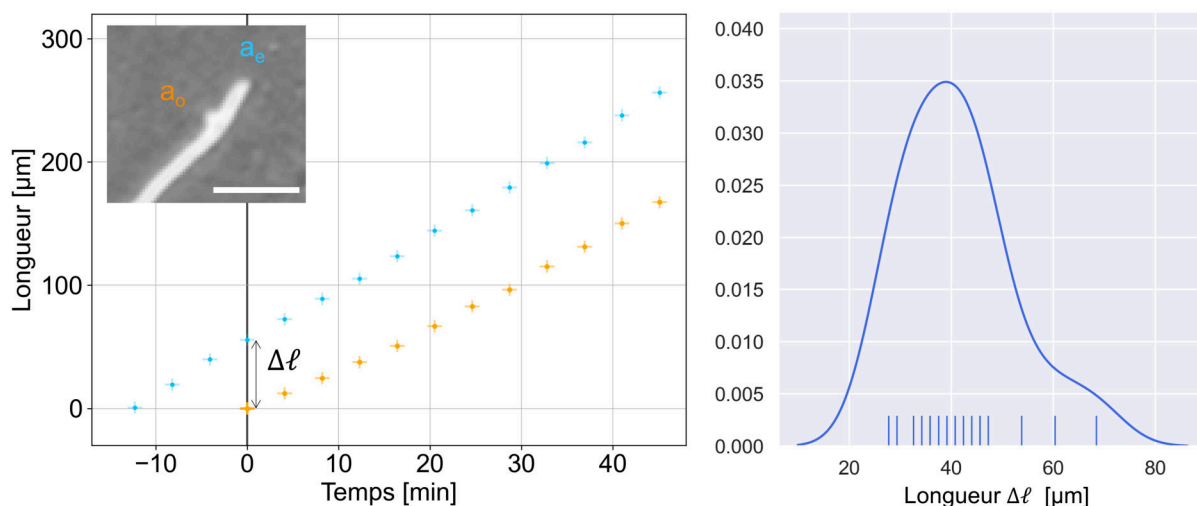


FIG. 4.21 – À gauche, longueurs de l'hyphe a_e (bleu) et à a_o (orange) au cours du temps. Le moment du branchement correspond à $t = 0$. $\Delta\ell$ est la longueur déjà parcourue par a_e lorsque a_o émerge. Encart : détail d'un branchement subapical (barre d'échelle : $50\mu\text{m}$). À droite, densité de probabilité estimée par noyau pour $\Delta\ell$, chaque trait vertical représentant une valeur ($N = 20$).

La collection de valeurs de $\Delta\ell$ a pour moyenne $41 \pm 3\mu\text{m}$ et pour écart-type $11 \pm 2\mu\text{m}$. Ces distances sont donc significativement différentes de 0, comme attendu dans la configuration de branchements subapicaux. Bien que le processus de branchement subapical soit ici mis en évidence, la précision sur les valeurs de $\Delta\ell$ dépend de l'identification de l'instant de branchement, elle-même limitée par la résolution temporelle et spatiale des images.

Répartition des nœuds apicaux

Nous étudions ensuite la répartition des branchements apicaux le long de l'hyphe. La distance séparant deux nœuds apicaux successifs est notée ℓ_{api} (figure 4.22).

Les distributions des longueurs ℓ_{api} sont présentées sur la figure 4.23 pour chacune des expériences sur milieu de culture riche et pauvre respectivement. Des courbes lissant les histogrammes sont également représentées sur les figures, et adoptent une allure similaire pour les deux conditions de culture : les longueurs autour de $250\mu\text{m}$ sont les plus probables, et les distances inférieures à $100\mu\text{m}$ environ sont exclues.

Les fonctions de répartition associées aux distributions des ℓ_{api} sont représentées sur les figures 4.24A et B. L'incertitude sur les points expérimentaux en ordonnée est estimée en considérant une loi binomiale avec une probabilité de succès p de 0,5. L'incertitude s s'exprime alors comme : $s = \frac{\sigma}{N}$, avec σ l'écart-type de la loi binomiale et N le nombre d'expériences. On a donc $s = \frac{\sqrt{Np(1-p)}}{N} = \frac{1}{2\sqrt{N}}$.

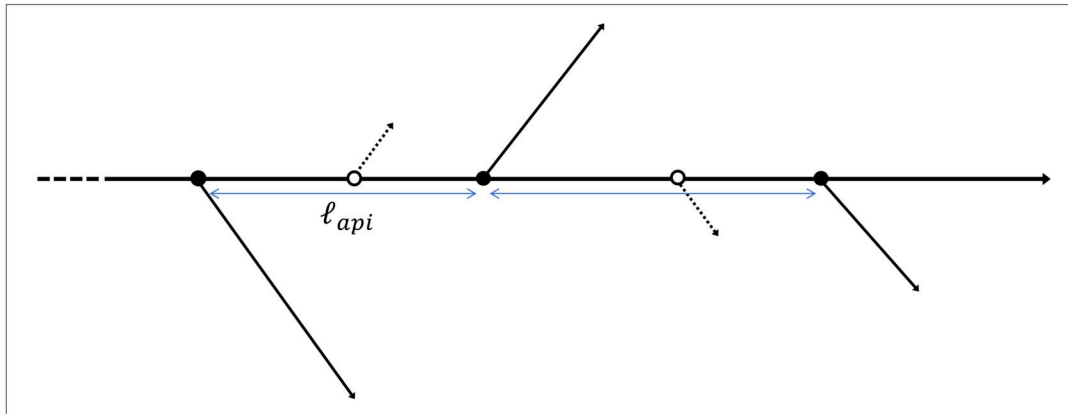


FIG. 4.22 – L’hyphe mère en croissance vers la droite est représentée par la flèche horizontale. Les nœuds apicaux sont symbolisés par des points noirs et les nœuds latéraux par des cercles noirs. Les branches apicales sont en traits pleins et les branches latérales en traits pointillé. La distance entre deux nœuds apicaux est notée ℓ_{api} .

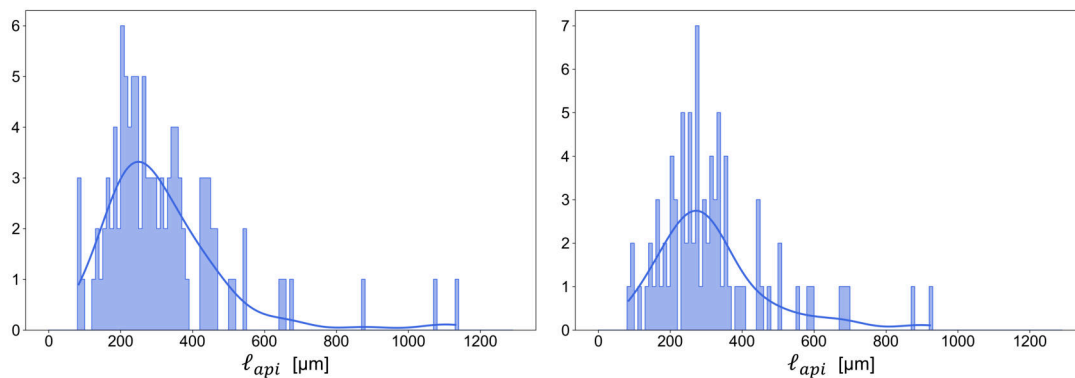


FIG. 4.23 – Histogramme des longueurs ℓ_{api} pour une expérience sur milieu riche à gauche ($N = 109$), et sur milieu pauvre à droite ($N = 86$). Les courbes représentent les histogrammes lissés. Intervalle de classe (bins) : $10 \mu\text{m}$.

Tout d’abord, il est possible d’extraire la valeur minimale ℓ_0 des distributions, correspondant à la plus petite distance observée entre deux branchements apicaux. Pour l’expérience en milieu riche, $\ell_0^r = 83 \pm 5 \mu\text{m}$, et en milieu pauvre, $\ell_0^p = 84 \pm 5 \mu\text{m}$.

On cherche à ajuster les fonctions de répartition à l’aide d’une loi sans mémoire :

$$f(\ell_{api}) = 1 - \exp(-\alpha \ell_{api})$$

Une partie des points initiaux (faibles valeurs de ℓ_{api}) n’est pas compatible avec la fonction f choisie, et doivent être exclus de l’ajustement. La fonction f est croissante, et sa dérivée est maximale lorsque $\ell_{api} = 0$. On recherche alors sur les données expérimentales la valeur de ℓ_{api} pour laquelle la dérivée est maximale. Tous les points d’abscisse supérieure à cette valeur sont conservés pour l’ajustement (points bleus sur les figures 4.24 A et B).

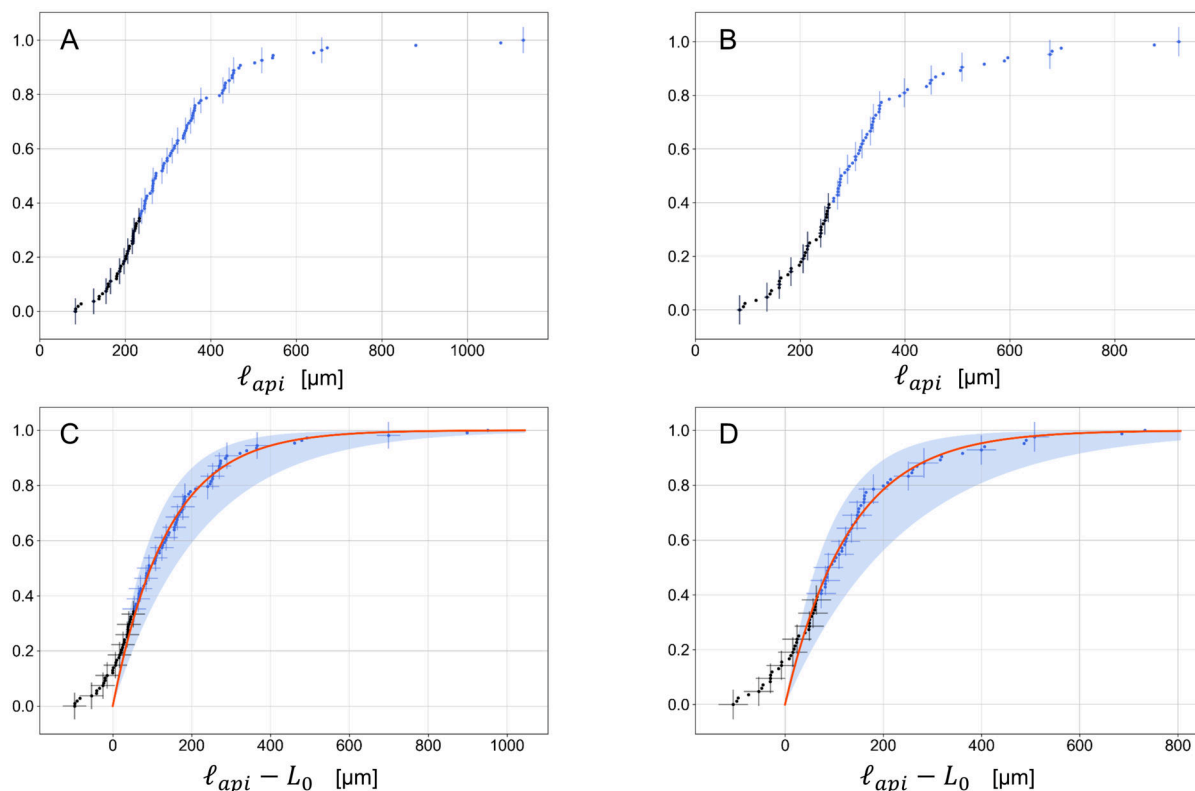


FIG. 4.24 – Les figures de gauche concernent les expériences sur milieu riche et les figures de droite celles sur milieu pauvre. Les barres d'erreur sont représentées tous les quatre points. Barres d'erreur en y : voir texte. (A et B) Fonctions de répartition associées aux distributions de ℓ_{api} . Barres d'erreur en abscisses : $5\mu\text{m}$. Les points noirs sont exclus de l'ajustement, les points bleus sont conservés. (C et D) Les points expérimentaux sont décalés de L_0 puis ajustés avec la fonction $1 - \exp(-\alpha(\ell_{api} - L_0))$, représentée par la ligne rouge. La surface bleue autour de l'ajustement représente un écart-type. $R^2 = 0,99$ pour C et $R^2 = 0,98$ pour D.

De plus, les données expérimentales doivent être décalées afin de pouvoir réaliser l'ajustement (figures 4.24C et D). Les points sont décalés d'une longueur L_0 , et on obtient :

$$f(\ell_{api}) = 1 - \exp(-\alpha(\ell_{api} - L_0))$$

Les valeurs de L_0 avec son incertitude sont choisies manuellement. L'ajustement des deux collections de longueurs permet d'extraire L_0^r et α_r , ainsi que L_0^p et α_p pour le milieu riche et pauvre respectivement (voir tableau 4.3).

On choisit de définir la longueur L_0 comme étant la « dominance apicale », c'est-à-dire la longueur pour laquelle la croissance de l'apex de l'hyphe mère domine sur l'apparition de nouveaux branchements apicaux (voir section 4.3.5, p. 129). On notera que la dominance apicale pourrait également être décrite par la grandeur ℓ_0 , qui correspond à la plus petite distance observée entre deux nœuds apicaux. Une fois la longueur de dominance apicale atteinte, l'apparition des branchements suit une loi exponentielle sans mémoire de paramètre α . Dans le cas de l'expérience sur milieu riche, le taux de branchement apical est donc de $1/\alpha_r$, soit environ $140\mu\text{m}$.

Les valeurs de ℓ_0 , L_0 et α sont résumées dans le tableau 4.3 pour l'expérience en milieu riche et celle en milieu pauvre respectivement. Les valeurs de ces trois paramètres sont compatibles d'une condition à l'autre, indiquant que la répartition des nœuds apicaux est similaire sur un milieu riche et pauvre. Cependant, la croissance étant notablement réduite sur un milieu pauvre, le taux temporel de branchement est diminué par rapport au milieu riche (voir section 4.3.5, p. 129).

TAB. 4.3 – ℓ_0 est la longueur minimale mesurée entre deux branchements apicaux ; L_0 correspond à la dominance apicale en considérant une loi exponentielle $1 - \exp(-\alpha(\ell_{api} - L_0))$.

	ℓ_0 [μm]	L_0 [μm]	α [mm^{-1}]
Milieu riche	83 ± 5	180 ± 30	$7,2 \pm 2,7$
Milieu pauvre	84 ± 5	190 ± 30	$7,7 \pm 3,5$

4.3.3 Branchements latéraux

Distances entre les nœuds latéraux

Dans cette section, seuls les branchements latéraux sont étudiés, et les nœuds apicaux ne sont pas considérés. Les images sur lesquelles sont effectués les relevés proviennent d'expériences sur milieu riche M2. Chaque nœud latéral i se voit attribuer un couple de paramètres : d'une part, un temps d'apparition t_i , et d'autre part, une distance ℓ_{lat}^i (mesurée au moment du branchement) le séparant d'un point initial arbitrairement choisi sur l'hyphe mère (figure 4.25). Celui-ci est conservé pour tous les relevés sur cette hyphe, et est choisi généralement proche de la spore au centre du mycélium.

Les branchements apicaux sont directement associés à la croissance de l'apex puisqu'ils interviennent successivement à l'apex. En revanche, les branchements latéraux se produisent le long de l'hyphe selon un ordre spatial qui ne coïncide pas obligatoirement avec l'ordre chronologique. Une branche latérale peut ainsi apparaître entre deux nœuds déjà existants, contrairement au cas des branches apicales (figure 4.25).

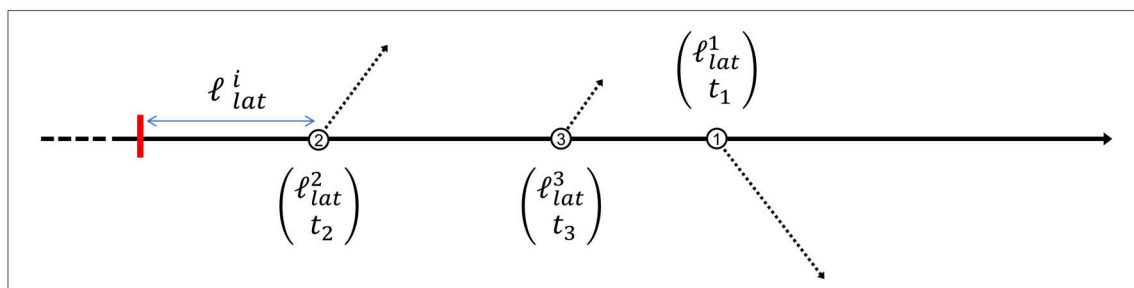


FIG. 4.25 – On associe à chaque nœud latéral i le moment t_i de son apparition, et la distance ℓ_{lat}^i le séparant d'un point de repère (rouge). Dans cet exemple, $t_1 < t_2 < t_3$, mais $\ell_{lat}^1 > \ell_{lat}^2$ et $\ell_{lat}^1 > \ell_{lat}^3$.

Par ailleurs, on cherche à étudier la dynamique de deux branchements latéraux successifs. Pour cela, les branchements latéraux sont classés par ordre d'apparition chronologique le long

de l'hyphe. La durée séparant l'émergence de deux branches successives est notée $\Delta t = t_{i+1} - t_i$, et la distance correspondante entre les deux nœuds est notée $\Delta \ell = |\ell_{lat}^{i+1} - \ell_{lat}^i|$. En l'absence de corrélation de l'apparition des branchements latéraux, on s'attend à observer une décorrélation entre $\Delta \ell$ et Δt .

Sur la figure 4.26, on a représenté les longueurs $\Delta \ell$ en fonction des durées Δt . Les deux histogrammes montrent les distributions marginales obtenues par projection sur chacun des deux axes x et y . Les branchements étant classés chronologiquement selon leur moment d'apparition, les valeurs de Δt sont globalement faibles : pour environ 80 % des branchements, l'intervalle de temps séparant leurs apparitions est inférieur à la durée nécessaire pour que l'hyphe parcourt 20 diamètres d'hyphe, soit 50 minutes. Puisque les longueurs ne sont pas normalisées, il est attendu que les événements éloignés en espace ($\Delta \ell$ élevé) soient plus rares que les événements proches. On constate néanmoins une très forte proportion de longueurs $\Delta \ell$ faibles, avec 65 % des valeurs inférieures à $500 \mu\text{m}$, soit environ 50 diamètres d'hyphe. La répartition des points semble ainsi indiquer que les branchements latéraux émergent majoritairement par « groupes » : les nœuds formés à des temps proches sont situés à de faibles distances l'un de l'autre. La distribution de $\Delta \ell$ met également en évidence une deuxième population de branchements pour lesquels la distance $\Delta \ell$ est élevée (autour de $2500 \mu\text{m}$ environ). Ainsi, les observations suggèrent que les branches latérales apparaissent selon deux processus distincts : de manière corrélée par « groupes », et de manière décorrélée à plus longue distance.

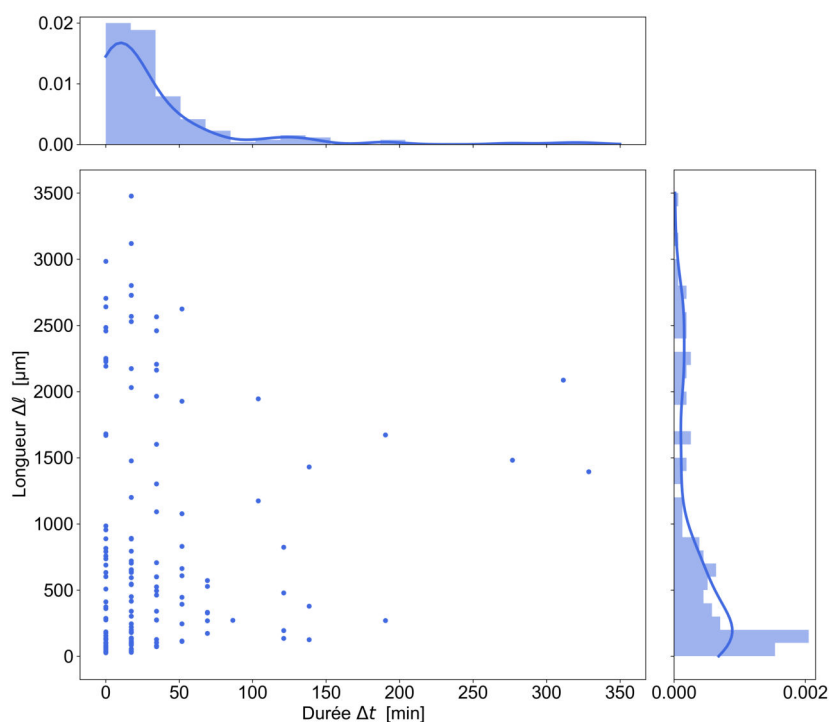


FIG. 4.26 – Δt est la durée séparant l'émergence de deux branchements latéraux temporellement successifs ; $\Delta \ell$ est la distance séparant ces deux nœuds. Les histogrammes représentent les distributions de Δt et de $\Delta \ell$ respectivement. Les lignes bleues représentent les densités de probabilité. Pour Δt , les bins sont de 18 minutes (intervalle de temps entre deux images) ; pour $\Delta \ell$, les bins sont de $100 \mu\text{m}$ (soit environ la distance parcourue par l'hyphe mère pendant un intervalle de temps). $N = 168$.

Enfin, on cherche à vérifier si deux branches latérales qui apparaissent « en groupe » émergent du même côté de l'hyphe mère. Nous définissons un groupe comme deux branchements apparaissant à proximité à la fois en temps et en espace. Pour cela, chaque nœud latéral se voit attribuer un plus proche voisin en temps et en espace, par le biais du poids $P = \Delta\ell + \Delta t v$, avec v la vitesse de croissance de l'hyphe mère, estimée par $V_{api} = 4,6 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ (voir section 4.2.5, p.114). Le plus proche voisin est déterminé en sélectionnant le nœud latéral associé à la plus petite valeur de P . Pour chaque couple de nœuds ainsi formé, on détermine sur les images s'ils émergent du même côté de l'hyphe mère. Ce cas de figure est observé dans 90 cas sur un effectif de 168 couples.

Un test binomial est mis en oeuvre pour évaluer si la fréquence d'occurrence des succès (définis par la configuration où deux branches émergent d'un même côté) s'écarte significativement d'une probabilité théorique de 0,5. Le degré de signification, ou p -value, est estimé à 0,4 par le biais du test binomial. Cette valeur étant largement supérieure à 0,05, on ne rejette pas l'hypothèse d'équiprobabilité. Les données observées ne permettent donc pas de montrer que les branches latérales émergent plus favorablement d'un même côté de l'hyphe mère.

Position des nœuds latéraux par rapport à l'apex de l'hyphe mère

Dans cette section, on s'intéresse à la distance $\ell_{lat,apex}$ qui sépare un nœud latéral de l'apex de l'hyphe mère au moment où le branchement se produit. La longueur ℓ_{tot} entre l'apex et le point initial choisi arbitrairement est également mesurée au moment où la branche latérale apparaît (figure 4.27). Comme précédemment, le point initial est conservé pour tous les relevés sur une même hyphe. On travaille ici avec une expérience sur milieu de culture standard M2 uniquement.

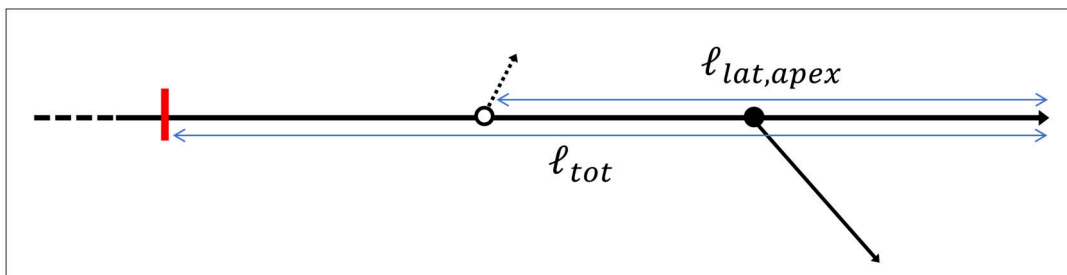


FIG. 4.27 – La longueur séparant l'apex de l'hyphe mère et un nœud latéral au moment où se produit le branchement est noté $\ell_{lat,apex}$. On relève également la longueur ℓ_{tot} entre le point initial de suivi (repère rouge) et l'apex.

La figure 4.28 représente $\ell_{lat,apex}$ en fonction de ℓ_{tot} en échelle semi-logarithmique. La répartition des points met en évidence une région subapicale dépourvue de branches latérales. Quelle que soit la longueur de ℓ_{tot} , les branchements latéraux sont exclus de la région proche de l'apex, délimitée sur la figure par la ligne horizontale bleue en pointillés. Cette zone d'exclusion L_{lat} est estimée à $480 \mu\text{m}$ (une cinquantaine de diamètres d'hyphes), de telle sorte que 95% des branchements latéraux se produisent au-delà de cette limite. On associe à cette

longueur d'exclusion une incertitude de $50\ \mu\text{m}$, déterminée par la longueur pour laquelle 90 % des branchements latéraux se produisent au-delà, soit $530\ \mu\text{m}$. En comparaison, la longueur $\Delta\ell$ entre l'apex et le nœud subapical au moment du branchement est de $41 \pm 11\ \mu\text{m}$ (ligne rouge, voir section 4.3.2, p.120). La valeur de la dominance apicale L_0 caractéristique des branchements apicaux est quant à elle de $180\ \mu\text{m}$ (ligne orange, voir section 4.3.2, p.120).

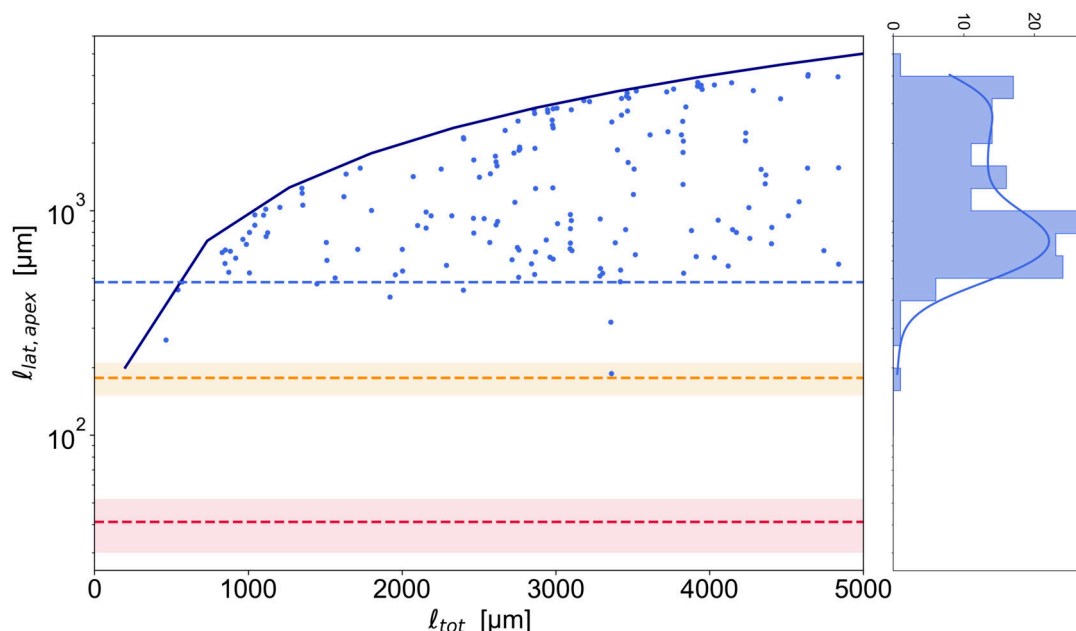


FIG. 4.28 – Représentation en échelle semi-logarithmique de la longueur $\ell_{lat,apex}$ en fonction de la longueur ℓ_{tot} ($N = 168$). Les barres d'erreur sont inférieures à la taille du marqueur. L'histogramme représente la distribution des longueurs $\ell_{lat,apex}$. La courbe bleu foncé en trait plein a pour équation : $\ell_{lat,apex} = \ell_{tot}$, la droite bleue en pointillé : $\ell_{lat,apex} = 480$, la droite orange en pointillé : $\ell_{lat,apex} = 180$, et la droite rouge en pointillé : $\ell_{lat,apex} = 41$. La surface orange représente l'incertitude sur la dominance apicale L_0 , soit $30\ \mu\text{m}$, et la surface rouge représente l'écart-type de la distribution des longueurs $\Delta\ell$, soit $11\ \mu\text{m}$ (voir texte).

De plus, la dynamique initiale des hyphes suite à la germination de l'ascospore étant connue (voir section 4.2.3, p.108), nous pouvons déterminer la durée Δt_{lat} de croissance nécessaire à l'apparition des premiers branchements latéraux. On rappelle que les hyphes connaissent une première phase de latence avant d'atteindre une vitesse stationnaire. Nous avons considéré que la vitesse initiale des hyphes v était linéaire, avec pour coefficient directeur moyen $a = 0,012 \pm 0,005\ \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-2}$. Ainsi, $L_{lat} = \int_0^{\Delta t_{lat}} v dt$, et on obtient $\Delta t_{lat} = 4,7 \pm 0,2\ \text{h}$.

4.3.4 Répartition des nœuds apicaux et latéraux

Enfin, cette dernière section considère l'ensemble des nœuds de branchement, c'est-à-dire les branchements apicaux et latéraux. Les longueurs d'un nœud à un autre sont nommées ℓ_b (figure 4.29 A).

Les branches latérales pouvant émerger de manière non successive le long de l'hyphe, la répartition des longueurs ℓ_b varie en fonction de l'instant choisi pour le relevé des nœuds. On

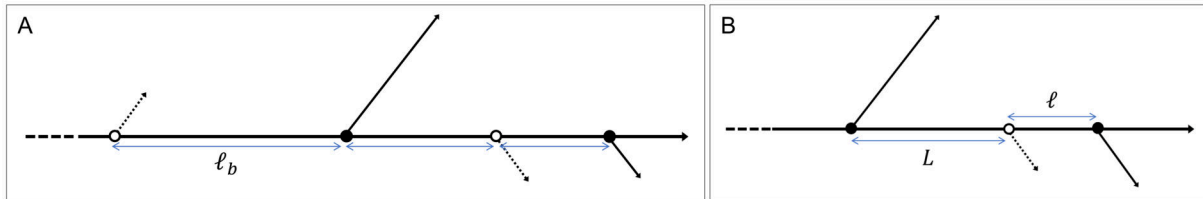


FIG. 4.29 – (A) La distance entre deux nœuds (apicaux ou latéraux) successifs le long de l’hyphe est notée ℓ_b . (B) Au sein d’un compartiment délimité par deux nœuds apicaux (points noirs), la première branche latérale (cercle noir) qui émerge définit deux segments : L est le plus long, et ℓ le plus court.

choisit de représenter la distribution des ℓ_b pour quatre durées de croissance différentes pour la condition de culture en milieu riche M2 : 10,5 h, 12 h, 13,5 h et 15 h (figure 4.30).

Les valeurs les plus probables sont extraites à partir des densités de probabilité : 145, 105, 86 et 77 μm pour les quatre durées de croissance respectivement (dans l’ordre croissant). Les branches latérales pouvant apparaître entre deux nœuds déjà existants, les segments entre deux branchements sont par conséquent divisés, et les valeurs de ℓ_b diminuent au cours du temps. Plus le moment d’analyse est tardif, plus les courbes des densités de probabilité se décalent vers de petites longueurs. Les plus grandes valeurs observées sont probablement liées à la région proche de l’apex, où seuls les branchements apicaux relativement distants les uns des autres interviennent.

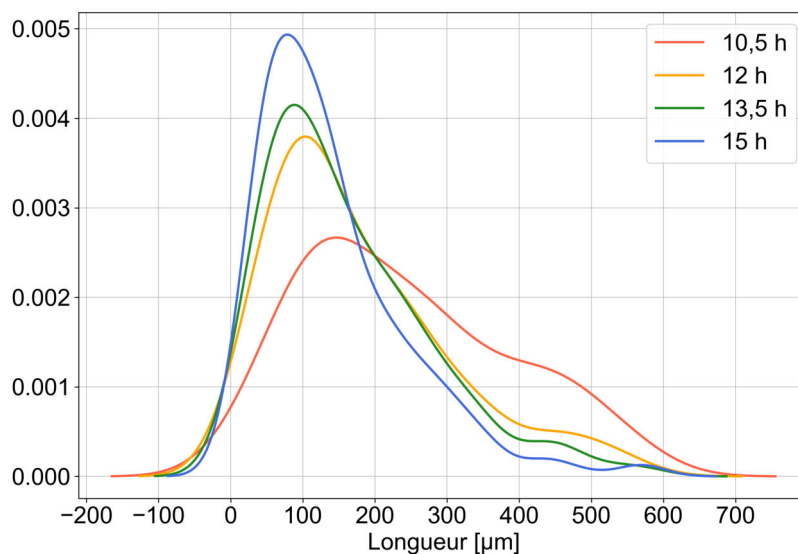


FIG. 4.30 – Densités de probabilité estimées pour quatre collections de ℓ_b à différents temps de croissance pour une expérience sur milieu M2 : 10,5 h ($N = 71$), 12 h ($N = 161$), 13,5 h ($N = 214$) et 15 h ($N = 277$).

Par ailleurs, les branches latérales venant s’ajouter sur une hyphe déjà structurée par les nœuds apicaux successifs, on s’intéresse à l’influence éventuelle de ces derniers sur la répartition des nouvelles branches latérales. Comme schématisé sur la figure 4.29 B, la position de la première branche latérale émergeant entre deux nœuds apicaux est relevée. Deux segments sont alors

définis, ℓ étant le plus court des deux, et L le plus long.

La figure 4.31 représente la longueur L normalisée par la longueur du compartiment ($L + \ell$) en fonction de cette longueur ($L + \ell$). La répartition des points selon l'axe des ordonnées montre que la position de la branche latérale au sein du compartiment semble être aléatoire, et que la position centrale n'est pas particulièrement favorisée (valeurs proches de 0,5). Par contre, l'absence de valeurs proches de 1 signifie que la branche latérale n'émerge pas dans le voisinage direct des nœuds apicaux déjà présents. De plus, en s'appuyant sur l'hypothèse que les nœuds apicaux exercent une influence sur la position de la nouvelle branche latérale, un compartiment de petite taille pourrait induire une position de la branche davantage centrée par rapport au cas d'un grand compartiment. La répartition des points sur la figure ne semble pas valider l'hypothèse, dans la mesure où les petits compartiments autour de $200\ \mu\text{m}$ sont associés à une large gamme de possibilités de positions. Les nœuds apicaux exercent probablement une répulsion à très courte distance, limitant l'apparition des branches dans leur voisinage très réduit, mais pas au-delà.

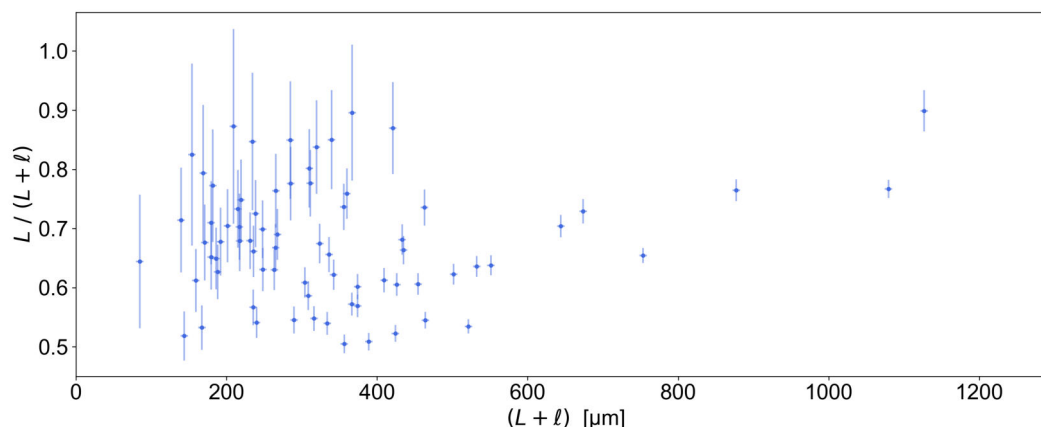


FIG. 4.31 – Représentation de L normalisée par $(L + \ell)$ en fonction de la longueur du compartiment ($L + \ell$) ($N = 73$). Les barres d'erreur sont calculées à partir d'une incertitude sur la longueur $\sigma_L = 5\ \mu\text{m}$. Comme $L \geq \ell$, la limite inférieure en ordonnée est de 0,5.

4.3.5 Synthèse et discussion

Répartition des branchements sur les hyphes de *P. anserina*

En complément de la vitesse d'extension, la position du branchement le long de l'hyphe constitue un critère supplémentaire permettant de distinguer les nœuds apicaux et les nœuds latéraux du mycélium de *P. anserina*. La figure 4.32 résume les observations décrites dans cette section.

Tout d'abord, les branchements à l'apex chez *P. anserina* sont subapicaux : l'apex a_o de l'hyphe d'exploitation apparaît à une distance d'en moyenne $40 \pm 11\ \mu\text{m}$ de l'apex exploratoire. Cette distance est de $17\ \mu\text{m}$ en moyenne pour les branchements subapicaux de *N. crassa* [170], et de $30\ \mu\text{m}$ pour *A. nidulans* [171]. Suite à un branchement subapical, on observe une région

de dominance apicale d'environ $200\ \mu\text{m}$ (soit 20 diamètres d'hyphes), dans laquelle il est très improbable qu'un nouveau branchement apical se produise. L'apparition des branches apicales suit ensuite une loi sans mémoire. La vitesse des apex exploratoires a_e pouvant être considérée comme constante (voir section 4.2.2, p.107), on notera que la répartition temporelle des nœuds apicaux est attendue comme étant similaire à la distribution spatiale ici étudiée.

Les branchements latéraux viennent quant à eux s'ajouter à une structure où les nœuds apicaux sont déjà existants. Ils apparaissent le long de l'hyphe, mais en respectant une distance de $480\ \mu\text{m}$ minimum de l'apex de l'hyphe mère. De plus, les branchements latéraux se produisent majoritairement par groupes, c'est-à-dire proches spatialement et temporellement. La distance qui sépare deux nœuds d'un même groupe peut être largement inférieure à la dominance apicale, avec de nombreuses mesures inférieures à $100\ \mu\text{m}$ (figure 4.32).

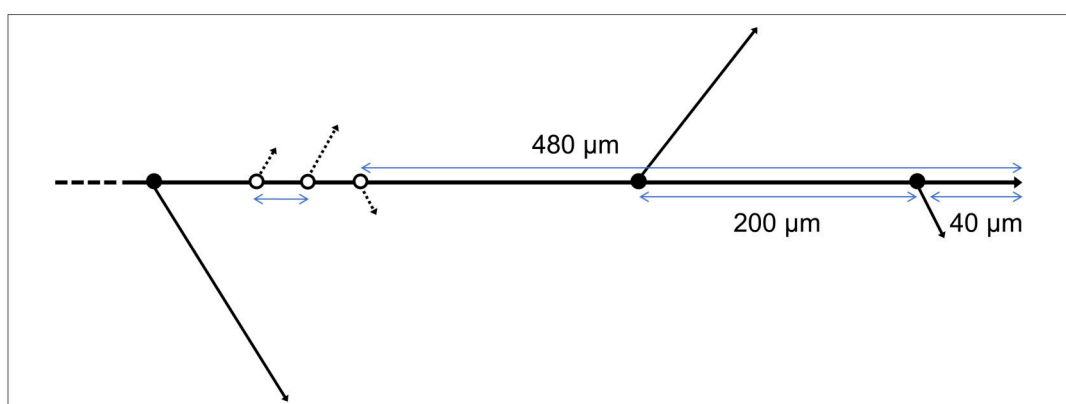


FIG. 4.32 – Les nœuds apicaux sont symbolisés par les points noirs et les nœuds latéraux par les cercles noirs. Le branchement à l'apex est subapical car la branche apparaît à $40\ \mu\text{m}$ en moyenne de l'apex. La dominance apicale se traduit par une distance entre les nœuds apicaux d'une valeur minimale de $200\ \mu\text{m}$. Lorsqu'elles émergent, les branches latérales se situent au minimum à $480\ \mu\text{m}$ de l'apex de l'hyphe mère. Elles apparaissent majoritairement par groupe, à de faibles distances les unes des autres.

Toutefois, il faut noter que toutes les mesures de longueurs effectuées sur les images du mycélium sont des distances rectilignes, et sont de ce fait légèrement biaisées, puisque les hyphes n'adoptent pas une trajectoire parfaitement rectiligne. Elles peuvent serpenter de manière plus ou moins importante, spontanément ou en réponse à l'irrégularité de la surface ou à la présence d'hyphes voisines (voir section 4.4, p.134) [62]. L'estimation de la tortuosité des hyphes de *P. anserina* indique néanmoins une trajectoire relativement rectiligne, justifiant ainsi ce choix (voir section 4.3.1, p.118).

Branchements subapicaux

La distinction entre un branchement apical dichotomique et subapical n'est pas évidente dans la mesure où, dans le deuxième cas, le nœud se forme très proche de l'apex exploratoire. Nous avons pu déterminer la nature du branchement à l'apex chez *P. anserina* comme étant très majoritairement subapicale grâce à une résolution temporelle et spatiale des images élevée. Le type de branchement n'est cependant pas systématiquement précisé dans la littérature.

Certains auteurs s'appuient sur l'observation du SPK (voir section 1.2.7, p.34) pour différencier les ramifications strictement apicales (dichotomiques) et subapicales. La présence et la position précise du SPK à l'apex jouent un rôle clé dans la croissance et la trajectoire de l'hyphe. Il a été montré chez *N. crassa* et *A. niger* notamment que le processus de branchement dichotomique est en général associé avec la disparition temporaire du SPK et la perte de la forme ellipsoïdale de l'extrémité de l'hyphe. Deux nouveaux SPK se forment ensuite, associés chacun à une des deux branches émergentes. À l'inverse, pour les branchements subapicaux, le comportement du SPK de l'hyphe exploratoire n'est pas altéré (figure 4.33) [167] [170] [127].

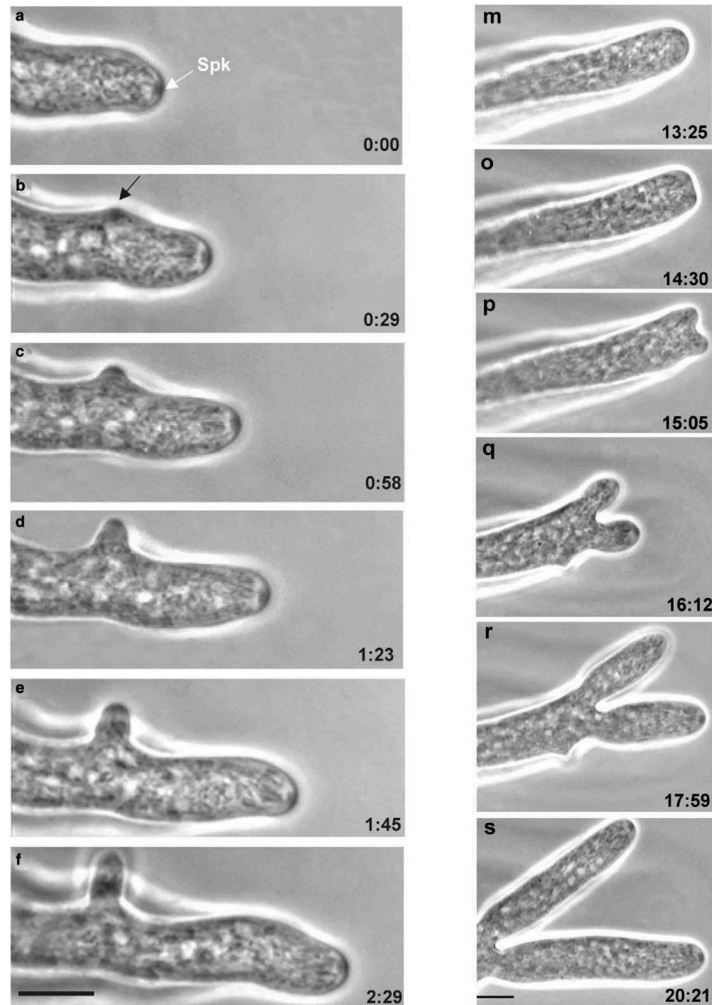


FIG. 4.33 – À gauche, branchement subapical chez *N. crassa*, où le SPK de l'hyphe mère n'est pas altéré. À droite, branchement dichotomique, où le SPK disparaît temporairement, avant l'apparition de deux nouveaux. Barres d'échelle : 10 μm [170].

Par ailleurs, les branchements subapicaux de *P. anserina* sont caractérisés par le phénomène de dominance apicale, selon lequel l'extension de l'hyphe est périodiquement prédominante sur la formation de nouveaux axes de polarité dans le voisinage de l'apex [166] [176]. Le processus de déclenchement du branchement reste encore très obscur. Une hypothèse repose sur l'idée que la formation d'une branche est initiée lorsque que le volume de cytoplasme par apex dépasse une

certaine valeur critique [4]. Similairement, certains auteurs proposent qu'une accumulation trop élevée de vésicules d'exocytose au niveau de l'apex (voir section 1.2.8, p.38), qui dépasserait la capacité d'insertion à la paroi, pourrait déclencher périodiquement un branchement apical en offrant aux vésicules une voie alternative [166] [171]. Dans les deux cas, la dominance apicale observée pourrait correspondre à la durée nécessaire pour atteindre le seuil critique en volume de cytoplasme ou en concentration de vésicules.

Le phénomène de dominance apicale est favorisée par l'existence d'un gradient d'ions calcium, ainsi qu'à la présence d'espèces réactives de l'oxygène à l'apex [167] [168]. Chez *N. crassa*, la dissipation du fort gradient de calcium à l'extrémité de l'hyphe favorise la formation de branches dans la région subapicale [176]. De même, la délétion de septines chez *A. nidulans* augmente le taux de branchement [168]. Ainsi, Coudert *et al.* [168] ont émis l'hypothèse que l'apparition de branchements pourrait être le « mode par défaut » de l'hyphe, et que ce processus serait largement inhibé grâce à plusieurs mécanismes.

Enfin, il a été montré chez *A. nidulans* que l'émergence de branches est temporellement liée à la division des noyaux. Cette coordination est observable pour cette espèce, car son mode de division des noyaux est parasynchronisé : la mitose est initiée localement, puis est suivie d'une vague de divisions qui se propage à travers l'hyphe. Le lien entre branchement et division nucléaire est cependant plus délicat à étudier chez des espèces comme *N. crassa*, pour lesquelles les noyaux sont très nombreux et leur division non synchronisée [167].

Branchements latéraux

Alors que les branchements apicaux interviennent régulièrement à l'extrémité de l'hyphe, les branchements latéraux peuvent se produire tout le long de celle-ci. Se pose alors la question de la position : existe-il un mécanisme qui déterminerait la localisation spécifique d'une branche latérale ? Les travaux s'intéressant à cette problématique sont rares, notamment parce que l'identification rigoureuse des branches latérales est peu décrite. Selon certains auteurs, le branchement pourrait être un processus stochastique, lié à une nouvelle polarisation spontanée [74] [168]. Chez *P. anserina*, nous avons néanmoins observé certains critères déterminant la position des branchements latéraux. D'une part, ils respectent une certaine distance à l'apex (480 µm minimum). D'autre part, ils ne se produisent pas dans le voisinage direct des nœuds apicaux déjà existants. On peut envisager le fait que des branchements trop proches fragiliseraient dangereusement la paroi de l'hyphe. Enfin, ils semblent se former par groupes, et apparaissent ainsi à proximité les uns des autres. Cette spécificité pourrait être liée à des propriétés locales de l'hyphe propices au branchement, par exemple une paroi plus souple [168]. De plus, les vésicules sécrétoires en circulation en direction de l'apex pourraient s'accumuler en chemin à une position localisée, et provoquer le branchement [169]. La présence de facteurs de polarité comme Cdc42 (voir section 1.2.6, p.33) a par ailleurs été observée comme étant amplifiée au niveau des sites de branchement chez *A. nidulans* et *N. crassa* [168].

Si de nombreuses mesures de longueurs entre les nœuds ont été effectuées chez différentes espèces de champignons filamenteux, il reste délicat d'établir des comparaisons dans la mesure

où la nature des branchements est rarement explicitée. Comme nous l'avons vu pour le mycélium de *P. anserina*, la répartition des branches est en effet grandement liée à leur nature apicale ou latérale. Riquelme *et al.* [74] indiquent par exemple que l'espace inter-branche le plus commun chez les champignons est de 100 μm , mais qu'il peut varier jusqu'à plus de 1 000 μm . Soufan *et al.* [138] ont mesuré une distance de $180 \pm 11 \mu\text{m}$ entre les branches de *R. solani*, et Vidal-Diez de Ulzurrun *et al.* [131] une longueur de $186 \pm 7 \mu\text{m}$ pour *P. velutina*.

Certains auteurs estiment la longueur du segment moyen entre deux branches par le biais de la grandeur « hyphal growth unit » (HGU), définie comme le ratio entre la longueur totale du mycélium (ou d'une hyphe) et le nombre total d'apex (ou le nombre d'apex sur cette hyphe). De cette manière, la distance moyenne pour *N. crassa* est de 400 μm , et de 130 μm pour *A. nidulans* [4] [134].

Les distances inter-nœuds sont intéressantes à évaluer dans la mesure où elles sont caractéristiques du mycélium d'une espèce en particulier, et pourraient ainsi constituer un critère pour distinguer les espèces, comme le proposent Vidal-Diez de Ulzurrun *et al.* [131]. Cependant, ces grandeurs restent pertinentes lorsque seules les branches apicales sont prises en compte. De fait, comme nous l'avons vu dans cette section, les branchements latéraux interviennent de manière non chronologique le long de l'hyphe, réduisant alors la distance moyenne entre les nœuds au cours du temps. Cette évolution décroissante a également été mise en évidence chez *Penicillium lilacinum* [131] et chez *P. placenta* [132]. De plus, la répartition des branchements est influencée par les conditions de croissance, ce qui complexifie encore davantage la comparaison entre espèces [122] [74].

Influence du milieu de culture sur la répartition des branchements apicaux

L'analyse des taux de branchements apicaux de *P. anserina* pour des expériences sur milieu riche M2 et sur milieu pauvre M0 ont mis en évidence que l'architecture globale du réseau mycélien définie par les branches apicales reste similaire dans les deux conditions. La croissance sur un milieu pauvre est néanmoins différente de celle en milieu riche, car la vitesse de croissance des hyphes est plus faible. En appliquant la même procédure que celle utilisée dans la section 4.2.1, p. 106 pour un milieu riche, la vitesse d'extension des hyphes apicales sur milieu pauvre a été estimée comme étant 20 % plus faible que sur milieu riche : $3,502 \pm 0,008 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ en milieu pauvre M0 ($N = 40$), contre $4,594 \pm 0,007 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ en milieu riche M2 ($N = 40$).

Cette conservation de la structure globale du réseau suggère que la répartition des nœuds observée ici constitue un éventuel optimum adopté par le mycélium, et qu'il existe probablement un mécanisme imposant une synchronisation avec la vitesse de croissance. De fait, un compromis doit s'établir entre la croissance de l'apex et le branchement. D'une part, l'extension de l'apex est essentielle à l'exploration de l'environnement, d'autre part, le branchement permet à l'hyphe d'évoluer en deux dimensions, et assure l'exploitation du milieu sur des régions déjà colonisées par le mycélium [166] [139] [168].

En fonction de l'espèce, plusieurs stratégies de croissance ont été décrites. Certains mycéliums misent par exemple sur une connectivité minimale et un transport favorisé en direction du front de croissance pour assurer une exploration efficace, alors que d'autres réseaux sont

plus robustes grâce à un taux de branchement accru. Les différentes stratégies requièrent des coûts énergétiques et matériels propres à chacune [42]. Bien que ralenti sur un milieu pauvre, il semblerait que le mycélium de *P. anserina* adopte une stratégie similaire en forte ou faible présence de nutriments, en conservant une connectivité probablement optimale, dans un compromis prenant en compte coût énergétique, robustesse et exploration. Néanmoins, on notera que les branchements latéraux, qui participent également à l'architecture qu'adopte le réseau, suivent probablement une réparation légèrement différente sur milieu riche et pauvre. En effet, nous avons montré dans la section section 3.4, p.80 qu'à une surface totale égale, le mycélium est moins dense sur milieu pauvre M0 que sur milieu riche M2.

4.4 Interactions entre les hyphes

On s'intéresse dans cette section aux différents comportements que peut adopter un apex lorsqu'il se trouve en contact ou à proximité d'une hyphe du mycélium. Comme évoqué précédemment (voir section 4.1.1, p.102), l'orientation des hyphes est affectée par le phénomène d'autotropisme, qualifié de négatif lorsque les hyphes s'évitent, et de positif lorsqu'elles s'attirent. Les images successives du mycélium en croissance permettent d'identifier des apex qui entrent dans le voisinage d'une hyphe déjà existante. Les images sont issues d'expériences utilisant la souche sauvage de *P. anserina* en conditions standards de croissance.

4.4.1 Comportements d'un apex à proximité d'une hyphe

Lorsqu'un apex se dirige en direction de la paroi d'une hyphe du mycélium, plusieurs cas de figure peuvent se présenter. Les différents comportements observés sur le thalle de *P. anserina* sont résumés sur la figure 4.34. On distingue d'une part les cas où l'apex entre en contact avec la paroi de l'hyphe (figures 4.34 A, B, C), et d'autre part les cas « d'évitements », pour lesquels les deux hyphes n'établissent pas de contact (figure 4.34 D). Ces derniers cas d'évitements sont délicats à définir précisément, dans la mesure où l'hyphe suit naturellement une trajectoire non rectiligne. On ne peut pas établir avec certitude que la déviation de l'apex est de fait due à la présence d'une hyphe sur sa trajectoire initiale. Nous proposerons néanmoins une identification et une méthode d'analyse des cas d'évitements dans la section 4.4.3, p.140.

Parmi les configurations où les deux hyphes entrent en contact, trois comportements différents ont été observés. Tout d'abord, l'apex peut stopper sa croissance dès qu'il atteint la paroi de « l'hyphe cible » (figure 4.34 A). Il peut s'agir soit d'un phénomène d'anastomose, soit d'un arrêt spontané de l'apex. Les images ne permettant pas de distinguer ces deux possibilités, on fera référence à un arrêt de l'apex pour décrire ce comportement. Ensuite, « l'hyphe incidente » peut poursuivre sa trajectoire en chevauchant l'hyphe cible (figure 4.34 B). On peut envisager que l'apex croise soit au-dessus, soit en-dessous de l'hyphe qui coupe sa trajectoire, mais le processus réel n'est pas identifiable sur les images. Enfin, l'hyphe peut également être déviée

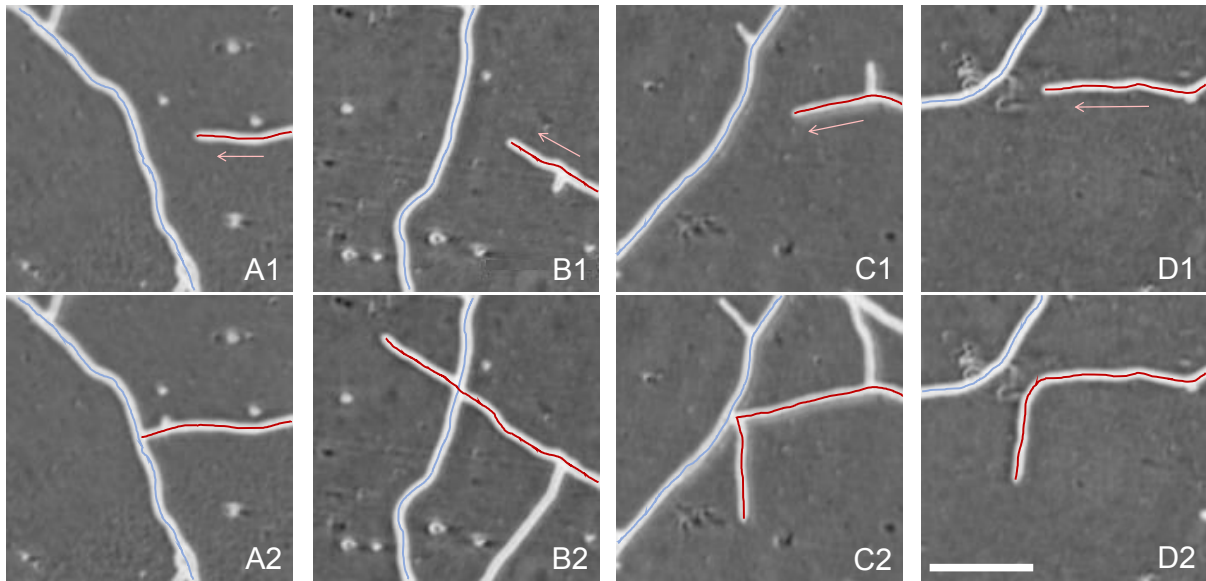


FIG. 4.34 – L’hyphe incidente en croissance en direction d’une autre (flèche) est marquée en rouge et l’hyphe cible en bleu. Chaque colonne présente une configuration possible A, B, C ou D. Une durée de 30 minutes sépare les images de la ligne 1 et celles de la ligne 2. (A) arrêt ou anastomose ; (B) chevauchement ; (C) déviation ; (D) évitement. Barre d’échelle : 100 μm .

lors du contact avec l’hyphe cible. Dans ce cas de figure, l’hyphe forme un angle dont le sommet est le point de contact (figure 4.34 C). Cette trajectoire particulière n’est jamais observée pour des hyphes seules, qui présentent seulement des trajectoires courbées. On notera que dans les deux cas de chevauchement et de déviation (figures 4.34 B et C), la croissance de l’apex est perpétuée suite au contact avec l’hyphe cible, contrairement à la configuration où l’apex s’arrête (figure 4.34 A).

4.4.2 Point de contact entre les hyphes

Tout d’abord, les configurations pour lesquelles un contact se produit seront analysées, c’est-à-dire les arrêts et les perpétuations (chevauchements et déviations), comme représenté sur la figure 4.35. Les cas d’évitements ne sont pas considérés ici.

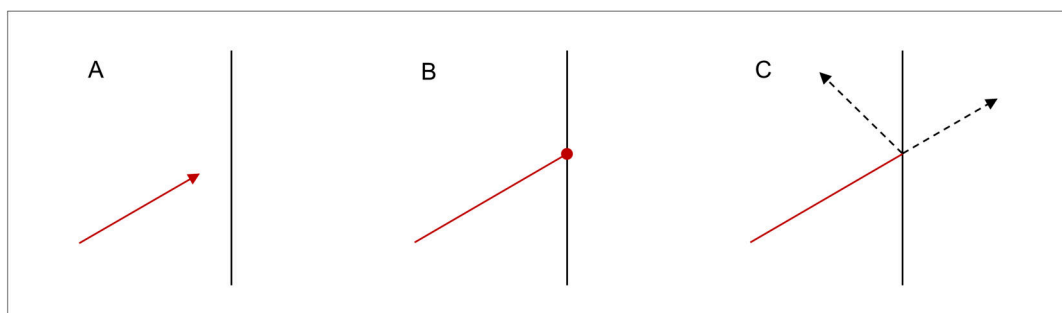


FIG. 4.35 – Un apex qui arrive dans le voisinage d’une hyphe cible (droite noire) (A) voit sa croissance s’arrêter au niveau de la paroi de cette hyphe (B), ou bien perpétue son extension après le contact (C). Dans ce dernier cas, l’hyphe est soit déviée par l’hyphe cible, soit la chevauche (flèches en pointillé).

Arrêts de croissance et perpétuations

Le comportement de branches apicales et latérales suite à un contact avec une autre hyphe est déterminé directement sur les images du mycélium. L'accès à la dynamique des hyphes permet de distinguer les différents processus sans ambiguïté.

On considère le cas « arrêt de l'apex » lorsque celui-ci ne reprend pas sa croissance avant la dernière image du mycélium disponible (fin de l'expérience). Cette durée varie selon les relevés, mais représente au minimum un intervalle de temps de 5 heures. Une attention particulière doit en effet être portée sur la distinction entre arrêts de l'apex et chevauchements, car ces derniers peuvent induire des arrêts de croissance seulement temporaires. On notera par ailleurs que la résolution spatiale et temporelle des images ne permet pas de distinguer les perpétuations d'une configuration combinant un arrêt de l'apex au contact de la paroi et un branchement simultané au niveau du point de contact. Cette configuration alliant synchronisation du moment de contact et de branchement peut être considérée comme très rare par rapport à la fréquence des cas de contact.

L'étude est menée en observant la dynamique d'une collection d'hyphes issues de branchements apicaux d'une part, et latéraux d'autres part. Le comportement associé à chaque hyphe est observé lorsque la branche rencontre la première hyphe sur sa trajectoire depuis son émergence au niveau du point de branchement. Les observations sont réalisées sur un effectif N d'une centaine de branches apicales et latérales respectivement. En considérant n le nombre d'arrêts, on estime la probabilité associée à l'arrêt par $P_N = \frac{n}{N}$, et la probabilité complémentaire (cas de perpétuations) par $1 - P_N$. L'incertitude est estimée par $\sigma^2 = N P_N(1 - P_N)$. Les valeurs numériques sont résumées sur la figure 4.36.

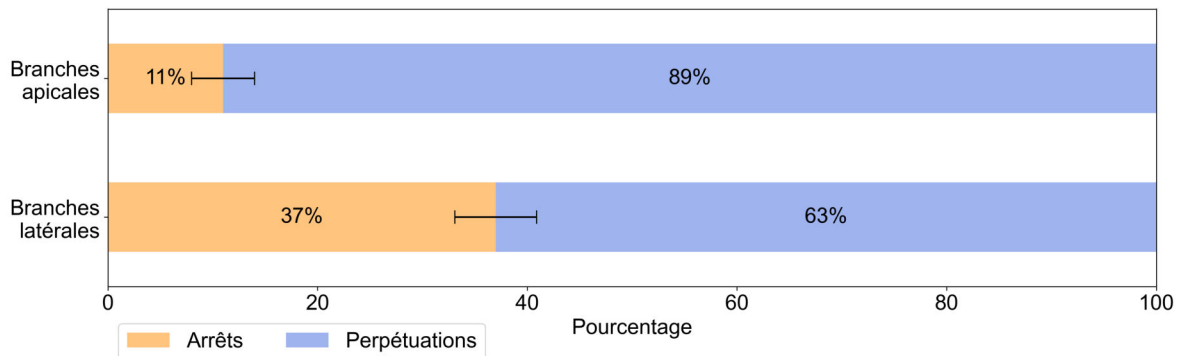


FIG. 4.36 – Répartition des configurations « arrêts » (orange) ou « perpétuations » (bleu) pour une collection de branches apicales ($N = 104$, barre d'erreur : 3%) et une collection de branches latérales ($N = 155$, barre d'erreur : 3,9%). Voir le texte pour l'estimation de l'incertitude.

On constate que les configurations majoritaires sont les perpétuations pour les hyphes apicales ainsi que les hyphes latérales. Deux mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer l'existence de ces deux comportements d'arrêt ou de perpétuation. Le premier est lié à l'angle incident de l'apex par rapport à l'hyphe préexistante. Un angle proche de 0° serait favorable à une perpétuation, tandis qu'un angle proche de 90° serait davantage favorable à un arrêt. Nous

étudierons ce paramètre dans le paragraphe suivant. Le deuxième mécanisme lie le comportement de l'apex au coût énergétique du contact, nul dans le cas des arrêts, mais non nul dans le cas des perpétuations, comme nous le montrerons dans le cas des chevauchements dans la partie suivante. En s'appuyant sur la vitesse de croissance comme proxy de l'intensité métabolique, on peut s'attendre à un arrêt pour les apex en croissance à vitesse réduite. Cette hypothèse est en accord avec la figure 4.36, sur laquelle on constate que les interruptions de croissance sont plus fréquentes pour les branches latérales que pour les branches apicales. Nous avons estimé par ailleurs (section 4.2.5, p.114) que les apex latéraux sont environ trois fois plus lents que les branches apicales.

On cherche ensuite à étudier les valeurs des angles définis par les deux hyphes en contact, comme schématisé sur la figure 4.37. Les angles θ et θ' sont mesurés par le biais d'un relevé des points d'intersection entre un cercle de rayon fixé et les hyphes. Le centre du cercle est placé sur le point de contact, et son rayon est d'environ cinq diamètres d'hyphes. Les angles sont nommés de telle sorte que θ soit supérieur à θ' . On notera qu'étant donné que l'hyphes cible peut être légèrement courbée, la somme $(\theta + \theta')$ n'est pas nécessairement égale à 180° .

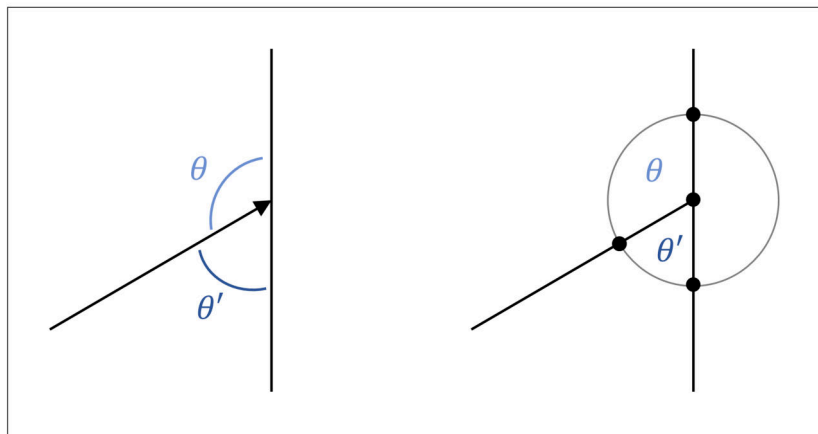


FIG. 4.37 – Les angles θ et θ' sont définis par l'intersection entre l'hyphes incidente (flèche) et l'hyphes cible (droite verticale), de telle sorte que $\theta > \theta'$. Le sommet des angles est le point de contact. Les valeurs de θ et θ' sont mesurées grâce à un cercle de rayon fixé ($80\mu\text{m}$) centré sur le sommet. On relève ensuite les trois points d'intersection entre le cercle et les hyphes.

La mesure des angles θ et θ' est effectuée pour toute la collection de branches apicales et latérales étudiée sur la figure 4.36, soit 259 configurations d'arrêt ou de perpétuation. La figure 4.38A représente l'histogramme de la différence $(\theta - \theta')$ normalisée par la somme $(\theta + \theta')$. Les valeurs étant majoritairement faibles, l'apex atteint l'hyphes cible dans une configuration plutôt orthogonale. Les densités de probabilité estimées pour chacune des catégories « arrêts » et « perpétuations » sont tracées sur la figure 4.38B. Les courbes ont des allures très similaires, indiquant que l'angle formé entre les deux hyphes en contact ne permet pas de distinguer les configurations d'arrêt et de perpétuation. La vitesse d'approche de l'hyphes incidente joue probablement un rôle clé dans l'orientation vers un comportement, soit d'arrêt, soit de perpétuation.

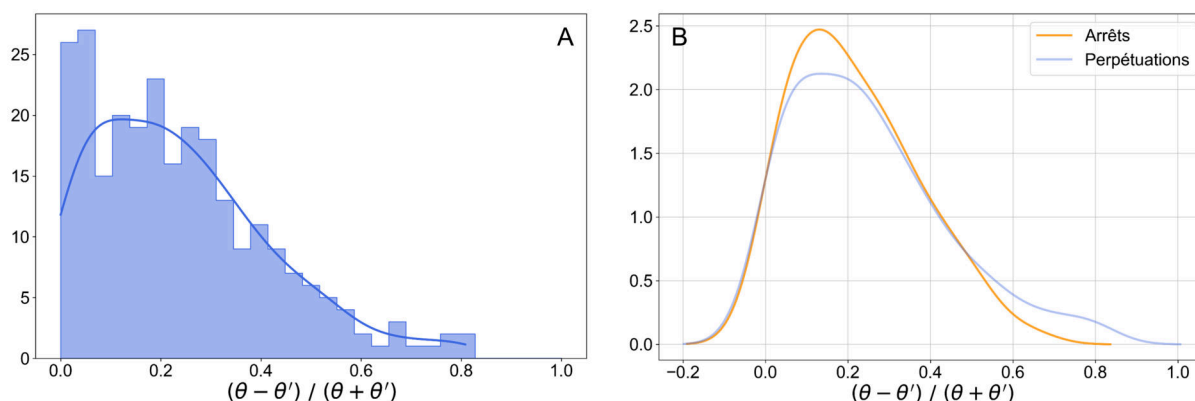


FIG. 4.38 – À gauche, histogramme de la différence entre $\theta - \theta'$ normalisée par $(\theta + \theta')$ pour des hyphes incidentes apicales et latérales formant des configurations d'arrêt ou de perpétuation avec l'hyphe cible ($N = 259$, valeur la plus probable : 0,13). À droite, les densités de probabilité estimées pour les cas d'arrêts de l'apex d'un part (jaune, $N = 77$) et de perpétuations d'autre part (bleu, $N = 182$). La valeur la plus probable pour les deux catégories est de 0,13.

Comportements des hyphes suite au chevauchement

Dans la catégorie des perpétuations de l'hyphe incidente suite au contact, les chevauchements sont majoritaires par rapport aux déviations, et représentent environ 75% ($N = 182$ cas de perpétuations). On choisit ici de s'intéresser aux configurations les plus probables : les chevauchements. L'objectif est de déterminer l'impact éventuel du chevauchement sur l'hyphe incidente. De prime abord, ce processus ne semble pas neutre pour l'hyphe incidente, puisqu'on observe parfois un arrêt de l'apex après quelques minutes de croissance suivant le chevauchement, et qui se maintient jusqu'à la fin de l'expérience. Cette interruption de croissance survient dans environ 25% des cas ($N = 136$ chevauchements). On émet ici l'hypothèse que le chevauchement est à l'origine de l'arrêt lorsque celui-ci se produit 20 minutes après le chevauchement au maximum, soit la durée entre l'acquisition de deux images.

Afin d'analyser les effets éventuels du chevauchement sur le comportement de l'hyphe incidente, les coordonnées de son apex sont relevées au cours du temps, suivant la procédure décrite dans la section 4.2.1, p.106. La longueur de l'hyphe ainsi que sa vitesse au cours du temps peuvent ainsi être extraites à partir des images du mycélium. Le suivi de l'apex débute à partir d'un instant antérieur au contact entre les deux hyphes, et est poursuivi après le chevauchement. Cette procédure est réalisée pour une collection de 10 hyphes issues de branchements apicaux d'une part, et 10 hyphes latérales d'autre part. Le chevauchement étudié est le premier contact de l'hyphe incidente depuis son émergence au niveau du nœud.

Globalement, deux dynamiques principales sont observées. Un exemple est présenté pour chacune sur la figure 4.39. Dans le premier cas (A), l'apex interrompt ponctuellement sa croissance juste après le contact (symbolisé par la droite verticale en pointillé), avant de récupérer une vitesse proche de sa vitesse initiale. Le deuxième cas (B) est similaire, mais la vitesse de reprise est significativement inférieure à la vitesse initiale.

Pour les deux exemples présentés, il semblerait que la vitesse commence à décroître quelques

minutes avant l'établissement du contact entre les deux hyphes. La vitesse d'extension atteint ensuite un minimum proche de la valeur nulle, puis augmente pour atteindre à nouveau une vitesse stationnaire.

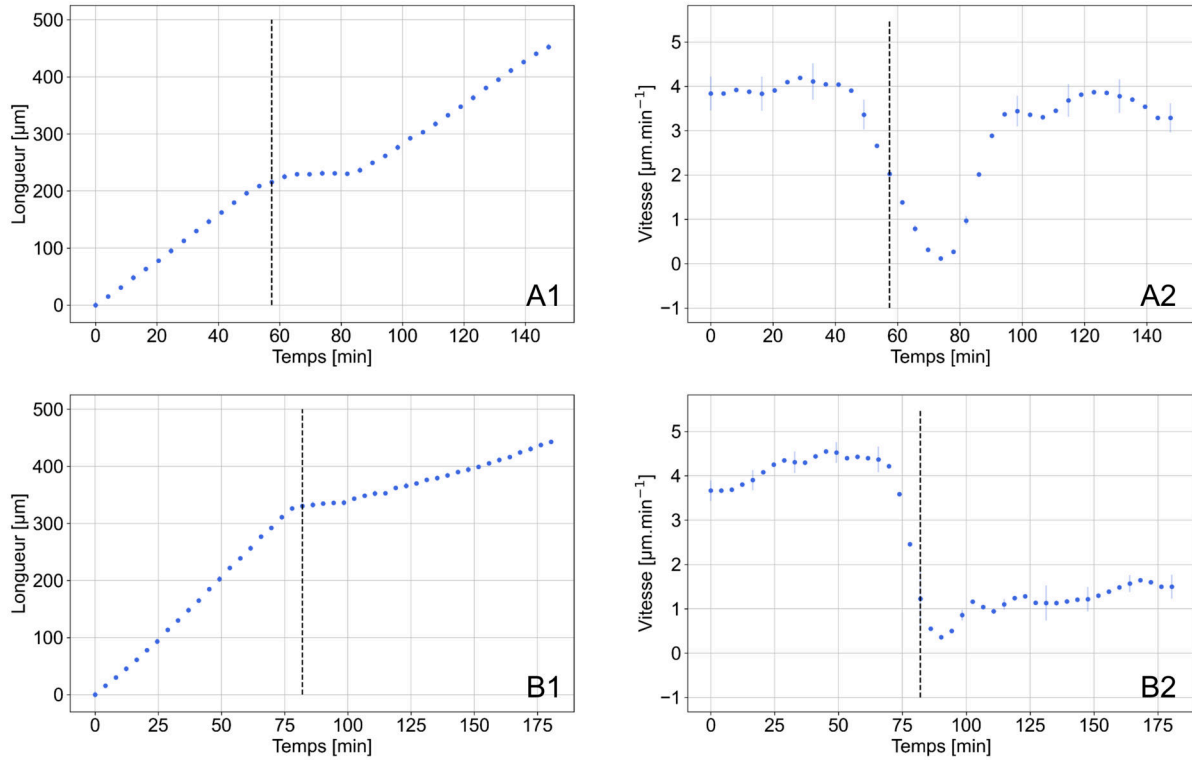


FIG. 4.39 – La première colonne (1) représente la longueur de l'hyphe au cours du temps pour un exemple A et pour un autre B. La deuxième colonne (2) représente l'évolution temporelle des vitesses associées, calculées à partir de la courbe des longueurs lissée (voir section 4.2.2, p. 107). La droite verticale en pointillé indique le moment du contact. Les barres d'erreur sont marquées tous les quatre points.

Ainsi, les observations issues des 20 échantillons semblent indiquer que le chevauchement peut provoquer à la fois une interruption ponctuelle de croissance et un ralentissement de la vitesse d'extension de l'hyphe incidente. On se demande alors s'il existe une corrélation entre la durée de l'interruption de croissance et la variation de la vitesse lors du chevauchement. Pour cela, la vitesse initiale avant contact V_i est extraite à partir d'un ajustement linéaire sur les points expérimentaux représentant l'évolution temporelle de la longueur. L'ajustement est réalisé entre le point initial du suivi et le moment du chevauchement. De même, la vitesse de reprise suite à l'arrêt de croissance V_f est extraite en définissant manuellement la région d'ajustement. La durée d'interruption de croissance Δt est définie entre l'abscisse du dernier point d'ajustement de V_i et le premier de V_f . Enfin, ΔL_0 correspond à la perte de longueur associée à l'arrêt de croissance comparé au cas sans obstacle, comme indiqué sur la figure 4.40.

La figure 4.41 représente le ralentissement lié au chevauchement, caractérisé par la grandeur $\Delta V = V_f - V_i$ normalisée par $(V_i + V_f)$, en fonction de la durée de l'interruption de croissance Δt . La répartition des points met en évidence le fait que suite au chevauchement, le comportement

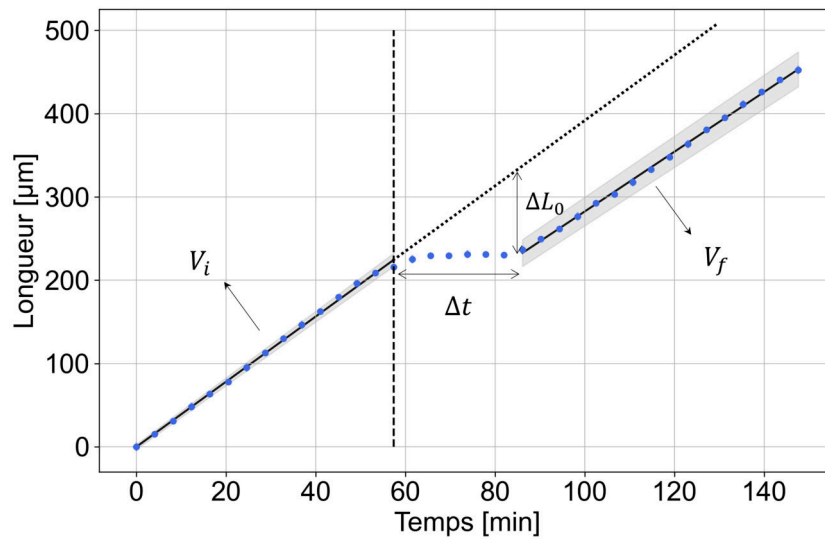


FIG. 4.40 – V_i est la vitesse avant contact, calculée par ajustement linéaire sur les données de longueurs de l'hyphe. V_f est la vitesse de reprise suite à l'interruption de croissance, dont le premier point inclus dans l'ajustement est déterminé manuellement. Les droites d'ajustement sont représentées en noir et la surface grise correspond à l'incertitude associée (un écart-type). Δt est la durée de l'arrêt de croissance et ΔL_0 la perte de longueur associée à Δt . Pour cet exemple, $V_i = 3,91 \pm 0,05 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, $V_f = 3,59 \pm 0,07 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, $\Delta t = 28,6 \text{ min}$, $\Delta L_0 = 98 \mu\text{m}$.

de l'apex est impacté par rapport à sa dynamique pré-contact dans la majorité des cas. D'une part, il peut connaître une phase d'arrêt de croissance, comprise ici entre 5 et 70 minutes. D'autre part, la vitesse de reprise peut être diminuée par rapport à la vitesse initiale. Il semblerait par ailleurs qu'un ralentissement important de l'apex soit associé à une longue phase d'interruption de croissance Δt . Un ajustement linéaire des points permet d'extraire la valeur du coefficient directeur : $0,008 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$.

Enfin, la distribution de ΔL_0 sur la figure 4.41 indique que le chevauchement induit une perte de matière par rapport à une croissance sans obstacle. La valeur la plus probable de la densité de probabilité de ΔL_0 est $54 \mu\text{m}$, soit une perte de longueur d'environ cinq diamètres d'hyphe. De plus, la perte de matière, notée ΔL , peut éventuellement se poursuivre lors de la reprise de croissance, étant donné que la vitesse V_f peut être inférieure à V_i . Ainsi, ΔL s'exprime comme $\Delta L(t) = \Delta L_0 + \Delta V t$, avec t le temps à partir de la reprise de croissance. La durée $\Delta t'$ nécessaire pour doubler la perte de longueur ΔL_0 (soit $\Delta L(\Delta t') = 2 \Delta L_0$) s'écrit alors : $\Delta t' = \frac{\Delta L_0}{\Delta V}$. La moyenne des valeurs de $\Delta t'$ pour les 20 chevauchements est autour de 90 minutes.

4.4.3 Autotropisme négatif : dynamique d'évitement entre deux hyphes

On considère à présent les configurations d'évitement, pour lesquelles l'hyphe incidente n'entre pas en contact avec l'hyphe cible. L'objectif est de cerner des paramètres relatifs à l'hyphe incidente permettant de prédire un comportement d'évitement ou bien de chevauchement, lorsque celle-ci se trouve dans le voisinage de l'hyphe cible (figure 4.42).

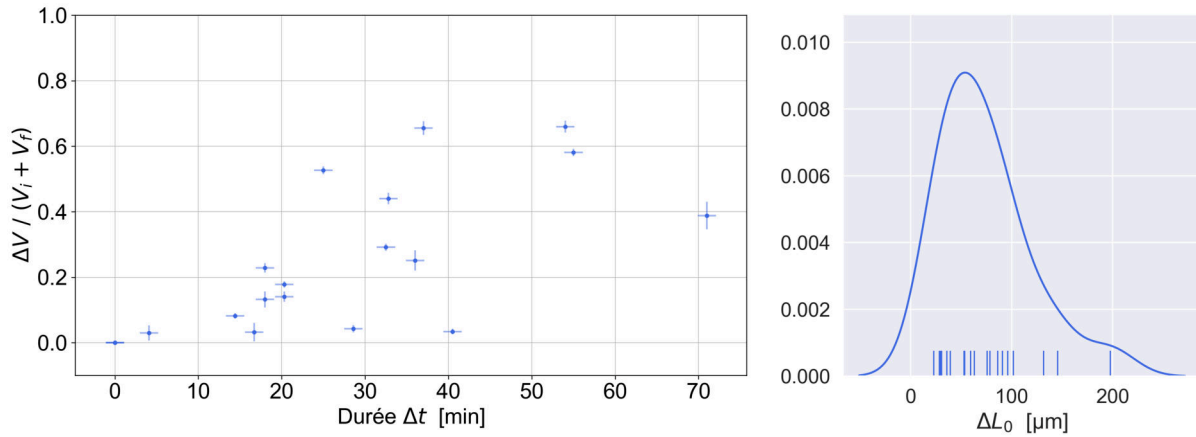


FIG. 4.41 – À gauche, la diminution de la vitesse de croissance liée au chevauchement est évaluée par ΔV normalisé par $(V_i + V_f)$, ici représentée en fonction de la durée d'interruption Δt ($N = 20$). À droite, la densité de probabilité estimée par noyau pour la longueur ΔL_0 (valeur la plus probable : $54 \mu\text{m}$, $N = 20$).

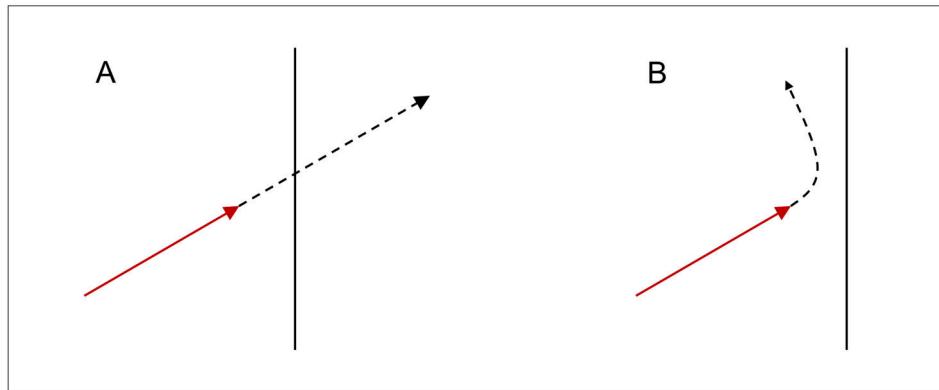


FIG. 4.42 – L'hyphe incidente (rouge) qui atteint le voisinage de l'hyphe cible (droite verticale noire) peut soit perpétuer sa croissance par un chevauchement (A), soit ne pas entrer en contact avec l'hyphe cible en déviant sa trajectoire (B).

Les paramètres étudiés ici sont l'angle d'approche formé entre les deux hyphes et la vitesse d'extension de l'hyphe incidente. Des collections de 28 dynamiques de chevauchement et d'évitement respectivement seront analysées.

On définit une portion de $300 \mu\text{m}$ (30 diamètres d'hyphes environ) de l'hyphe cible sur laquelle on approxime sa trajectoire légèrement courbée par un segment de droite (figure 4.43). Celui-ci a pour milieu le point de contact dans le cas des chevauchements. Dans le cas des évitements, on estime le milieu du segment en repérant la région où l'apex est à la distance minimale de l'hyphe cible, avant de s'en éloigner. Sur les images successives de l'hyphe en croissance, on mesure la longueur d_{\perp} du segment perpendiculaire à l'hyphe cible (estimée par un segment de droite) et passant par l'apex incident (figure 4.43).

Comme évoqué précédemment, les configurations d'évitement sont délicates à définir du fait de la courbure naturelle des hyphes. On considérera qu'il s'agit d'une dynamique d'évitement lorsque la valeur minimale de d_{\perp} est inférieure à $100 \mu\text{m}$, soit environ 10 diamètres d'hyphes.

Dans le cas des chevauchements, la longueur d_{\perp} est nulle lors du contact entre les hyphes, et négative par la suite (figure 4.43).

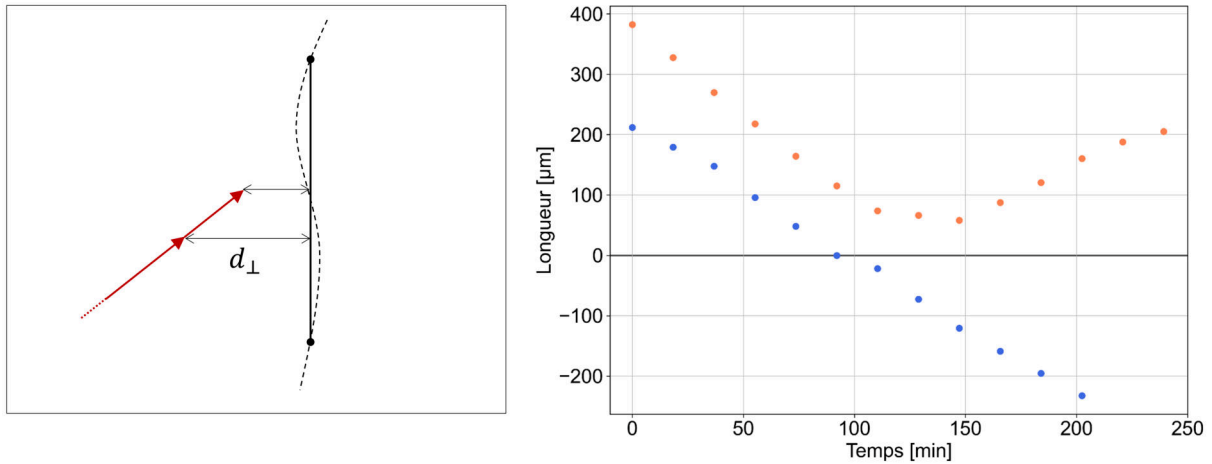


FIG. 4.43 – À gauche, définition de la distance d_{\perp} entre l'apex de l'hyphe incidente (rouge) et l'hyphe cible, dont la trajectoire est localement approximée par un segment de droite (segment vertical noir). À droite, évolution temporelle de d_{\perp} pour un exemple d'évitement (orange) et de chevauchement (bleu). La droite $y = 0$ correspond à la paroi de l'hyphe. Les barres d'erreur sont inférieures à la taille des marqueurs.

On définit ensuite v_{\perp} comme la vitesse moyenne entre chaque pas de temps. De plus, la vitesse de croissance v de chaque apex incident est estimée grâce à un relevé de points, en suivant la procédure décrite dans la section 4.2.1, p.106. La vitesse v est estimée par la moyenne des vitesses successives de l'apex jusqu'au temps où la valeur de d_{\perp} est minimale pour les évitements, et jusqu'à moment du contact pour les chevauchements.

La figure 4.44 combine les grandeurs d_{\perp} , v_{\perp} et v . Les deux dynamiques d'évitement et de chevauchement partagent des localisations de points communes dans la région où d_{\perp} est positive et v_{\perp} négative. En effet, dans les deux configurations, l'apex connaît une phase de rapprochement de l'hyphe cible. On distingue cependant deux populations distinctes : les cas d'évitements se caractérisent par des valeurs de v_{\perp} positives pour une partie des points, et les chevauchements se distinguent facilement par des distances d_{\perp} devenant négatives. L'échelle de couleurs représentant la vitesse de croissance v indique majoritairement des valeurs élevées pour les chevauchements, et les évitements couvrent une gamme de vitesses légèrement plus diversifiée, avec notamment une certaine proportion de vitesses plus faibles. Cette observation sera étudiée plus en détail dans le paragraphe suivant.

On note \vec{v} le vecteur vitesse de l'hyphe incidente, dont la norme est v , et la composante orthogonale est v_{\perp} . Un angle d'approche θ est défini de telle sorte que $\cos(\theta) = \frac{v_{\perp}}{v}$ (figure 4.45). Une valeur de θ peut ainsi être calculée pour chacune des images successives, jusqu'à atteindre l'instant du contact (chevauchement) ou le moment où d_{\perp} est minimale (évitement). Pour chaque hyphe étudiée, une valeur moyenne de v_{\perp} (notée \bar{v}_{\perp}) et de θ (notée $\bar{\theta}$) sont extraites dans l'intervalle $50 < d_{\perp} < 150 \mu\text{m}$. La répartition de $\bar{\theta}$ en fonction de \bar{v}_{\perp} est présentée sur la figure 4.45, en précisant les cas d'évitements et de chevauchements.

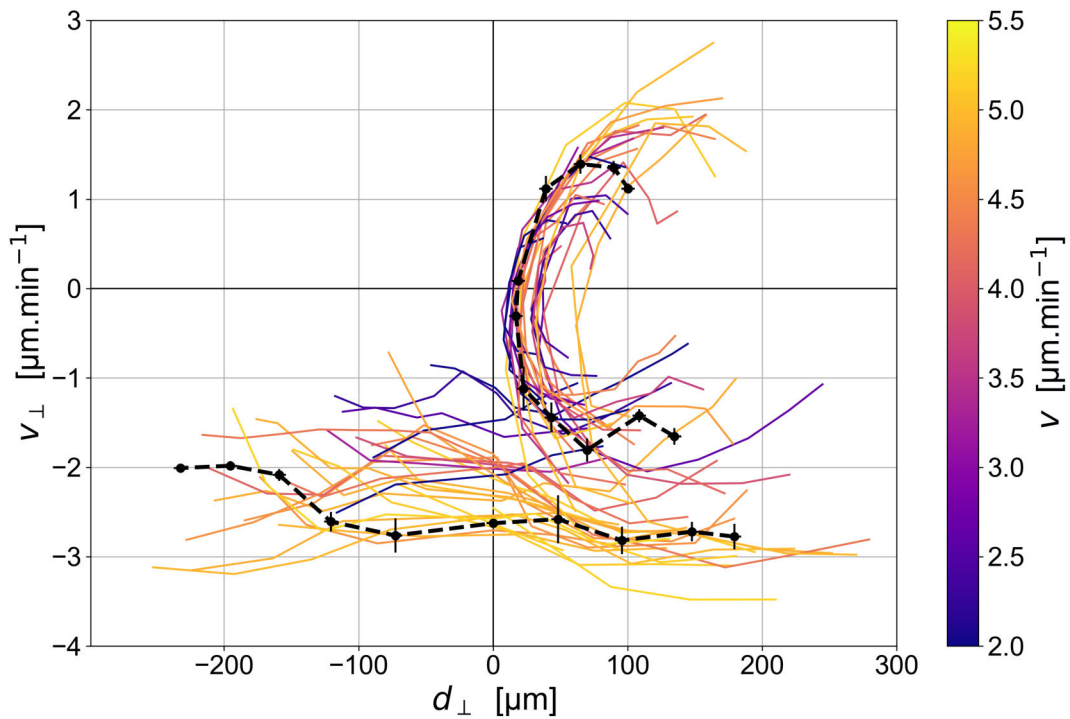


FIG. 4.44 – Vitesse v_{\perp} en fonction de d_{\perp} pour 28 cas de chevauchements et 28 cas d'évitements. Chaque collection de vitesses est lissée grâce à une moyenne glissante (taille de fenêtre : 3 points). La courbe lissée est représentée par les lignes dont la couleur indique la vitesse v (calculée sur un intervalle de points, voir texte). Deux trajectoires typiques pour un cas de chevauchement et un cas d'évitement sont représentés (points noirs reliés par une ligne en pointillé).

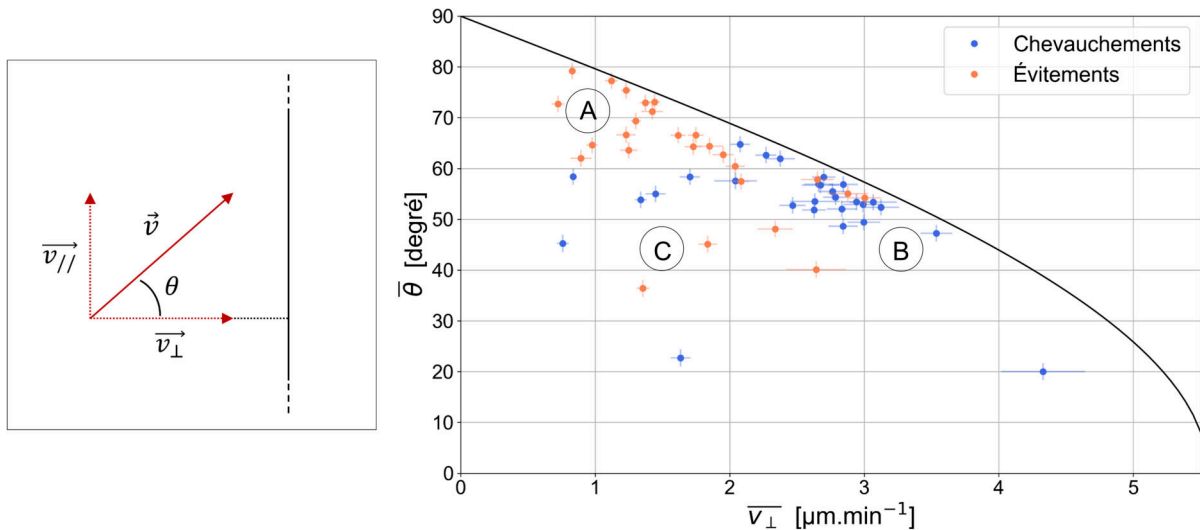


FIG. 4.45 – À gauche, schéma définissant l'angle d'approche θ , avec $\cos(\theta) = \frac{v_{\perp}}{v}$. À droite, l'angle $\bar{\theta}$ en fonction de \bar{v}_{\perp} . Les cas d'évitement sont marqués en orange, et les cas de chevauchement en bleu. La courbe noire représente la ligne critique indépassable en considérant que la vitesse maximale v d'une hyphe n'excède pas $5,5 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. Les régions A, B et C sont associées aux configurations schématisées sur la figure 4.46.

On distingue trois régions distinctes A, B et C sur la figure 4.45, associées à des configurations schématisées sur la figure 4.46. Tout d'abord, lorsque l'angle d'approche $\bar{\theta}$ est élevé, avec une vitesse v_{\perp} plutôt faible, les évitements semblent être favorisés (figure 4.46 A). Cette dynamique apparaît relativement intuitive, puisque dans cette configuration, une faible modification de trajectoire est suffisante pour éviter l'hyphe cible. Au contraire, les cas de chevauchement semblent se produire davantage lorsque l'angle d'incidence $\bar{\theta}$ est petit et v_{\perp} est plus élevée (figure 4.46 B). L'hyphe incidente s'approche ici de l'hyphe cible de manière plus orthogonale. Enfin, la région où les valeurs de $\bar{\theta}$ et de v_{\perp} sont faibles concerne à la fois des cas d'évitement et de chevauchement (figure 4.46 C). Dans cette zone, la prédiction du comportement de l'hyphe est ainsi indéterminée, d'autant plus que les points y sont peu nombreux.

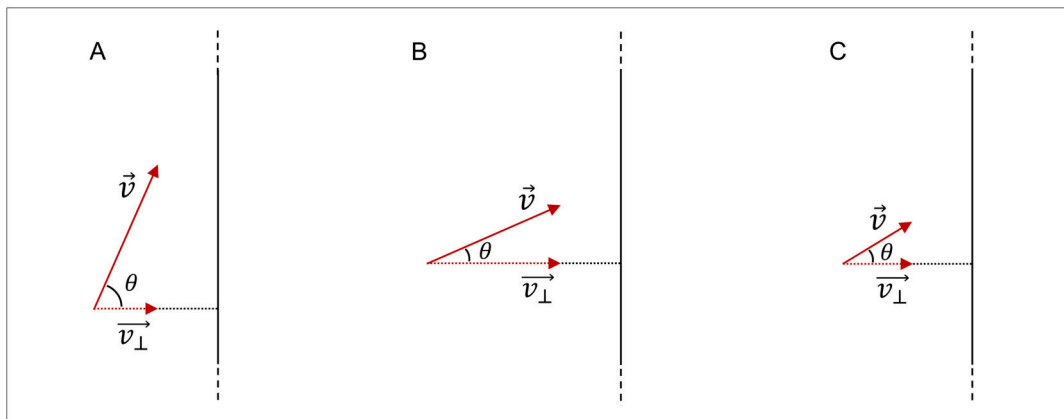


FIG. 4.46 – (A) θ élevé et v_{\perp} faibles favorisent l'évitement. (B) θ faible et v_{\perp} élevée favorisent le chevauchement. (C) θ et v_{\perp} faibles sont associés à la fois aux évitements et aux chevauchements.

4.4.4 Synthèse et discussion

Bien que la réorientation d'une hyphe en réponse à la présence de ses voisines soit fréquemment mentionnée dans les études portant sur l'organisation du mycélium chez plusieurs espèces filamenteuses, le mécanisme de ce processus nommé autotropisme reste mal connu [4] [173] [22]. L'autotropisme positif fait référence à l'attraction entre les hyphes d'une même colonie, et l'autotropisme négatif désigne au contraire les comportements d'évitement. Par simple observation des images du mycélium sur un substrat non contraignant pour les hyphes, il est difficile de discriminer l'origine de l'orientation des apex à proximité d'autres hyphes. De fait, l'orientation peut être influencée par un effet de rétroaction des hyphes voisines, ou bien être la simple conséquence des fluctuations spontanées de sa trajectoire [62].

Dans notre étude, nous avons cherché à caractériser les phénomènes d'autotropisme sur le thalle de *P. anserina* en ségrégant les dynamiques où deux hyphes se rencontrent, et les cas où un apex semble éviter une hyphe déjà présente sur sa trajectoire initiale. L'accès à la dynamique de croissance est un atout pour ce travail, puisqu'il est ainsi possible de distinguer sans ambiguïté les branchements et les rencontres d'un apex sur une paroi.

Si les situations de contact entre les hyphes peuvent être la conséquence d'un processus d'autotropisme positif, elles sont probablement également liées à la densité locale du mycélium, qui provoque des rencontres inter-hyphes aléatoires. Ce phénomène est d'autant plus accentué que les hyphes établissent des branchements avec un angle proche de 90° (voir section 5.2, p. 151), favorisant encore davantage les croisements au sein du mycélium.

Par ailleurs, nous avons observé sur le thalle de *P. anserina* des rencontres entre un apex et une hyphe uniquement, et non pas entre deux apex, comme largement décrit chez *N. crassa*. Chez cette espèce, on observe de manière évidente l'attraction entre les apex des « conidial anastomosis tubes » (CATs) issus de la germination de conidies (figure 4.47). L'attraction d'un apex en direction de la paroi d'une hyphe est plus difficile à mettre en évidence. De même, si la communication entre deux CATs a été décrite sur un modèle où chaque apex joue le rôle à la fois d'émetteur et de récepteur du signal de rapprochement, le mécanisme à l'œuvre entre un apex et une paroi reste plus obscur [74] [177].

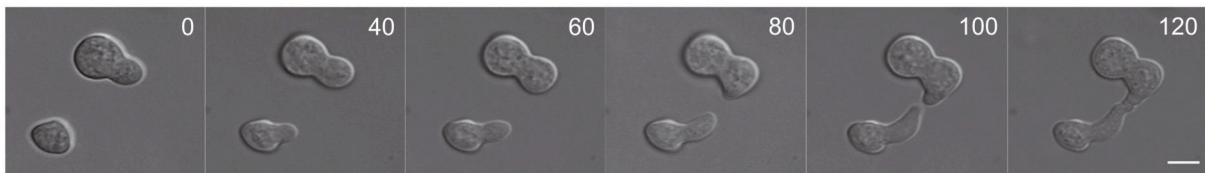


FIG. 4.47 – Les tubes germinatifs de *N. crassa* dirigent leurs apex l'un vers l'autre, jusqu'à l'anastomose. Les nombres indiquent le temps en minute. Barre d'échelle : $5\mu\text{m}$. (adapté de [177]).

Nous avons identifié deux catégories de rencontre entre les hyphes : soit une perpétuation de l'hyphe incidente suite au contact, incluant les chevauchements et les déviations, soit un arrêt de l'apex au point de contact. Si ce dernier cas peut être un processus d'anastomose, nos images ne permettent pas d'identifier la nature du phénomène avec certitude. L'utilisation de la microscopie en fluorescence offre la possibilité de lever l'indécision, comme mis en évidence chez *N. crassa* sur la figure 4.48. En outre, chez *P. anserina*, les branches latérales sont davantage susceptibles de s'arrêter en rencontrant la paroi de l'hyphe cible par rapport aux hyphes apicales. Cette différence de comportement pourrait éventuellement être mise en relation avec les vitesses de croissance propres à chaque nature d'hyphe (voir section 4.2, p. 105). En effet, la faible vitesse des hyphes latérales pourrait être propice à l'établissement de l'anastomose, en augmentant la durée de contact entre l'apex et l'hyphe rencontrée. Au contraire, les hyphes apicales plus rapides favoriseraient la perpétuation de la croissance apicale.



FIG. 4.48 – Chez *N. crassa* : un apex provenant d'un mycélium non marqué entre en contact avec une hyphe marquée en fluorescence avec le colorant FM 1-43. La mise en place de la continuité cytoplasmique est observable (astérisque). Barre d'échelle : $10\mu\text{m}$. (adapté de [174]).

Dans nos expériences, le chevauchement est la configuration la plus fréquente lors d'un contact chez *P. anserina*, que ce soit pour les hyphes apicales ou latérales. Ce processus de croisement entre deux hyphes semble provoquer un impact sur l'apex incident, dans la mesure où nous avons observé son arrêt temporaire ou total directement suite au chevauchement. La reprise éventuelle de la croissance peut ensuite être plus lente en comparaison de la vitesse pré-contact, mais nous n'avons pas observé de situation où la vitesse était plus rapide. Il serait par ailleurs pertinent d'étudier l'influence éventuelle de la vitesse et de l'angle d'approche sur le comportement post-chevauchement. Ce processus est à l'origine d'une perte de production de matière pour l'hyphe, pouvant alors justifier l'intérêt de l'autotropisme négatif observé, grâce auquel l'apex n'entre pas en contact avec l'hyphe présente sur sa trajectoire. On peut émettre l'hypothèse qu'un comportement d'évitement, pour lequel l'hyphe modifie légèrement son orientation, requiert moins d'énergie qu'un chevauchement, pour lequel l'apex est contraint face à un obstacle d'une certaine hauteur.

La dynamique d'évitement reste quant à elle délicate à identifier. Afin de proposer des critères de prédiction éventuels d'un autotropisme positif ou négatif, nous avons choisi de considérer le cas d'évitement lorsque l'apex se rapproche de l'hyphe cible, puis s'en éloigne à nouveau. Les observations tendent à indiquer que globalement, l'évitement est favorisé par une vitesse importante et orientée plutôt parallèlement à l'hyphe cible, tandis que le chevauchement est fréquemment observé lorsque deux hyphes sont en configuration orthogonale. Seuls l'angle d'incidence et la vitesse ont ici été considérés, et d'autres paramètres entrent probablement en jeu dans l'orientation de l'apex.

Si l'autotropisme est largement évoqué comme « évident » dans la littérature (figure 4.49), les outils de prédiction et de mise en évidence de ce phénomène sont très rares [73] [178].



FIG. 4.49 – Front de croissance de *N. crassa*, où les hyphes marquées avec le colorant FM 1-43 sont présentées comme ayant un comportement d'évitement les unes par rapport aux autres (astérisques). Barre d'échelle : 50 μm [174].

Cette dynamique d'attraction et de repoussement, présente chez de nombreux eucaryotes, est supposée reposer principalement sur le chimiotropisme, c'est-à-dire une orientation en réponse

à des signaux chimiques [179] [173] [180]. La topographie de l'environnement de croissance est également évoquée [180]. L'autotropisme renvoie à la notion de communication entre les hyphes, au sein d'un même mycélium ou entre deux organismes différents. Cette capacité d'interaction est essentielle à la reconnaissance des partenaires sexuels, à la symbiose, ou encore à l'identification des proies et des prédateurs [172].

L'autotropisme positif pouvant mener à des anastomoses, il s'agit d'un processus particulièrement important pour le réseau mycélien, dans lequel les molécules, les organites et les signaux peuvent alors circuler plus efficacement. Si le phénomène d'anastomose est morphologiquement bien connu, les mécanismes moléculaires provoquant le rapprochement des hyphes sont peu décrits [4] [173].

Enfin, dans le cas d'autotropisme négatif, les hypothèses relatives à l'origine du phénomène mentionnent principalement un chimiotropisme lié à une abondance de CO_2 ou à une déplétion d' O_2 du fait du métabolisme d'une hyphe voisine [4] [22]. De plus, chez les espèces du genre *Aspergillus*, la sécrétion d'une molécule non identifiée dans la région subapicale semble jouer un rôle d'inhibition de croissance en direction du centre du mycélium. Cette substance promeut de ce fait l'orientation des hyphes vers les régions encore non explorées par le front de croissance [12]. L'autotropisme négatif est ainsi décrit comme un processus favorisant l'exploration de l'environnement par le mycélium, en limitant les redondances de présence.

4.5 Conclusion

Dans cette section, nous avons étudié l'organisation et la dynamique du mycélium de *P. anserina* en se focalisant sur l'hyphe, le constituant élémentaire du réseau fongique. L'analyse a porté sur trois aspects : i) les vitesses de croissance des apex individuels, ii) la répartition des nœuds de branchement le long de l'hyphe, et iii) les interactions entre les branches du mycélium. Les angles de branchement, qui constituent un paramètre déterminant de l'architecture du réseau, seront étudiés dans la section 5.2, p.151.

Les observations majeures issues de cette caractérisation sont rappelées ci-dessous :

- Les deux apex a_e et a_o issus d'un branchement apical croissent avec une vitesse similaire, dès lors que l'apex d'exploitation a_o a achevé sa phase initiale d'accélération. Les hyphes latérales présentent quant à elles une longue phase d'accélération et sont environ trois fois plus lentes, sur la durée d'observation accessible.
- La dominance apicale caractéristique des nœuds apicaux est à l'origine d'une répartition relativement régulière de ceux-ci le long de l'hyphe. Cette distance semble être un paramètre caractéristique du réseau de *P. anserina*, puisqu'une architecture similaire est observée dans des conditions de culture différentes (milieu pauvre). Les branches latérales émergent à une distance minimale de l'apex de l'hyphe mère, et naissent majoritairement par groupes, soit proches temporellement et spatialement.

- Lorsqu'un apex rencontre une hyphe, les anastomoses – non dissociables des arrêts de croissance lors du contact – sont rares. La configuration la plus fréquente est le chevauchement, un événement qui n'est pas neutre pour l'apex, ce dernier voyant parfois sa croissance interrompue ou ralentie suite au contact. L'autotropisme négatif semble être facilité par une hyphe incidente rapide et relativement parallèle à celle présente sur sa trajectoire initiale.

Ces analyses proposent ainsi des grandeurs quantitatives permettant de distinguer les branches apicales et latérales. La confrontation de plusieurs paramètres permet de confirmer de manière plus certaine la nature de l'apex. Les hyphes latérales sont très peu décrites dans la littérature, probablement du fait de leur activité moindre en comparaison avec les branches apicales. Pourtant, elles jouent un rôle essentiel dans l'architecture et l'efficacité du réseau fongique, par leur action de densification notamment [4] [73].

Le mycélium repose sur un mécanisme de branchement simple, mais qui est à l'origine d'une morphologie rapidement complexe et à croissance indéterminée [168] [120]. La compréhension de la dynamique et de l'organisation globale du thalle nécessite l'introduction de l'échelle de l'hyphe individuelle.

On notera néanmoins que les longueurs mesurées sur les hyphes étant rectilignes, celles-ci peuvent présenter un léger biais du fait de la courbure spontanée de l'hyphe. De plus, en complément de leurs valeurs avec l'unité de mesure, les longueurs ont été estimées par rapport au diamètre de l'hyphe, afin de les appréhender plus facilement dans un contexte de réseau filamenteux. Comme précisé dans la section 4.1.2, p.105, l'épaisseur des hyphes sur nos images correspond cependant à un diamètre apparent, du fait de la diffusion de la source lumineuse située sous l'échantillon. Ce phénomène est à l'origine d'ambiguïtés notamment lorsque deux hyphes se rapprochent sensiblement. Le diamètre réel, environ 50% plus petit, peut être observé en microscopie de fluorescence, et nous présenterons quelques analyses d'images de ce type dans la section 6, p.199.

En outre, certaines grandeurs sont évaluées dans cette section avec un nombre d'échantillons relativement faible, comme les vitesses de croissance des apex par exemple. L'estimation des valeurs pourrait être précisée en augmentant les effectifs. De même, l'étude de l'autotropisme négatif se révèle être un processus complexe, et l'angle et la vitesse d'approche ici étudiés ne semblent pas constituer les seuls paramètres régissant cette dynamique.

Chapitre 5

Simulation et confrontation avec l'expérience

5.1	Introduction	149
5.2	Angles de branchement	151
5.2.1	Introduction	151
5.2.2	Distributions des angles de branchement	152
5.2.3	Sens de rotation des branchements	175
5.2.4	Orientation des branchements par rapport à la courbure de l'hyphe	176
5.2.5	Discussion	178
5.3	Densité des apex	180
5.3.1	Introduction	180
5.3.2	Article	182

5.1 Introduction

Les champignons filamenteux sont des organismes capables de se développer dans des environnements et des supports très variés, dont notamment le sol et des tissus végétaux ou animaux. L'observation du mycélium dans son habitat naturel est ainsi rendue très délicate, d'autant plus que l'hyphe est une structure microscopique, et que le thalle peut se développer sur plusieurs mètres carrés [181] [182]. De ce fait, la majorité des observations sont menées en laboratoire, où les conditions de croissance sont très différentes de celles rencontrées dans l'habitat naturel du champignon, c'est-à-dire des milieux structurellement, temporellement et nutritionnellement hétérogènes [182] [183]. De plus, les expériences mises en œuvre pour observer le mycélium et en extraire des données peuvent être coûteuses, fastidieuses, et limitées spatialement [144].

Dans ce contexte, la modélisation mathématique des réseaux mycéliens se présente comme un outil précieux, complémentaire de l'approche expérimentale [182]. Les modèles cherchent à mimer la dynamique du mycélium de manière fiable, et sont généralement paramétrés à partir d'observations du thalle en dynamique. La simulation permet par ailleurs de prédire les comportements de croissance sous différentes conditions environnementales, dont certaines seraient difficiles à reproduire expérimentalement [184] [143]. La plupart des modèles sont

développés en deux dimensions (par exemple [143] [185] [186]), mais certains simulent la croissance d'un réseau en trois dimensions, plus proche de la configuration réelle du mycélium [182] [183] [187]. Enfin, la modélisation présente également l'avantage de ne pas être restreinte en termes de surface totale du mycélium, ou en nombre de répétitions, bien qu'en pratique, la durée de calcul impose certaines limites [183] [143].

Les modélisations mathématiques des réseaux fongiques peuvent être réparties en trois catégories principales : les modèles microscopiques, mésoscopiques et macroscopiques [183]. L'échelle microscopique se focalise sur l'extension d'un apex ([39] par exemple), alors que l'approche macroscopique s'intéresse à des variations globales de la biomasse et aux interactions du mycélium avec son environnement ([188] ou [189] par exemple). Cependant, les échelles microscopiques et macroscopiques ne permettent pas d'appréhender le mycélium en tant que structure interconnectée. Située à l'interface entre ces deux échelles, l'approche mésoscopique se focalise sur des thalles de quelques centimètres, et est ainsi adaptée à l'étude de la complexité du mycélium et de l'évolution de la biomasse [120] [183] [73].

Techniquement, les approches mésoscopiques sont réparties entre les modèles continus et les modèles discrets [182] [73].

- Dans le premier cas, le mycélium est considéré comme une variable continue et les hyphes ne sont pas individualisées. Le modèle permet de décrire des propriétés du mycélium à grande échelle, telles que la densité d'apex, la distribution de la biomasse ou la concentration du substrat. Ces simulations sont généralement calibrées à partir de mesures sur la biomasse mycélienne globale [143]. Les premières modélisations continues de mycélium ont été développées par Edelstein 1982, et ont été suivies par de nombreux travaux [190] [124] [30] [184] [144].
- Les modèles discrets considèrent le comportement des hyphes individuelles. Les trajectoires de celles-ci peuvent être contraintes selon un maillage (« lattice-based »). Le réseau simulé peut alors différer de l'aspect du mycélium réel, mais la durée de calcul est réduite du fait du nombre fini d'orientations possibles pour chaque apex (figure 5.1) [143] [183]. On peut par exemple citer les travaux Flores-Ortega *et al.* [185], Du *et al.* [143], Falconer *et al.* [120] et Boswell [182]. À l'inverse, pour les simulations « lattice-free », le mycélium est représenté par une collection de segments connectés dont la position est libre. Ces modèles présentent généralement un haut degré de fidélité par rapport à l'objet biologique, mais la complexité de la description peut être élevée (figure 5.1) [143]. Par exemple, Vidal-Diez de Ulzurrun *et al.* [183] ont développé un tel modèle en trois dimensions, prenant en compte les interactions entre le mycélium et son substrat. L'évolution des hyphes, mais aussi celle du substrat à l'intérieur et à l'extérieur des branches y sont étudiées. D'autres exemples de modèles qui ne sont pas basés sur un maillage ont été développés par Yang *et al.* [191], Meskkauskas *et al.* [192], Carver *et al.* [193] ou Hopkins *et al.* [194].

Notre travail d'analyse du mycélium de *P. anserina* à partir d'images a été mis en relation avec une approche de modélisation. Une simulation de la croissance du réseau branchant de

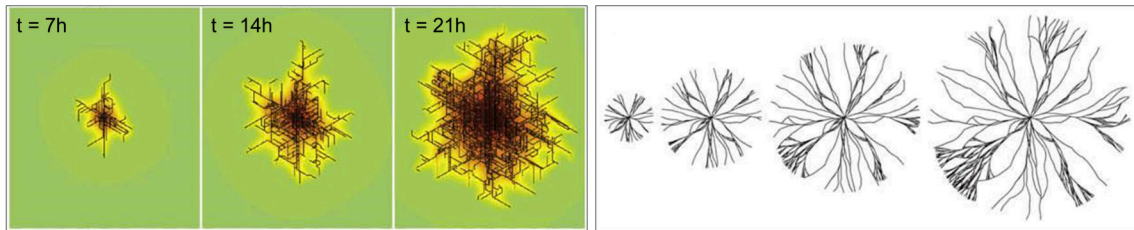


FIG. 5.1 – À gauche, simulation d'un réseau mycélien sur maillage (« lattice-based ») dans un environnement initialement homogène. Le pH du milieu est indiqué par le gradient de couleurs (pH 4 en rouge foncé, pH 7 en vert). À droite, modélisation « lattice-free » d'un mycélium à intervalles de temps réguliers (adapté de [195]).

P. anserina a été développée par Pascal David (physicien au laboratoire), et paramétrée à partir des observations expérimentales. Il s'agit d'un modèle discret basé sur un arbre binaire et non contraint par un maillage. La simplicité du modèle permet d'explorer rapidement des gammes de paramètres et de prédire le comportement du mycélium associé. Dans cette section, nous nous appuyerons sur les résultats issus de ce travail de modélisation pour déduire des prédictions sur des observables expérimentales. Le traitement et l'analyse des données issues des mesures expérimentales ont été réalisés avec l'aide de Christophe Lalanne (ingénieur de recherche au laboratoire). Des études portant sur les angles de branchement d'une part, et sur la densité des apex d'autre part seront menées, toutes deux présentées sous la forme d'un article, avec quelques résultats complémentaires.

5.2 Angles de branchement

5.2.1 Introduction

Le réseau fongique est un système complexe bâti sur deux processus : la production de paroi, permettant d'augmenter la longueur des hyphes, et le branchement, par lequel un nouvel apex est créé et une nouvelle région explorée. Pour ces modes de vie immobiles, il s'agit d'un moyen efficace d'exploration du milieu, où les ressources nutritives indispensables à la survie de l'organisme pourront être assimilées [168]. Comme pour tout système vivant, se pose alors la question de l'optimisation de l'organisation du réseau : si l'environnement doit être exploré en permanence, l'organisme cherche néanmoins à limiter ses dépenses énergétiques. Par ailleurs, la colonisation d'un milieu par les hyphes se doit d'être efficace afin de favoriser la prédominance spatiale du mycélium, confronté à de nombreuses espèces compétitives. Dans ce contexte, on peut supposer que le réseau mycélien est organisé de telle sorte que les processus à la fois d'exploration et d'exploitation de l'environnement sont optimisés. En d'autres termes, l'optimisation d'exploration implique une dynamique d'expansion maximale par rapport à l'origine du réseau, tandis que l'optimisation de l'exploitation requiert une densification maximale du mycélium. Ces deux processus étant contradictoires, on peut se demander s'il existe un

compromis d'optimisation prenant en compte les deux paramètres.

Dans cette partie, nous cherchons à étudier cette question d'optimisation de l'architecture du réseau en nous focalisant sur la distribution des angles de branchement formés entre les hyphes. On notera que le terme d'optimisation s'inscrit ici dans le contexte d'un réseau vivant, dont la problématique majeure est la survie de l'organisme et la reproduction. L'étude serait envisagée différemment dans le cadre de réseaux passifs, tels que les réseaux humains routiers ou électriques par exemple, pour lesquels les critères à optimiser peuvent être très éloignés de ceux des systèmes vivants. Les systèmes développés par les ingénieurs s'inscrivent dans un cadre où il est possible d'anticiper sur l'organisation spatiale, en prenant par exemple en compte la géographie du territoire, la localisation des besoins énergétiques et des ressources. Un système vivant tel que le réseau fongique de *P. anserina* se développe quant à lui sans possibilité d'anticipation sur son environnement [196]. Les paramètres optimisés au sein d'un tel réseau dépendent de mécanismes biologiques ancrés et de l'interaction directe avec l'environnement.

Ce travail s'appuie sur la modélisation du réseau branchant de *P. anserina* évoquée précédemment. La simulation, basée sur un arbre binaire et calibrée sur des observations expérimentales, fournit une représentation simplifiée du réseau fongique. L'intérêt de la simulation réside dans la liberté du choix des paramètres du réseau, dont notamment ici des angles de branchement, qui ne sont pas contraints par une valeur fixe. Des architectures mycéliennes très variables peuvent ainsi être générées, et pourront être comparées entre elles dans le cadre d'une problématique d'exploration et d'exploitation. Ces analyses seront ensuite mises en parallèle avec les distributions des angles observées expérimentalement.

Cette analyse est présentée ci-dessous avec quelques résultats complémentaires associés aux angles de branchement chez *P. anserina*. L'étude détaillée est disponible dans la section 5.2.2, p. 155, dans l'article « Prediction and experimental evidence of the optimisation of the angular branching process in the thallus growth of *Podospora anserina* » [149].

5.2.2 Distributions des angles de branchement

Étude de la simulation

Le réseau mycélien est modélisé sous la forme d'un arbre binaire. Chaque branchement occasionnant l'apparition d'une nouvelle hyphe, le nombre d'apex suit donc une croissance exponentielle en base 2. La longueur des nouveaux segments, la fréquence de branchement, et les angles de branchement suivent des lois aléatoires basées sur les observations expérimentales. Par la suite, nous ferons référence à ces variables aléatoires en exprimant simplement leurs moyennes. La croissance du réseau peut ainsi être simulée en modulant les combinaisons de ces paramètres. Le temps de la modélisation est ajusté sur le temps expérimental en s'appuyant sur la longueur du mycélium et le nombre d'apex.

Lors d'un branchement apical, une hyphe mère donne naissance à deux hyphes filles. L'intersection entre ces trois hyphes se situe au niveau d'un nœud. Nous avons défini les angles de branchement du mycélium par rapport à l'hyphe mère : celle-ci est prolongée au-delà du

nœud dans la direction de croissance, définissant ainsi un angle avec chacune des hyphes filles, comme indiqué sur la figure 5.2. Nous avons nommé hyphe *exploratoire* la branche fille suivant globalement la direction de l'hyphe mère et formant le plus petit angle, comme évoqué dans la section 4.2, p.105. L'angle associé est noté θ_e (« exploratory »). De même, le plus grand angle associé à l'hyphe d'*exploitation*, dont la direction dévie significativement de celle de l'hyphe mère, et sera noté θ_o (« operating »). La moyenne de chacun des angles de branchement θ_e et θ_o peut être fixée dans la gamme $[0, \pi]$. On notera que seuls les angles apicaux ont été ici étudiés ; les branches latérales ne sont pas considérées.

L'étude repose sur la problématique d'optimisation de l'organisation du mycélium, dont l'efficacité d'exploration et d'exploitation du milieu est essentielle à la survie de l'organisme, tout en limitant les dépenses énergétiques liées à la production de matière. Dans ce contexte, la simulation est un outil précieux permettant de rechercher les distributions angulaires optimales en terme d'exploration et d'exploitation de l'environnement. En effet, plusieurs simulations de réseaux obtenus avec des paramètres θ_e et θ_o différents peuvent facilement être comparées. L'élément de comparaison choisi ici est le nombre de chevauchements entre deux hyphes. L'augmentation de la densité des hyphes permet d'exploiter au maximum les nutriments disponibles à proximité, mais favorise les possibilités de chevauchement entre les hyphes. Or, au niveau d'un chevauchement, la quantité de nutriment disponible a été réduite par la présence de l'hyphe arrivée précédemment. De plus, le recouvrement entre deux hyphes représente une perte d'efficacité pour le réseau en termes de surface totale parcourue. On peut alors envisager un processus d'optimisation possible, qui consiste à maximiser la densité, tout en conservant les configurations de chevauchement les plus rares possible.

La confrontation de plusieurs simulations en modifiant les valeurs des angles de branchement indique que le nombre minimal de chevauchements entre les hyphes est obtenu pour : $\theta_e = 15 \pm 10^\circ$ et $\theta_o = 80 \pm 10^\circ$, mettant en évidence l'existence de deux populations d'angles distinctes.

Étude expérimentale

On cherche à présent à confronter les résultats obtenus grâce à la simulation avec les mesures expérimentales des angles de branchement issues des images du mycélium de *P. anserina*.

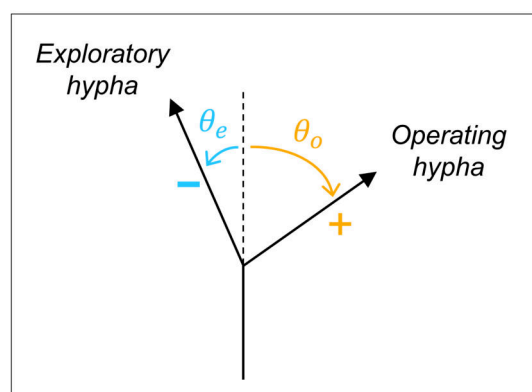


FIG. 5.2 – Au niveau d'un branchement apical, le prolongement de l'hyphe mère et l'hyphe exploratoire (« exploratory ») définissent l'angle θ_e . De même, l'hyphe d'exploitation (« operating ») définit l'angle θ_o .

Procédure de mesure des angles de branchement

Les angles de branchement apicaux θ_e et θ_o sont mesurés sur les images expérimentales à l'aide du logiciel ImageJ, pour lequel une macro spécifique a été développée. Le centre d'un cercle de rayon fixé R (environ $80\mu\text{m}$, soit 5 diamètres d'hyphe) est placé sur les nœuds de branchement par l'opérateur (figure 5.3). Les coordonnées du centre du cercle ainsi que les points d'intersection entre l'hyphe mère, les deux hyphes filles et le cercle sont relevées (cercles rouges sur la figure 5.3). Les valeurs de θ_e et θ_o peuvent ensuite être déduites. L'angle θ_o orienté depuis l'hyphe mère vers l'hyphe d'exploitation indique le sens positif pour chaque branchement. L'accès à la dynamique de croissance permet à l'opérateur de discerner sans ambiguïté les points de branchement ainsi que la direction de croissance des hyphes. Du fait de leur nombre important, les nœuds ne sont pas étudiés de manière exhaustive, mais sont sélectionnés de façon homogène sur le mycélium.

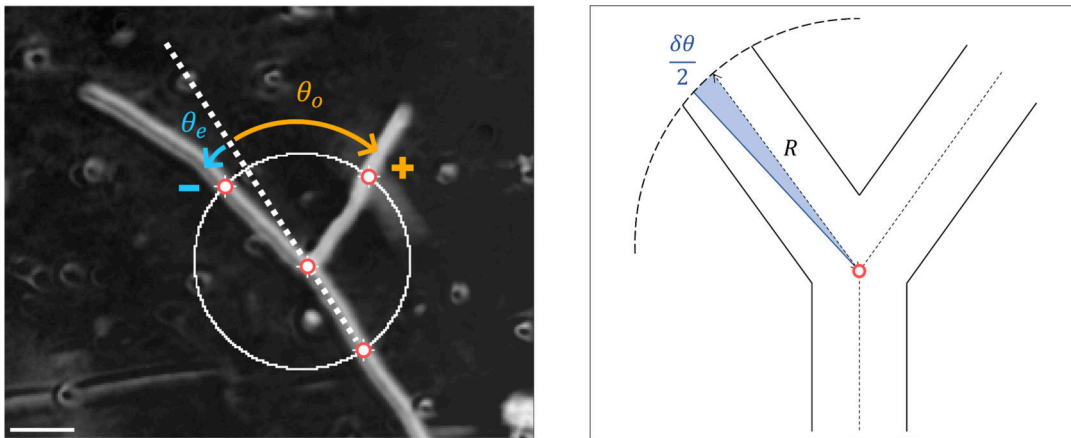


FIG. 5.3 – À gauche, les angles θ_e (bleu) et θ_o (orange) au niveau d'un branchement apical sont mis en évidence sur une image expérimentale. Le prolongement de l'hyphe mère est représenté par la ligne blanche en pointillé. L'angle orienté depuis celle-ci vers l'hyphe d'exploitation définit le sens positif. Les coordonnées des cercles rouges sont relevées pour calculer les valeurs des angles. Barre d'échelle : $50\mu\text{m}$. À droite, schéma représentant la méthode d'estimation de l'incertitude $\delta\theta$. La courbe en pointillé représente une portion du cercle, et le cercle rouge son centre. Voir le texte pour les détails.

L'incertitude de mesure $\Delta\theta$ sur les valeurs des angles est évaluée selon la représentation sur la figure 5.3. On considère h le diamètre de l'hyphe, R le rayon du cercle (avec $R \approx 5h$), et $\delta\theta$ l'incertitude associée à un côté de l'angle. On estime que le point d'intersection entre le cercle et l'hyphe peut être placé avec une précision de $e = h/4$. Ainsi, il s'ensuit que : $\tan\left(\frac{\delta\theta}{2}\right) = \frac{e}{R}$. Donc l'incertitude totale sur la valeur de l'angle est : $\Delta\theta = \sqrt{2} \frac{\delta\theta}{2} \approx 4^\circ$.

Distributions angulaires (conditions de croissance standards)

Les relevés sont effectués dans un premier temps sur des images du mycélium en conditions de culture standards. Les effectifs sont de 66 branchements pour trois réplicats, respectivement. Les distributions angulaires associées aux branchements apicaux sont représentées sur la figure 5.4 pour les trois expériences. Les populations θ_e et θ_o sont clairement dissociées sur les histogrammes, et les distributions présentent une allure gaussienne, dont on extrait la moyenne

et l'écart-type associés à chacune. Les résultats pour les trois expériences sont ensuite moyennés pour obtenir $\hat{\theta}_e = -9 \pm 5^\circ$ (écart-type $\hat{\sigma}_e = 9 \pm 5^\circ$) et $\hat{\theta}_o = 71 \pm 5^\circ$ ($\hat{\sigma}_o = 12 \pm 5^\circ$).

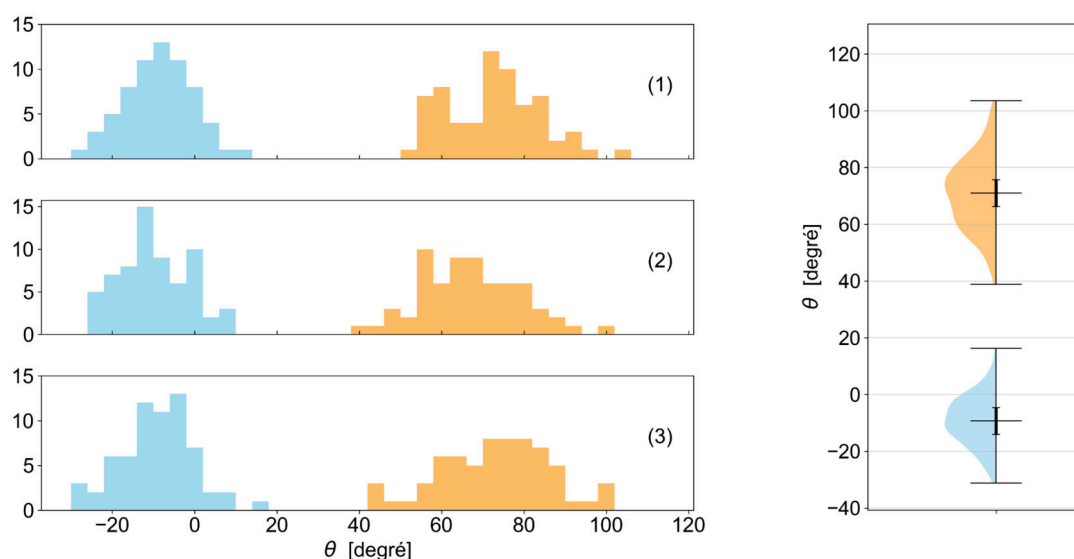


FIG. 5.4 – À gauche, distributions des angles θ_e (bleu) et θ_o (orange) pour trois répliquats (1), (2) et (3). Les moyennes de θ_e sont -9° , -10° , -9° respectivement. Les moyennes de θ_o sont 73° , 67° , 73° respectivement. L'incertitude sur ces valeurs est d'environ de 5° . ($N = 66$ pour chaque répliquat). À droite, densités de probabilité estimées pour θ_e et θ_o , pour des branchements apicaux. La moyenne et l'incertitude associée, ainsi que les valeurs minimales et maximales, sont indiquées en noir (voir le texte pour les valeurs).

Les valeurs de θ_e et θ_o obtenues expérimentalement pour les branchements apicaux sont clairement différentes, et sont compatibles avec les valeurs minimisant le nombre de chevauchements, extraites grâce à la simulation ($\theta_e = 15 \pm 10^\circ$ et $\theta_o = 80 \pm 10^\circ$).

Par ailleurs, nous avons employé une deuxième méthode de mesure expérimentale par le biais d'une approche géomatique, venant renforcer l'analyse. Les résultats obtenus sont compatibles en considérant trois écarts-types avec les valeurs issues de la première méthode expérimentale et celles de la modélisation ($\theta_e = 43 \pm 6^\circ$ et $\theta_o = 75 \pm 5^\circ$).

Ainsi, la prédiction sur les distributions des couples d'angles considérant l'hypothèse d'optimisation proposée est en accord avec les résultats expérimentaux. La distribution des angles de branchement met en évidence d'une part l'existence d'un petit angle θ_e , donnant naissance à une hyphe exploratoire, qui croît en direction des régions non colonisées. D'autre part, le grand angle θ_o génère une hyphe exploratoire qui occupe des régions disponibles davantage à l'intérieur du thalle.

Article

Les travaux présentés ci-dessus sont détaillés dans l'article « Prediction and experimental evidence of the optimisation of the angular branching process in the thallus growth of *Podospora anserina* », publié dans Scientific Reports le 19 juillet 2022. Les auteurs de cet article sont : Clara Ledoux, Florence Chapeland-Leclerc, Gwenaël Ruprich-Robert, Cécilia Bobée, Christophe Lalanne, Éric Herbert et Pascal David.



OPEN

Prediction and experimental evidence of the optimisation of the angular branching process in the thallus growth of *Podospora anserina*

Clara Ledoux, Florence Chapeland-Leclerc, Gwenaël Ruprich-Robert, Cécilia Bobée, Christophe Lalanne, Éric Herbert[✉] & Pascal David

Based upon apical growth and hyphal branching, the two main processes that drive the growth pattern of a fungal network, we propose here a two-dimensions simulation based on a binary-tree modelling allowing us to extract the main characteristics of a generic thallus growth. In particular, we showed that, in a homogeneous environment, the fungal growth can be optimized for exploration and exploitation of its surroundings with a specific angular distribution of apical branching. Two complementary methods of extracting angle values have been used to confront the result of the simulation with experimental data obtained from the thallus growth of the saprophytic filamentous fungus *Podospora anserina*. Finally, we propose here a validated model that, while being computationally low-cost, is powerful enough to test quickly multiple conditions and constraints. It will allow in future works to deepen the characterization of the growth dynamic of fungal network, in addition to laboratory experiments, that could be sometimes expensive, tedious or of limited scope.

Filamentous fungi are characterized by their ability to form an interconnected hyphal network, the mycelium, based upon some key cellular processes, i.e. hyphal tip (or apex) growth, branching and hyphal fusion (also known as anastomosis), thus conferring a great flexible morphology and a remarkable capacity of adaptation to very diverse ecosystems¹. In particular, saprophytic fungi, known as short-range foragers, evolve in a highly competitive habitat and thus appear to be highly challenged by resource-limited and patchy environment, combined to a fierce competition with other organisms². Then, these fungi must adapt their growth and have always to find a compromise between the need to occupy the space potentially threatened by other organisms (colonization) and the need to optimally draw resources from where the thallus has developed (densification). Previous studies have reported that hyphal tips at the biomass edge could be associated with exploration while hyphal tips behind the biomass front could be most associated with resource exploitation³. In the same way, Lew⁴ described the apical cells (or leading hyphae) from the fungal network as the first cells to invade new territory and are generally engaged in nutrient acquisition and sensing of the local environment. However, until now, the way a fungus optimizes its growth through an efficient compromise between the maximization of the surface occupancy and the increasing production of length is still unclear.

For many years—a review can be found in⁵—mathematical modelling and measurement of specific quantitative parameters through the use of image analysis have greatly contributed to a better understanding of fungal network expansion and topology. Usually, these approaches attempt to explore the fungal development in two or three dimensions, in order to define some specific macroscopic and microscopic observable and to describe, explain and predict development of the fungal network in various more or less constraining environments. It was shown in³ that, in the saprophytic fungus *Rhizoctonia solani*, translocation (nutrient transport) was mainly diffusive in homogeneous environment, when growth experiments were compared to a detailed mathematical model; in the latter case, translocation was considered to have both diffusive and metabolically-driven components. Falconer et al.⁶ demonstrated that fungal phenotype could be modelled as an emergent phenomenon resulting from the interplay between local processes involved in nutrient uptake and remobilization of internal resources, and macroscopic processes associated with their transport. In order to enlarge the spatio-temporal

CNRS, UMR 8236-LIED, Université Paris Cité, 75013 Paris, France. ✉email: eric.herbert@u-paris.fr

scale of the hyphal growth of the brown rot fungi *Postia placenta*^{7,8}, proposed a lattice-based system derived from the biological mechanisms of hyphal development and then a three variables Partial Differential Equation model for predicting fungal growth derived from microscopic mechanisms. As highlighted in⁹, lattice-based modelling allows for the inclusion of fundamental biological processes of the thallus growth, as anastomosis, branching or translocation while maintaining a decent computation duration. However, even if the regular imposed geometry can be of different form, it is expected to impact the global thallus geometry and consequently its functionality, i.e. the compartment and interaction (effects) with the environment. It is then desirable to develop a lattice-free approach, in which the thallus is described as a collection of line segments. The lack of constraint on the hyphal growth orientation dramatically increases the computational complexity and can be cumbersome to implement. These lead to ignore crucial processes like anastomosis (see for example¹⁰). More recently, using high computational resources, Vidal-Diez de Ulzurrun et al.¹¹ described a three-dimensional lattice-free fungal growth model that is able to simulate both the biological processes driving fungal growth and the hyphal response to environmental stimuli, and that can be compared to growth features obtained in vitro.

Recently, we have developed an automated and reproducible experimental device to track the hyphal network construction of the filamentous saprophytic fungus *Podospora anserina* constrained to grow on the planar surface of a Petri dish, in a standard environment of in vitro growth¹². Such a system allowed us to monitor time series of images of the fungal thallus. The acquisition step was followed by a robust image analysis process, leading to the extraction of a set of reproducible quantitative parameters, as the total length of the mycelium, the number of nodes or vertices (i.e. hyphal fusion and branching points), and the number of apices. Such a systematic spatial and temporal exploration enabled us to estimate a set of key physiological features of the fungal network, such as the branching dynamics and more generally the spatio-temporal patterns of the network.

This biological system is obviously far from the in vivo growth of a saprophytic fungus such as *P. anserina*. However, it constitutes an excellent starting point to describe the thallus growth using mathematical concepts and languages. Indeed, the objective of our mathematical modelling is to reduce a complex biological system to a simpler model, which is able to partly reproduce, or even better predict, the real system. A recurrent question is then to find the optimal degree of simplification for such a model, which should be neither too simple to avoid straying from realistic predictions, nor too complex to solve using numerical methods⁷. We report in this work a two-dimension lattice-free model that aims to capture the main characteristics of the thallus growth. This model relies on a binary tree growth with short computation time, and it allows for testing multiple hypotheses and configurations quickly. As it is commonly accepted that the growth pattern of mycelium results from two main processes, apical growth and branching¹, we focused on these two parameters to simulate the fungal growth. We propose to deepen the characterization of the growth dynamic of the *P. anserina* fungal network through the construction of a growth model for this fungus and then to confront these simulation approaches with angle measurements. Two complementary methods for extracting angle values have been used. The first one consists in direct empirical measurements of angles from apical branching based on a selected collection of nodes. The second one relies on a Geographic Information System (GIS) approach in which all nodes are considered (apical and lateral branching). Our results allow us to compare the distribution of apical angular values with the two competing but vital processes of densification and extension, on a standard culture medium, assumed to be homogeneous and optimal for the fungal growth. We can thus show that far from being random, they correspond on average to an optimal configuration. Beyond this work, the final model presented here could be a powerful tool in future studies for predicting the mycelial growth over a larger spatial scale and under various and more fine-grained conditions or constraints than most in vitro experiments could afford.

Results

Simulation. Network topology. There are different types of complex networks allowing for the characterization of branching network^{13,14}: (1) *Random networks* for which the connections between the nodes are random and are free from the physical distance that separates them; (2) *Totally interconnected networks* which allow all the nodes to be linked together; (3) *Freescale networks* which are characterized by a number of connections between nodes which follows a power law (i.e. many nodes which have few connections but some nodes which have many); (4) *Smallworld* type networks which are characterized by strongly interconnected subnets, which are themselves connected to each other via a few privileged links. It is also necessary to distinguish between highly centralized networks, which assume privileged nodes in order to transmit information from one node to another (the geodesic in terms of information transmission is then not optimal), and networks without privileged centers that allow an optimal transmission of information. A third important aspect is the existence of networks that do not have spatial dimensions (internet for example) and others whose spatial dimension is critical in the sense that the probability of connection between two spatially distant nodes is zero. Finally, we must distinguish between static networks (in the sense of the number of nodes and not of the activity that takes place there) and dynamic networks which are capable of complicating and increasing their number of nodes and links as a function of time.

The study of *P. anserina* in¹² allowed to identify the core characteristics the simulation should be based on. *P. anserina* thallus is a spatialized and dynamic network (Fig. 1). Accordingly, the probability of connecting spatially distant nodes (or vertex) is zero. However, if the thallus of *P. anserina* seems to be a centralized network in its first phase of growth, the branching process dramatically and quickly increases the network complexity, meaning that the number of possible paths between the different regions of the thallus become very high. The centrality of the network is then lost, since the information can be exchanged without going through a center. Moreover, a partial destruction of the initial center (the ascospore location) does not affect the ongoing development of the network¹. The observation of *P. anserina* network shows nodes (or vertices) which are generally connected to

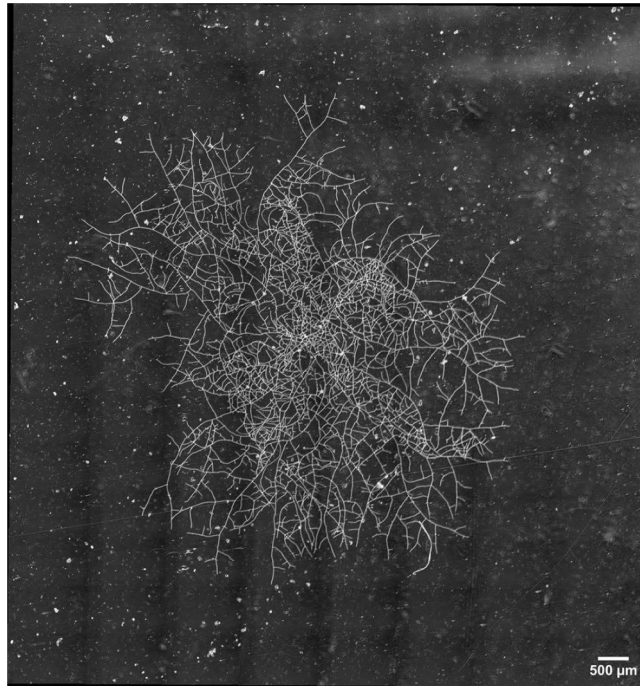


Figure 1. Thallus of *P. anserina* reconstructed from 8×14 tiles, extracted from experiment¹² 15 h past the ascospore germination (see the text and Table 2 for more details).

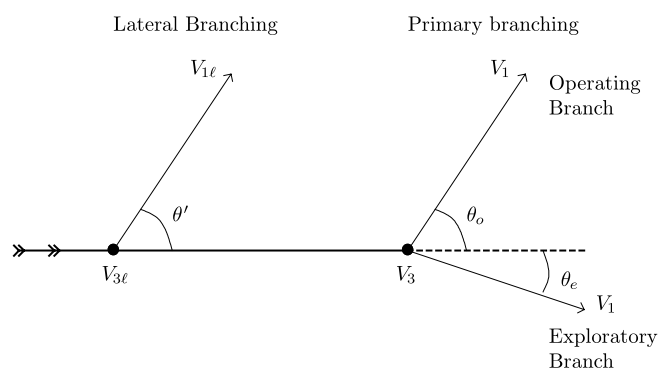


Figure 2. Definitions used in this work. The thick line is the mother hypha, while the thin lines are the daughter hyphae. We consider two types of three degrees vertices. $V_{3\ell}$ are lateral branchings, connected with the angle θ' . V_3 are apical branchings on which two branches are connected: an operating and an exploratory branch with respective angles θ_o and θ_e . V_1 (resp. $V_{1\ell}$) are one degree vertices (i.e. apices) coming from V_3 (resp. $V_{3\ell}$).

three other nodes that can be distinguished by their chronological growth : there are indeed one earliest node, or *mother node*, and two *daughter nodes*. An illustration can be found in Fig. 2.

Podospora anserina network can be distinguished from the four major types of networks previously mentioned. If this network was not a dynamic network as it was defined above, at a given point in time, *P. anserina* network could be locally related to a *hierarchical and modular tree* where modularity (existence of a basic architecture) is important, the heterogeneity (variance of the distribution of the number of links) is around zero and whose randomness (probability of creating links between the nodes) would be very low¹⁵. It is therefore possible to model the growth of *P. anserina* as different networks linked together by causal relationships and spatial constraints.

To implement this simulation we made the following assumptions: (1) the environment is supposed to be homogeneous (in terms of resources, light, and other exogenous constraints ...) and invariant over time; (2) the growth conditions are standard (temperature, pressure, etc.) and invariant over time; (3) there is no limits of deployment in space and time; (4) the initial state is defined as the germination of a single ascospore. These assumptions are not restrictive. Except for hypothesis (3) they correspond to the experimental conditions.

Basically, a simulation can be viewed as a two-step process. First is the *generation step*. It corresponds to the theoretical growth of the network (i.e. the theoretical law). This step is built from assumptions on probability laws

and their parameters. Second is the *detection step*. It corresponds to the observation of this growth. This step is also built on probability laws but only relating to the observation process. It must reproduce as well as possible the entire experimental process. Details can be found in section of *Observations* of “Methods”.

This two-step process is justified by the fact that we never observe or measure what is “true” but only its convolution by the whole observation chain which can possibly generate biases, and necessarily has some resolution.

Finally this simulation allows us to propose a prediction on the distribution of apical branching angles.

Generation. The aforementioned considerations on the kind of network generated by *P. anserina* lead to choose a growth model in the form of a *full binary tree* (or *proper binary tree*)¹⁶. In this model, each branch (hypha) is driven by its tip (apex) that in turn is allowed to divide into a pair of sub-branches. This process is called *apical branching* in this paper, in line with the dynamic growth vocabulary. When apical branching occurs, the distribution of branch lengths and that of the angles between newly created branches with respect to the mother branch follow differentiated probability laws. An apical branching process is characterized by the emergence of a three bodies vertex, denoted V_3 , which is the point of intersection of the 3 branches and two one body vertex, denoted V_1 , the apexes of the branches (Fig. 2). Of course, for the duration of binary tree growth, both number of V_3 , N_{V_3} , and of V_1 , N_{V_1} , depend on the instant of observation and are related by $N_{V_3} = N_{V_1} - (N_{ger} - 1)$ where N_{ger} is the initial number of branches emerging from the ascospore, or $N_{V_3}(t) \approx N_{V_1}(t)$ if $N_{V_3}(t)$ is large enough (or equivalently that the duration of growth is large enough). In the following, we will assume this condition is always verified.

The length of the branches is a random variable assumed to be correctly described using a Gamma law which is a continuous and positively skewed distribution. Moreover, other laws of probability can be obtained by changing parameters of the Gamma law:

$$G(x|k, \theta) = \frac{x^{k-1} e^{-\frac{x}{\theta}}}{\Gamma(k) \theta^k} \quad (1)$$

with x the length, k the scale factor, θ the shape factor, and $\Gamma(k)$ the Euler function. Using a particular choice of parameter values for k and θ , the Gamma law allows to fall back to (1) the exponential law ($k = 1$ and $\theta = 1/\lambda$), (2) the Maxwell-Boltzmann's law ($k = 3/2$ and $\theta = 2a^2$), (3) the χ^2 law ($k = \nu/2$ and $\theta = 2$ with ν the number of degrees of freedom, d.o.f.). Consequently, the Gamma law offers a lot of freedom to generate the length of the branches.

We considered a Gaussian probability law for the angles: $N(x|x_0, \sigma)$ with x the angle, x_0 the mean and σ^2 the variance. Because it was empirically observed that apical branching leads to two different angles, the parameter relating to the mean, x_0 , is different for the two branches coming from a V_3 . The variances for the angles are chosen according to experimental data. The position of the branches in relation to the direction of the mother branch—to the right or to the left—is managed by a probability (i.e. Bernoulli law). So, it is impossible to force a particular direction for one or both forms in order to break the chiral invariance of the growth.

We call *operating branch* the branch coming from a vertex V_3 which has the most important angle (the angle is noted θ_o) with respect to the segment that connects the vertex to the vertex from which it came (mother vertex) and we call *exploratory branch* the branch with the smallest angle (the angle is noted θ_e) (see Fig. 2). This nomenclature is justified by the fact that the two branches do not have the same scope in terms of network growth: the branch showing the smallest angle tends to perpetuate the direction of the mother branch in order to explore the environment and then to capture new resources, while the other branch occupies space inside the network in order to optimally draw resources from the neighborhood.

Experimental observations show another type of branching process giving rise to another type of three bodies vertices: interior vertex leading to the creation of lateral branch. A branching occurring on a segment bounded by two pre-existing V_3 vertices, or a V_3 and a V_1 vertices can give a new lateral branch at a later moment during the growth process. To distinguish between these branches we call them *lateral (operating) branch* and the three bodies and one body vertices attached to them are denoted respectively $V_{3\ell}$ and $V_{1\ell}$ (see Fig. 2).

The creation of a *lateral branch* is also driven by a probability law. This law is unknown (as well as its parameters) leading to an important difficulty in implementing the phenomenon. However, we choose a power law based on two considerations: (1) the duration that separates the observation from the creation of the two vertices bounding the possible lateral branch (2) the length between the pre-existing vertices. In this case, the probability of generating a lateral branch as a function of the length and time parameters could be written:

$$p = p_0 \left(\frac{x}{x_0} \right)^\alpha \quad (2)$$

where x is the length of the branch (i.e. the length between the two vertices), x_0 a length parameter ($x_0 \geq x$) (i.e. the greatest length generated by the probability law, typically the mean, $k\theta$, plus three times the standard deviation, $\sqrt{k\theta}$), α a parameter of the power law, typically $\alpha \sim 2$ and p_0 a scale parameter in the range $[0, 1]$ to set the probability, typically $p_0 \sim 1/2$. The duration between the observation and the creation of the two vertices is not apparent in Eq. (2) because this probability is recomputed after each generation of newly generated branches (of hypothetical duration).

The location of the lateral vertices $V_{3\ell}$ between two vertices follows a uniform law. However we implement a censorship zone near the vertices so that the uniform distribution does not have the vertex-vertex distance as a support. Empirically, we see that the angular distribution between the segment connecting the two vertices and the *lateral operating branch* is about the same as the angular distribution of the *operating branch*. Therefore we choose the same law with the same parameters. Likewise, the length of the branches thus created follows the

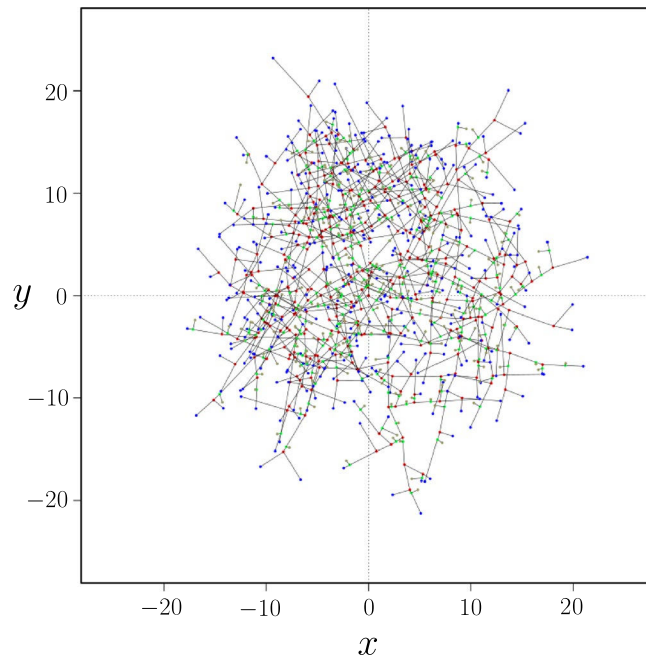


Figure 3. Final state (after nine generations) of simulated network for a set of standard parameters. Apical branching led to $N_{V_1} = 384$ apices (shown in blue) and $N_{V_3} = 383$ vertices (in red). Lateral branching led to $N_{V_3\ell} = 295$ vertices (in green) and $N_{V_1\ell} = 295$ apices (in grey). The spatial dimension in the representation is arbitrary.

same probability law as that of the *exploratory branches* and *operating branches* (with different parameters). The position of the *lateral branch* in relation to the direction of the mother branch—to the right or to the left—seems to be in the direction of the curvature of the hyphae. Also, the chirality for these branches can be broken by a probability parameter. The control of these laws and their parameters is a challenge which is raised by the study of the calibration of simulation to the data (see the paragraph *Calibrations...* in “[Methods](#)”).

The curvature between any two vertices is not taken into account in the present work for the following reasons: (1) the curvature can not be related to anything particular during the growth process (to a first approximation); (2) the chiral symmetry can be broken from the angular distributions if one wishes to obtain a global curvature effect. In this sense, the chirality breaking of the *lateral branches* takes into account the curvature of the segments between the points formed by the triplet, grandmother, mother and daughter—two adjacent segments; (3) from the experimental data it can be seen (not shown) that mean curvature (i.e. the curvature over the different fractions of the length between two vertices) is locally zero.

Because the experimental process introduces a time dependency through the reconstruction of network images and because we want to study the growth dynamics of the network, we define a time between vertex generations. At this step the time is given by number in generation agency between daughter-vertices and mother-vertex. For the *lateral branches* the time is given by the relative moment—in terms of generation—at the creation of the branch. However, this theoretical time will be scaled by the data (see calibration section) and we will take into account a possible growth interruption during apical branching process as well as differentiated apex velocities of *exploratory*, *operating* and *lateral* branches. For the simulation step, however, these velocities are given by a Gaussian probability law with average values and a small shape (standard deviation) and we assume these velocities are constant during growth.

To sum up, the generation time found is certainly not the growth time of the fungus. However, this time is necessarily proportional to the growth “true” time. The constant of proportionality must be obtained from calibration on the data.

Simulation can start with as many branches as desired. We make this number coincides with the empirical observation of the ascospore germination that shows three initial branches with an angular separation of approximately $2\pi/3$. We then apply the growth as a binary tree for each of three branches as described below. Figure 3 gives an example of the final state of growth.

In order to make the results of the numerical simulation comparable to the experimental observations, we introduced to the simulation output the same bias and uncertainties. Details of the procedure are given in the paragraph *Observation...* of “[Methods](#)” section. Parameters of the simulation are then tuned to reproduce the main experimental observations, for both time scale and space scale. In time, the typical growth dynamics of the apex number and the total length growth 2^{at} is regained, including the respective rate exponents, as can be seen in Fig. 8. In space, the inertia tensor of the V_{3ob} vertex distribution were extracted. The eigenvalues of the diagonalization of this tensor allowed us to compare the global geometry of the numerical thallus to the experimental

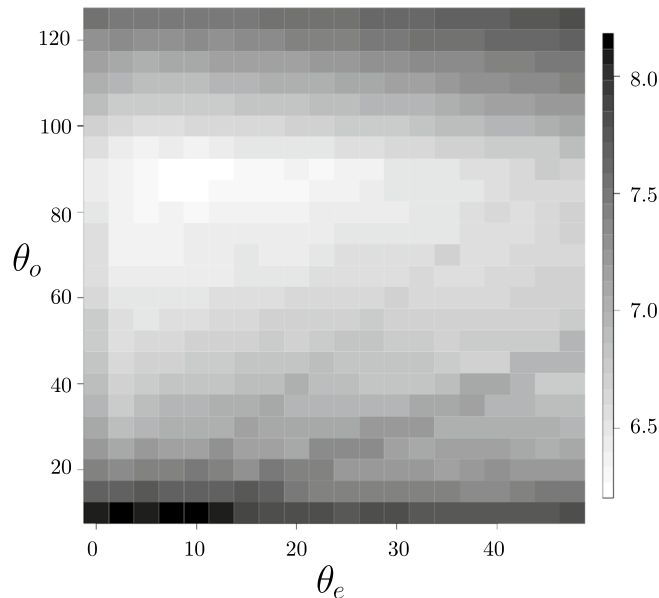


Figure 4. Logarithmic distribution (z -direction) of the number of times the branches intersects each other in the network as a function of branch angles θ_o (y -direction) and θ_e (x -direction) in degree for a fixed time and length.

one, including sphericity (shape) and spreading (size). A detailed procedure of the complete calibration process is shown in the part *Calibration...* of “Methods” section.

Prediction of angle distribution. As noted above, when a V_1 vertex is converted into a V_3 vertex (an apical branching) the two “daughter” branches have very distinct angles. We can then make the hypothesis that the permanence of this behaviour is related to very deep reasons. There are undoubtedly biological reasons, but we can hypothesize that the source of this phenomenon is due to the fact that the fungus in a homogeneous environment has a clear advantage in occupying the largest surface in order to capture the maximum of resources from the environment and thus optimizes its growth. The surface occupied by the fungus can be written:

$$S_{occ}(t, L, \theta_e, \theta_o) = S_{bio}(t, L) - N_{V_{3i}}(t, L, \theta_o, \theta_e) \Delta S(t, \theta_o, \theta_e) \quad (3)$$

with L the total length of the network, S_{bio} the physical surface, or total area, of the fungus and ΔS the surface of the intersections overlap (because the branches are flat tubes with constant width).

For given growth duration and total length of the network, the surface occupied by the thallus is all the more important as the overlapping surface is reduced, i.e. the number of intersections is small. It is possible thanks to the simulation to test this hypothesis in order (1) to verify that indeed the largest occupied surface requires two quite distinct angles, and (2) to predict the optimal couple of angles. Figure 4 shows the logarithm of $N_{V_{3i}}(t, L, \theta_o, \theta_e) \Delta S(t, \theta_o, \theta_e)$ as a function of θ_o and θ_e for a fixed time (i.e. generation index). Building upon the previous assumptions, we can make the following predictions, the wide angle is close to 80° and the small angle is close to 15° . The uncertainties on these angles are estimated to be about 10° because of the toy model used here (the fixed length of the branches at a fixed time about nine generations).

Experimental approach. *Podospora anserina* is a coprophilous filamentous ascomycete, a large group of saprotrophic fungi that mostly grows on herbivorous animal dungs and plays an essential role within this complex biotope in decomposing and recycling nutrients from animal feces¹⁷. *P. anserina* has long been used as an efficient laboratory model to study various biological phenomena, especially because it rapidly grows at a rate of 7 mm/day on standard medium, it accomplishes its complete life cycle in only one week, leading to the production of ascospores, and it is easily usable in molecular genetics, cellular biology and cytology¹⁸.

Experimental set-up. An experimental device allowing to solve the dynamics of the local and global growth of the complete hyphal network of *P. anserina* directly on a Petri dish from an ascospore and over a period of ~ 15 h in a controlled environment has been previously developed and described¹². We did use of this setup to carry out three complete and independent series of images of the thallus growth, named (1), (2) and (3) thereafter, under standard growth conditions with M2 culture medium, see¹⁹ for more details, at a temperature of 27°C .

Direct measurement of angles. After the standard binarisation and vectorization process described in¹² we extracted angles θ_o and θ_e formed by an apical branching (see Figs. 2, 5) using direct reading on the network picture. At this stage, the thallus network is in its exponential growth phase, with approximately 1500 apices and a length of 600 mm (see “Methods” for details, and more specifically Fig. 10; Table 2). We focused our analysis on

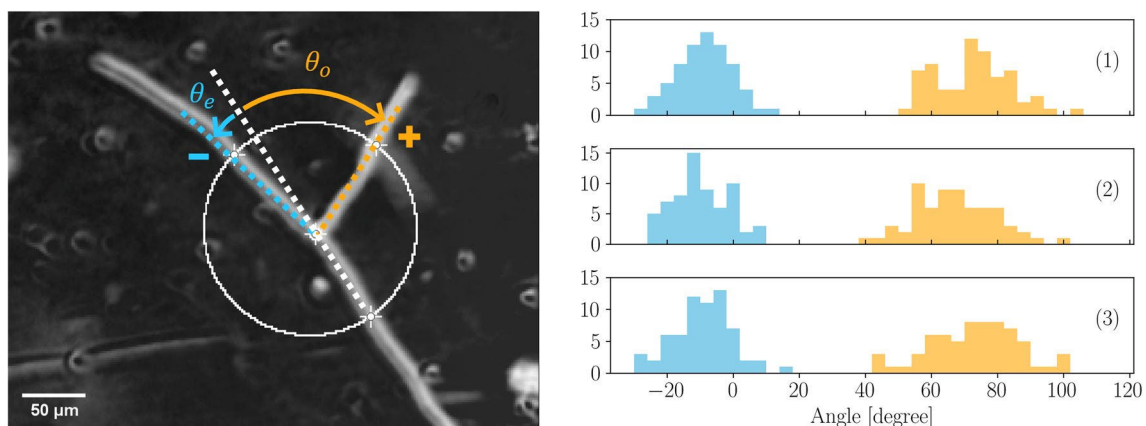


Figure 5. (Left) Typical branching process. A first hypha grows from the bottom right of the image. The branching reveals two new hyphae. A circle of radius $R = 80 \mu\text{m} \sim 5$ hyphal diameters and located on the branching point is drawn. Small angles θ_e and wide angles θ_o are defined by the intersections of this circle with the new hyphae and the projection of the first (mother) hypha. Following the convention proposed into the text, $\theta_o > 0$ and in this example $\theta_e < 0$. (Right) (1), (2) and (3) are representations (pdf) of the populations of 66 measurements of the small angle θ_e (in blue) and the wide angle θ_o (in orange), defined in regard to the extension of the mother hypha, see the image on the left for details. Bin width is 4° in this representation. Gaussian fit lead to respective means for small angle -8.5 ± 4.2 , -10.2 ± 4.2 and -9.2 ± 4.2 , and for wide angle 72.6 ± 4.1 , 67.1 ± 4.3 and 73.2 ± 4.2 .

apical branching. By observing the dynamic branching process real V_3 vertices can be segregated from the geometric vertices V_3 ; due to overlapping intersections. The comparison between images acquired before and after the branching allows the operator to extract a real V_3 vertices collection without any ambiguity. The procedure of angles extraction is shown in Fig. 5. A circle with a radius of 50 pixels (approximately five hyphal diameters) is centered on each V_3 vertex. The coordinates of the points of intersection between the circle and the three hyphae are manually recorded. For each apical branching, the extension of the mother hypha in the direction of growth determines two angles with both emergent hyphae, a small angle and a wide angle. From the complete network, 66 V_3 were extracted from each experiment. We then considered two populations, respectively composed of the collection of the small angles θ_e and of the wide angles θ_o (Fig. 5). The uncertainties on each angle value $\delta\theta = 4^\circ$ is estimated from the diameter of the hyphae.

Figure 5 depicts the distributions of the measurements of θ_e and θ_o . Bin width reflects the uncertainties $\delta\theta$. For the clarity of the representation, θ_o defines the positive direction of rotation for each V_3 . For each extraction two populations are clearly visible. Assuming these populations follow Gaussian laws we extracted the respective estimators of the mean $\hat{\theta}$ and width $\hat{\sigma}$ such as $N(\theta_i|\theta, \sigma)$ using likelihood maximisation. The uncertainties on angle measurements is assumed to follow a centered Gaussian law with a standard deviation of $\delta\theta$, such as $N(\theta_i|0, \delta\theta)$. Building on the very tiny correlation between the estimators, we assumed $\text{cov}(\hat{\theta}, \hat{\sigma}) = 0$ for the covariance matrices of the respective estimators. We finally compute an average estimate from this collection of i.i.d sets for each of the two angles, $|\hat{\theta}_o| = 70.9 \pm 2.4$ and $\hat{\sigma}_o = 12.0 \pm 2.4$, $|\hat{\theta}_e| = 9.3 \pm 2.4$, $\hat{\sigma}_e = 8.7 \pm 2.4$.

Since we must take into account the systematic uncertainties $\delta\theta = 4^\circ$, the final results for the angles are: $\hat{\theta}_o = 71 \pm 5$ $\hat{\theta}_e = 10 \pm 5$.

GIS automatic method for automatic angle measurements. In addition to the work on direct measurement angles, which focuses on a set of selected apical branching, we have implemented a Geographic Information System (GIS) automatic method for detecting, in a well-developed thallus, all angles for both apical and lateral branching. While being a non-selective method, it nevertheless offers a global information of branching process, with a high number of angle measurements. GIS geoprocessing was performed from the skeletonized thallus. Details of the skeletonization process can be found in “Methods” section.

The angles were calculated using the following procedure: discs (or buffers) of 5-pixel radius were centered on apices (V_1) and nodes V_{3ob} . All buffers are then splitted by the thallus skeleton. We tested many radius lengths in order to improve the method and we finally settled upon a smaller size radius than those defined for the direct measurement method (different by a factor of 10) due to the high density of line segments (i.e. the thallus) in certain portions of the image. Indeed, the latter would have generated additional splits of buffers by non directly connected line segments, which inevitably would have induced a bias in the measurements of disc areas and therefore of angles. The portions of discs are then converted into their equivalent angular counterparts. The results we obtained are not significantly different from one method to another. Details of this geoprocessing is shown in Fig. 6. A total of 1186 vertices have been detected, with 372 V_{1ob} and 814 V_{3ob} , respectively shown by red and black points in Fig. 6, leading to about 3000 angles.

Four populations of angles can be distinguished in Fig. 6. The peak observed at 0° is an artifact due to a distance less than 10 pixels between two vertices. The peak at 360° corresponds to V_{1ob} vertices that do not partition the circle. Finally peaks at roughly 50° and 200° correspond to the distribution of the three arcs of the circle partition.

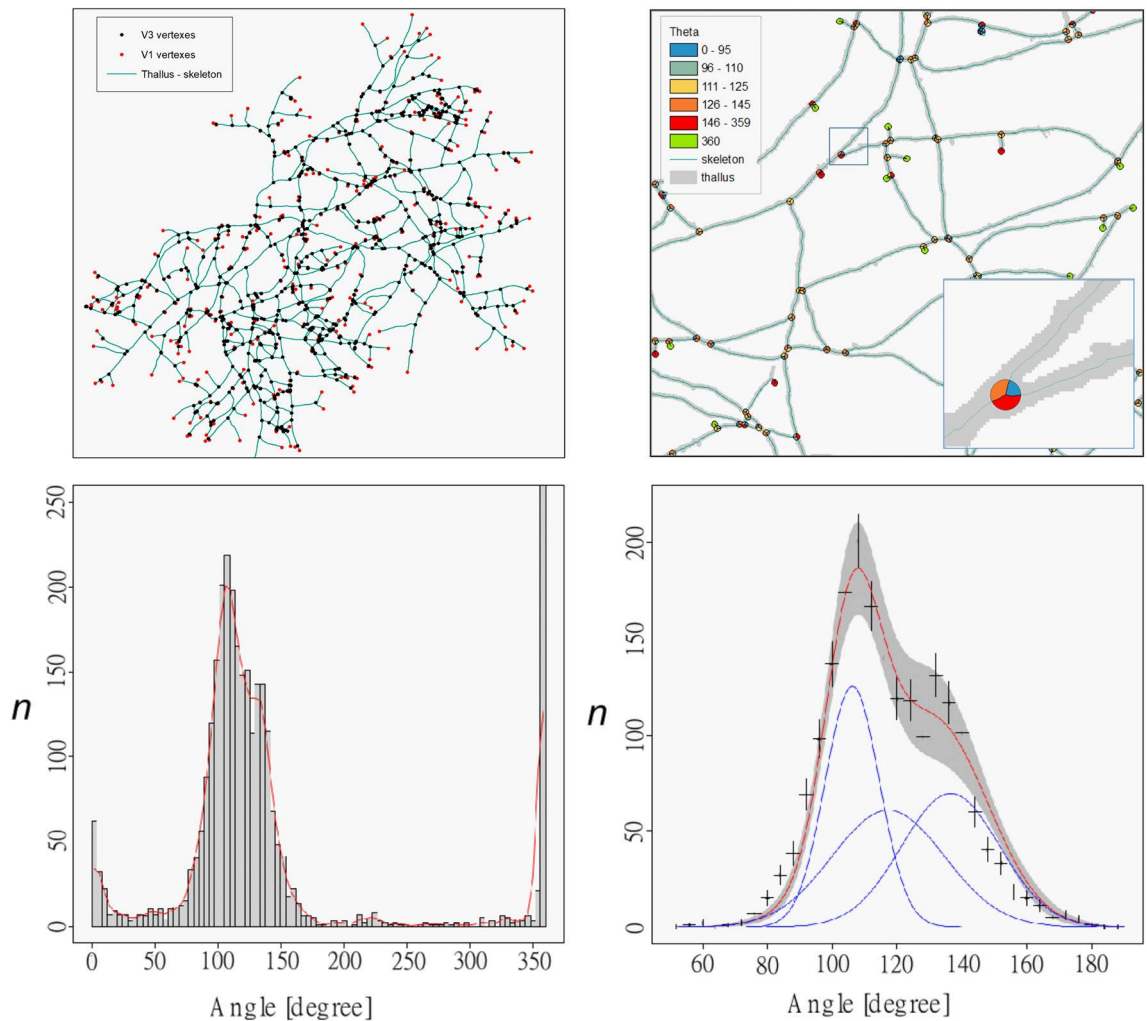


Figure 6. (Top-left) Skeletonization of the thallus, with identification of V_{1ob} (red) and V_{3ob} (black) vertices. (Top-right) Automatic calculation of angles from five-pixel buffers around vertices. (Bottom-left) Total angular spectrum with GIS method of the vertices (four populations, three angles from V_{3ob} vertices and one V_{1ob} vertices). (Bottom-right) Zoom in the range of interest. In blue, the three Gaussian distributions. In red the normalised sum of the three Gaussians. In grey, range of one-standard deviation derived from the fit.

This pdf has been fitted using three Gaussians (see Fig. 6) of which one is only defined by a normalisation factor (the sum of the 3 angles must be 2π). The χ^2 is very good for about 30 d.o.f. The estimated parameters are respectively $106^\circ \pm 1^\circ$ and $137^\circ \pm 3^\circ$ for the means and $8.4^\circ \pm 1^\circ$ and $15^\circ \pm 2^\circ$ for the widths of the interest gaussians (the third Gaussian is fully constrained because the sum of the angles must 2π).

There is only one geometric scenario to define θ_e and θ_o when we have 3 angles and when we know the hierarchy between these angles. The right scenario gives the angle values: $\theta_e = 43 \pm 6^\circ$ and $\theta_o = 75 \pm 5^\circ$, taking into account the uncertainties on the angle constraint.

Discussion

In a previous paper¹², we characterized the hyphal network expansion and densification of the filamentous fungus *P. anserina*—in particular through the evolution of the total length and the number of nodes and apexes—on a standard culture medium assumed to be homogeneous and optimal for the fungal growth. We have presented in details the experimental process implemented both from a biological and physical point of view. Here, we present a two-dimensional simulation of the fungal growth that allows us to better characterize some growth patterns of the fungal network. In particular, we predicted that thallus growth is driven by a specific angular branching process, optimized for the exploration and exploitation of the environment. In this work, a calibration of the simulation was first carried out from the collected data. To this end, we focused on the two main processes that determine the growth pattern of the fungal network—i.e. apical growth and branching- to propose a growth model in the form of a binary tree, meaning that each branch is divided into two sub-branches, as previously described¹⁶. Then, in the generation process, the main features of this model are that lengths and angles follow two different probability laws and that growth has to be considered dynamically. The fungal network growth has then been basically defined as an apical branching process characterized by intersection points between mother/

	θ_e	σ_{θ_e}	θ_o	σ_{θ_o}
Simulation (prediction)	15 ± 10	n.d.	80 ± 10	n.d.
Direct measurement	10 ± 5	8.7 ± 2.4	71 ± 5	12 ± 2.4
GIS method	43 ± 6	8.4 ± 1	75 ± 5	15 ± 2

Table 1. Results on the angle (in degrees) measurements and prediction.

daughter branches (V_3), and apexes of branches (V_1). The growth model was incremented by lateral vertices ($V_{1\ell}$ and $V_{3\ell}$) that can occur on a new daughter branch at a later moment of the growth. Such a process is in agreement with the usual description of fungal network formation²⁰. Namely, two types of branching are allowed to occur according to their location on the hyphae: apical branching which is the emergence of two branches from a hyphal tip (named here V_3) and lateral branching from the sub-apical part of one hypha (named here $V_{3\ell}$). The proposed model was calibrated using the parameter values obtained from our experimental data¹², namely the number of vertices for different times and the spatial geometry of the fungal network.

The quality of experimental observations is limited by geometric intersections (overlapping). Obviously this limitation does not apply to the numerical simulation from which an estimation of the number of geometric intersections can be derived. Moreover, it unambiguously constructs the objective (and unobserved) history of the development of the thallus which is inscribed in the position of “real” V_3 . This simulation also allows an exhaustive study of chirality breaks during growth and/or at the origin of development. The most important feature of this model is the occurrence of two distinct angles, a wide angle and a small one at the daughter branches, when a V_1 vertex transforms into a V_3 vertex. This pattern of angular distributions at the apexes is not the one commonly used by the simulation attempts previously described. For example, Du et al.⁷ has developed a lattice-based system for modelling mycelial growth of *Postia placenta* with an apical branching defined as the emergence of two branches that symmetrically develop with respect to the previous tip direction. Nevertheless, in our case this typical angular distribution allowed us to describe the apical branching process as the simultaneous emergence of two distinct types of branches. First is an exploratory branch, which slightly deviates (small angle) from the initial trajectory of the mother branch and could thus be involved in the centrifugal exploration of new territory, and then in the extension of the colony. Second is the operating branch, which shows a larger angle and deviates strongly from the initial trajectory of the mother branch. This type of branch could thus contribute to the exploitation of neighboring territories and then to the densification of the network. Such a pattern is in agreement with previous studies in which a clear distinction was made between leading hyphae at the edge of a fungal colony which grow into new territory in search for food, and the hyphae behind the colony edge that interconnect to form a three-dimensional network optimized to extract nutrients from the surrounding medium⁴. Then, leading hyphae, with an almost-linear trajectory from the center to the front of the thallus could correspond to the iterative development of exploratory branches from the apexes, contributing in turn to the extension of the thallus.

We hypothesized here that in a homogeneous environment, the fungus thallus growth is suited to occupy the largest surface in order to capture the maximum of resources and thus optimize its growth. Based on our hypotheses, our model predict that the largest occupied surface requires two quite distinct angles, a wide angle, close to 80° and a small angle, close to 15° (see Table 1). In previous studies, the measurement of branch angles has rarely been reported, and it remains in general limited in scope preventing the development of robust statistics. For example, Abd-Elsalam et al.²¹ showed that morphological characteristics of *Rizoctonia solani* included a right-angled branching that could be used in identification of some isolates. Simonin et al.²² carried out the measurement of angles on about a dozen leading hyphae of *N. crassa* and showed an angular distribution ranging between 50° and 90°. More recently, Du et al.²³ led a comparative plot of the angular distribution, both for apical and lateral branching on the thallus of *P. placenta*. They showed that this distribution is not affected by the age of region, or by the branch type and that branch angles remained approximately at 80°, close to the right angle, which appeared to maximize the area covered by the colony.

From new sets of experiments, two approaches have been used in order to extract the branching angular distributions, (see Table 1). One is based on the extraction of the angles formed by an apical branching (V_3) using a direct reading on the image, the other one derives from a GIS automatic method that allows for a global detection of angle measurements (apical and lateral branching). The main point of attention for the development of the first approach was the choice of the diameter of the circle allowing to measure the intersections between branches and thus to measure the branch angles themselves. A circle with a diameter of 50 pixels (approximately five hyphal diameters) was retained. This diameter was chosen in order to decrease the uncertainty due to hyphal width and to decrease the biases due to variation in the orientation of the apexes with time, independently from the initial branching. Branch angles extraction from approximately 200 apical branching allowed us to clearly identified the small and wide angle populations and to numerically estimate their corresponding values. The agreement is striking when compared to the optimal angular distributions that emerge from the prediction. However, the main disadvantage of this approach is that it requires the intervention of an operator who must select the apical vertices to be analyzed. This can be tedious, introducing a bias in the choice of apical branching, and necessarily result in a limited number of selected apexes. However, these results are confirmed by a second approach, complementary to the first one, that is global and based on GIS automatized detection of branch angle measurements. Here again, two populations of angles have been detected, with angular distributions that regain correctly the occurrence of a small and wide angles on apical branching.

Comparison of numerical values leads to several methodological remarks concerning the wide and small angles. Wide angles were found in good agreement with direct measurement and prediction, within one standard deviation for the two angles. Small angles were found significantly higher for the small angle between GIS measurement and direct measurement (and simulation). Differences observed for the small angle measurements between the direct approach and the GIS approach could have several sources. Firstly, the choice of the vertices of the direct measurement could be slightly biased (the radius of the calculation of the angle is important which selects a certain type of vertices). Secondly, the radius of the circle delimiting the branching area for the GIS method, is smaller from the latter one by a factor of 10. This radius was chosen in order to optimize the statistics and avoid artefacts, notably in particularly dense areas of the thallus (high quantity of matter and high number of close nodes). However, this choice could introduce a bias on the result due to the linearization intrinsic to the method which is particularly sensitive for short lengths. Lastly, another bias could be due to the fact that no discrimination between lateral and apical branching could be established with the GIS based method, leading to take into account both cases. Moreover, there must be in the set of vertices allowing the reconstruction of the angles by the GIS method, a remainder of vertices V_{3i} . However, at three standard deviations, i.e. over 99.9%, the results remain consistent.

Overall, from both prediction and experiments we can conclude that, in our conditions, the process of angular branching allows *P. anserina* to occupy as much surface as possible, and then to explore and exploit its environment in the most optimized way. All these considerations must be replaced in an *in vivo* context, in which the fungus is usually in competition with other organisms to occupy the colonized area and the use of available resources. So, we will consider extending the calibrated model to simulate the mycelial growth in heterogeneous environments or under various constraints, as apical branch angles respect their intrinsic property but the extension of emerged branches is influenced by external factors. Likewise, since it is possible to calibrate the simulation in time and space on the experimental data, a study of the different speeds (biological, creation of V_1 , V_3 , V_{1e} , V_{3e} , group velocity, etc.) is conceivable and controllable. A more ambitious simulation is under development. It will allow the joint analysis of local curvature in relation to branch length or lateral branch emergence.

To conclude, our understanding of the coordinated growth and behavior of hyphae inside the fungal network is still in its infancy. In this context, our work contributes to show that a reasoned reductionism on the constraints of growth, both experimentally (two-dimensional growth) and mathematically (toy-model approach) is a powerful tool to describe relevant behaviour of the mycelial growth allowing for exploring multiple hypotheses and constraints rapidly.

Methods

Observation of the numerical thallus growth. The result of the measurements (or in an equivalent way, of the observations) always corresponds to a convolution of the reality, the probability density function (pdf) of “true value”, with the acquisition chain (the pdf of resolutions). In order to make numerical results comparable to the experimental observations, it is then necessary to introduce the same bias and measurement uncertainties. In what follows, *observations* may refer to experimental or numerical data. There are different interferences which confuse the values of the quantities of interest that may depend on the entire detection chain which goes from the shooting to the post processing of the digitized image.

- First, the experimental observation process is not able to distinguish “true” V_3 vertices (i.e. from fission process or equivalently branching, V_3 and V_{3i}) from geometric vertices (i.e. geometric intersection of two branches because of two-dimensional observation). The number of these geometric vertices depends on the time of observation (because of the creation of *lateral operating* branches and *operating* branches). Indeed, the probability of obtaining branch intersections increases with the density of branches which also increases with time. We distinguish two situations: (1) either the intersection is purely geometric (the experimentally observed vertex may result from the superposition of two branches. These vertices are noted V_{3i} because even this kind of vertex shows four branches. Usually, network reconstruction based on experimental images in this situation leads to two vertices with 3 branches in close proximity among the four branches constituting the intersection. In the second situation (2) it gives rise to a merger. We know that a process of hyphal fusion (i.e. anastomosis) can occur in *P. anserina*. These vertices are noted V_{3o} despite the fact it still is a vertex with four branches. The anastomosis phenomenon arises following an unknown probability. However, the number of vertices resulting from the hyphal fusion process is certainly very low compared to the number of $V_3 + V_{3i}$ and V_{3o} vertices. Even if it is marginal, this hyphal fusion phenomenon allows a more efficient information transition within the network and it also makes it possible to be freed from a dependency in the centrality of the network. It is possible to qualitatively study, via simulation, the gain of a hyphal fusion phenomenon by building the *adjacency matrix*^{13,14} and by iterating on it so as to connect all the vertices to each other in a minimum time (or distance). The presence of these vertices blurs the information on the “true” number of vertices V_3 , however, since $N_{V_3} \approx N_{V_1}$ and $N_{V_{3i}} = N_{V_{3l}}$ for a long duration, we get a very reasonable order of magnitude of $N_{V_3} + N_{V_{3i}}$. This limitation of experimental observation forces us to abandon the idea of working on historical markers of the development of a thallus. Indeed, if the vertices V_1 give us an image of the current state of development, the vertices V_3 —resulting from the V_1 which are only intermediate stages—constitute the deep history of growth. In order to remedy to this corner case, we developed a method to clearly identify geometric intersections.
- A second effect is the resolution. On the one hand, the optic we use obviously has a finite resolution. On the other hand, there are experimental limits in the reconstruction of the images. We take these resolutions into account by convoluting the position of the different vertices positions and branches with a Gaussian

resolution. Although taken into account in the simulation of the detection, this phenomenon is not of capital importance in the observation of the macroscopic characteristic quantities of the growth of the network.

- The third effect is also due to the finite resolution of the optic. A vertex V_1 or $V_{1\ell}$ can be very close to a branch. In this case it is impossible to distinguish it from the branch. This situation generates a vertex that behave as in the case of geometric intersections. We do not need to distinguish them from the vertex coming from intersections (i.e. V_{3i}), and so we note them V_{3i} . It is easy to see thanks to the simulation that this phenomenon only becomes important when the density of hyphae is important, therefore for very long growth times.
- Finally we also take into account the possibility of having *ghost* vertices on the images coming from the optics or from the reconstruction of the images. We note this vertices V_{3g} or V_{1g} . This type of vertex is mimicked by specific processing during image reconstruction. Also, its number should be marginal and does not depend on time. Here again, we can experimentally verify that this process is marginal.

The number of numerically observed vertices, $N_{V_{3ob}}$ and $N_{V_{1ob}}$, is therefore the sum of the different contributions of the effects listed above, while dominant parasitic vertices are mostly of geometric nature. It is difficult to build a theoretical model which allows to obtain this number even if we know that this number grows very significantly with the time of observation (typically exponential growth). The simulation makes it possible to obtain this number.

Calibration of the numerical simulation. In the simulation, there are several parameters that need to be calibrated on the data. In order to do that we present here two sensitive variables.

Time scale. To scale the time, we use the number of vertices V_{1ob} and V_{3ob} . It is much more complicated to find the law that governs the number of V_{3ob} vertices than that of V_{1ob} because of the presence of V_{3i} whose law is unknown. On the other hand, because there are more intersections between branches than there are apexes near a branch, one would expect to obtain a larger contribution of branch-branch mergers, even if the merging process remains marginal (the V_1 contribution in $N_{V_{3o}}$). So, the calibration must be carried out on the vertex $V_{1ob}(t)$ and we will check that the number of vertices $V_{3ob}(t)$ follows the empirical law, see Eq. (7), from the data.

The number of $V_{1ob}(t)$ is formally:

$$N_{V_{1ob}}(t) = N_{V_1}(t) + N_{V_{1\ell}}(t) + N_{V_{1g}}(t) + \epsilon_1 N_{V_{3o}}(t) + \epsilon'_1 N_{V_{3i}}(t) \quad (4)$$

For reasonably long time and with a quality control procedure, we can neglect some terms of the sum, i.e. $N_{V_{1g}}(t)$ is very small compared to other numbers of vertices. The number of hyphal fusion apexes, $\epsilon_1 N_{V_{3o}}(t)$, is a second-order corrective term because it depends on anastomosis which is a marginal process. The number of apexes-branches intersections $\epsilon'_1 N_{V_{3i}}(t)$ depends on the resolution of the optics and the reconstruction which can be controlled (it is always possible to degrade the resolution in order to check this number at a given time). However, we cannot effectively neglect this component even if the vertex density is not very high (we will see on the data observed experimentally that it occurs beyond a certain growth time). Also the calibration on the experimental data we use can only be carried out in a growth time domain.

The term $N_{V_{1\ell}}(t)$ depends on the number of branches at the time $t - \delta t$ (with δt the time between two observations in experimental data and index of generation in simulation) and the full probability of producing a lateral branch before this time. The number of branches at the time $t - \delta t$ is $N_{V_1}(t - \delta t) + N_{V_3}(t - \delta t) - 2 \approx 2N_{V_1}(t - \delta t)$. Finally because we are dealing with the growth of a binary tree, $N_{V_1}(t)$ is known to be $N_{V_1}(t) = 2^{at}$ with $a > 0$, where N_{V_1} is a scale parameter for the time. Using these approximations the number of $V_{1ob}(t)$ is then:

$$N_{V_{1ob}}(t) \sim 2^{at} + 2^{a(t-\delta t)} p \approx A 2^{at} \quad (5)$$

with $\delta t/t \leq 1$ and with p the mean fraction of lateral branches for a branch (which is a function of the probability to create *lateral branches*) which is constant by hypothesis. A is a constant amplitude which takes into account p and the fact that if δt is perfectly defined, the origin of the times is not: there is a "latency" time between the start of germination and the first observation. Indeed, we know that for $t = 0$ we must obtain $0 \leq N_{V_{1ob}}(0) \leq 3$. We can then rewrite this number of vertices as $N_{V_{1ob}}(t) = A' 2^{a(t+t_0)}$ and in this case $0 \leq A' \leq 3$ and t_0 is the "latency" time. So, $A' 2^{at_0} = A$.

We fit experimental data with this law in order to get the 2 parameters (see experimental approach) then we fit $N_{V_{1ob}}(t)$ coming from the simulation with the same law. In order to calibrate the simulation time we get the relation $(A 2^{at})_{data} = (A 2^{at'})_{sim}$ and compute t' with the hypothesis that t' is a linear function of t .

In Fig. 7 (left), we plot the uncertainties for one standard deviation obtained from the fit parameters of data (grey area). We scale the time (and compute one standard deviation for this time from the uncertainties on the parameters of the 2 fits carried out) and plot the points coming from the simulation (the black cross, the uncertainties on the numbers of V_1 coming from simulation follow a Poisson distribution).

The law for the number of V_{3ob} is $N_{V_{3ob}}(t) \approx 2^{at} \sum_n c_n t^n$ because N_{V_3} have the same law as N_{V_1} since $N_{V_{3i}}$ is the dominant term of $N_{V_{3ob}}$ and we assume a regular increase with time for this number. In practice, the series can be limited to the first 2 terms (check the first negligible order in the fit). Grey area in Fig. 7 (right) show one standard deviation giving from the fit parameters of data. If the scale factor obtained from V_{1ob} is correct, the points from the simulation for the three bodies vertices, must be inside a side band from the data.

The result shows a good agreement. We conclude that (1) we have correctly defined the time scale factor, and (2) binary tree growth is the right model for dynamic growth of *P. anserina*. However, it is certain that the law of growth of the fungus we use, $A 2^{at}$ ($a > 0$), diverges when time tends towards infinity. This behaviour is certainly

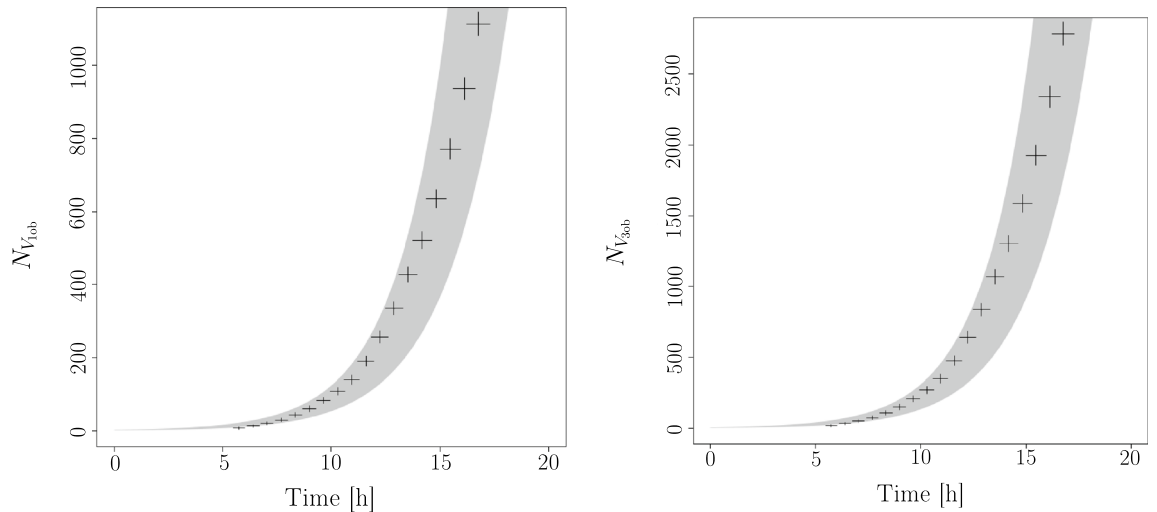


Figure 7. Left, one-standard deviation range of the experimental data fit of V_{1ob} (grey) versus time, points: number of V_{1ob} coming from the simulation (black) with scaled time. Right, one-standard deviation range of the experimental data fit of V_{3ob} (grey) versus time, points: number of V_{3ob} coming from simulation (black) with scaled time to the data obtained from V_{1ob} . See text for details.

not permissible. Also, the law actually followed by this growth should rather be of the form $N_{V_{1ob}}(t) = \frac{1}{b+c2^{-at}}$ with a, b, c real positive parameters. Using this law, we can see that if at is not too big and if $c \gg b$, the law becomes $N_{V_{3o}} \approx c2^{at}$ which is the law of binary tree. So, the law we have considered in this analysis is valid for not too long (i.e. $t - t_0 < 15h$) but not too short time (i.e. $t - t_0 > 3h$).

Space scale. With a growth model in the form of a binary tree, it is easy to obtain an observable which makes it possible to calibrate the distances in the simulation. For a given generation g , the number of vertices V_1 is $N_{V_1} = 3(2^g - 2)$ where the factor three comes from the number of branches of the germination. The number of segments between two vertices ($(V_3, V_3$ or (V_3, V_1)) is $N_{seg} = 3(2^g - 1)$, so that the average length of the network can be written $\langle L \rangle = \langle \ell \rangle N_{seg}$ where $\langle \ell \rangle$ is the average length between two vertices. The ratio, r_1 , of the average length of the network to the number of V_1 in the network is then $r_1 = \langle \ell \rangle (2 - 2^{2-g})$ so that this is constant for $g \gg 1$.

Because of lateral branches we need to correct this ratio. By construction, the number of lateral branches is proportional to the number of vertices segments. So, $r_1 \approx \langle \ell \rangle (2 - 2^{2-g}) \frac{1+p}{1+2p}$ for $g \gg 1$ and where p is the mean fraction of lateral branches for a branch. r_1 is again a constant for $g \gg 1$. The index of generation g is linked to time that was calibrated previously.

So, for a time not too small we must show on data a constant for r_1^{data} . This is the case and we can estimate this constant on the data so as to calibrate the species on the simulation.

In Fig. 8 (left), we plot the uncertainties for one standard deviation giving from the fit parameters of data (grey area). We scale r_1^{sim} by the relation $r_1^{sim} = r_1^{data} t$ for a time not too small (using the scaled time obtain before) and plot the ratio coming from simulation (black cross). The uncertainties on the numbers of r_1^{sim} are obtain by considering a Poisson hypothesis and relative uncertainties for L_{tot} equal 5%.

In Fig. 8 (right), we show the ratio r_3^{data} coming from the fit (grey area is one standard deviation) and we plot the r_3^{sim} for the simulation with the space scale factor and the time scale factor obtained by v_{1ob} . Note that it is impossible to define the law of $r_3^{data/sim}$ because of the geometric intersections. However we know that this ratio must decrease as a function of time since the number of geometric intersections increases strongly and independently of the total length of the network. The agreement for r_3 between experimental data and simulation is convincing.

Another test is to check if the spatial geometry of the network has the same geometric behaviour between the experimental data and the simulation as a function of time. For this purpose, at a given time, we construct the inertia tensor of the vertex distribution for V_{3ob} (resp. V_{1ob}):

$$I = \left| \begin{matrix} \sum_n (x_n - x_0)(x_n - x_0) & \sum_n (x_n - x_0)(y_n - y_0) \\ \sum_n (x_n - x_0)(y_n - y_0) & \sum_n (y_n - y_0)(y_n - y_0) \end{matrix} \right| \tag{6}$$

with x_0, y_0 the mean position of the vertices cloud and x_n, y_n the position of the vertices.

Diagonalisation of this tensor gives two eigenvalues (and two eigenvectors, which are the main axes of the vertices cloud). These eigenvalues are ordered as $\lambda_1 \geq \lambda_2$ and we define an indicator of the geometry of the vertex cloud: $s = \frac{2\lambda_2}{\lambda_1 + \lambda_2}$ (called *sphericity*). If $\lambda_1 \gg \lambda_2$ then $s \rightarrow 0$, which means that the vertices cloud has the shape of an ellipse, if the eigenvalues are degenerated, $s = 1$, which means that the vertices cloud has the shape of a disk.

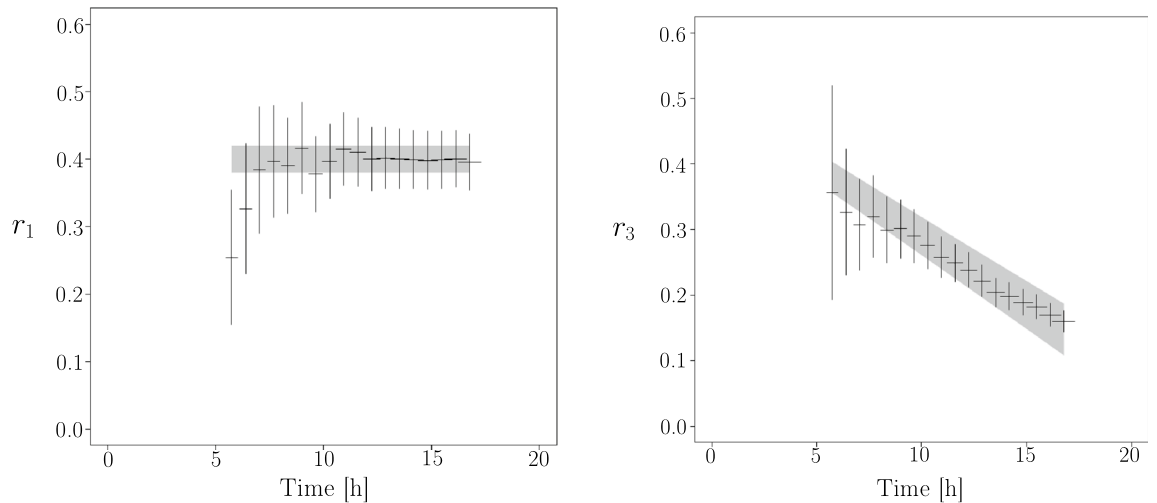


Figure 8. (Left) One standard deviation range of r_1^{data} experimental data fit in function of time (grey). Black points are r_1^{sim} extracted from the simulation with scaled time and scaled space. (Right) One standard deviation range of r_3^{data} experimental data fit (grey). Black points are r_3^{sim} extracted from the simulation with scaled time and space coming from V_{1ob} . See text for details.

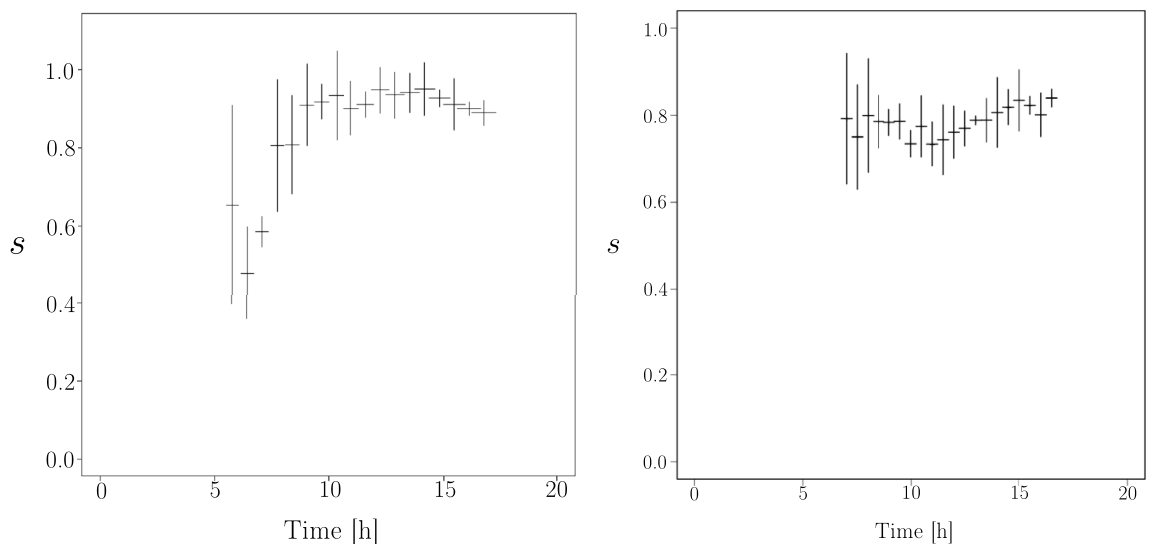


Figure 9. Sphericity of V_{1ob} vertices distribution, defined as the ratio $s = 2\lambda_2 / (\lambda_1 + \lambda_2)$ of the eigenvalues (see the text for more details) in function of time. Right, sphericity extracted from the simulation, with scaled time and space. Left, is sphericity extracted from experimental data.

In the data the shape of the vertex cloud is conserved over time ($s(t) = constant$). Its value depends on the initial conditions, i.e. the way the spore was generated. So the algebraic value of the constant is not relevant and only the shape of $s(t)$ is relevant.

We check if the simulation gives a constant sphericity with scaled time and space. Figure 9 gives $s(t)$ for the simulation and for the data of the V_{1ob} distribution in the plan. The values for the uncertainties are obtained by a bootstrap method²⁴. The sphericity for the V_{3ob} vertices are also constant for data and simulation but because of the V_{3i} it is difficult to give a right interpretation.

We check whether the direction of the main axes of the vertices cloud move as a function of time. In the case of experimental data this direction is constant even $s \sim 1$. The same applies in the case of the simulation.

Observation of the thallus growth. After the standard binarisation and vectorization process described in¹² we extracted and adjusted the following quantities in order to calibrate the simulation process. Let $N_{V_{1ob}}$ be the number of observed V_{1ob} , $N_{V_{3ob}}$ be the number of observed V_{3ob} and L the total length of the network. We assume the uncertainties associated to the vertices count to be Poisson. The total length L is about $N_{V_{1ob}} + N_{V_{3ob}}$ segments of average length $\langle \ell \rangle$. An estimation of the uncertainty associated with the measure of the total length L was derived as $\sigma_L = \sqrt{N_{V_{1ob}} + N_{V_{3ob}}} \langle \ell \rangle$. We assume the uncertainty associated to the acquisition time t is

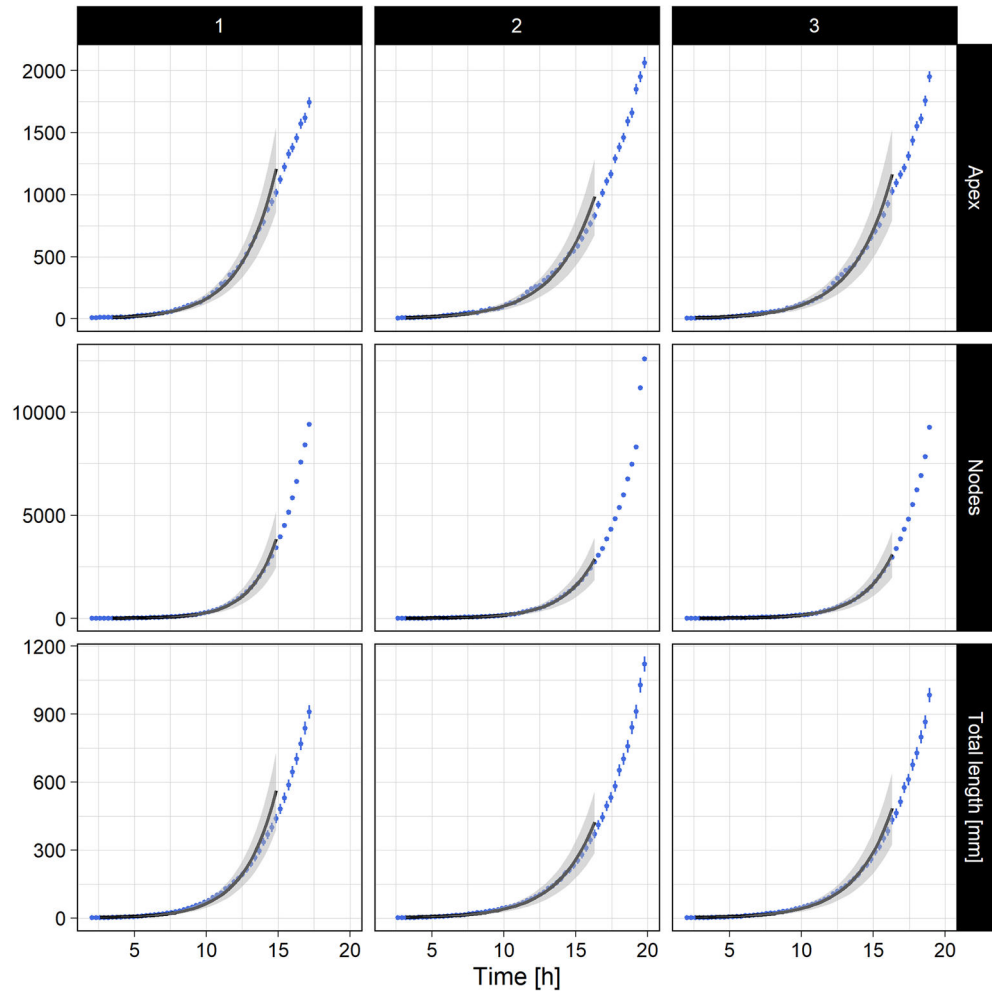


Figure 10. Number of apexes $N_{V_{1ob}}$, Number of nodes $N_{V_{3ob}}$ and total length L as a function of time t for the experiments (1) (left), (2) (middle) and (3) (right). Experimental data (blue) are shifted in time of respective t_0 . Solid black lines represent the best fit parameters (see Table 2). The respective grey shadowing wraps the data range used to perform to statistical fit, while its thickness quantifies the associated uncertainties to one standard deviation.

half the sampling period δt . The growth of such a microorganism follows basically a five steps timeline: (1) a lag phase, (2) an exponential phase, (3) a deceleration phase, (4) a stationary phase, and (5) a decline phase. We study only the tree first steps. We previously showed that the temporal growth of $N_{V_{1ob}}$, L and $N_{V_{3ob}}$, to a first approximation, can be modelled by an exponential growth. This of course can only be valid locally (i.e. for short growth times) and from a purely descriptive perspective. Indeed, to be consistent with the binary tree model we made use of a base-2 exponential function to describe the growth of these quantities. Thus the following expression may be used:

$$X_i(t) = X_i^0 2^{(t+t_0)/\tau_i} \tag{7}$$

where X_i stands respectively for $N_{V_{1ob}}$, $N_{V_{3ob}}$ or L and t is the time. τ is the characteristic growth time, t_0 is the temporal offset corresponding to the transition between the end of the lag phase and the first observation. For the experimental data, there is necessarily a time offset between the first recorded image and the ascospore germination. In order to compare the experiments with one another, this time offset should be taken on a per experiment basis because it varies according to each experiment. X_i^0 are the respective parameters $N_{V_{1ob}}^0$, $N_{V_{3ob}}^0$ and L^0 , corresponding to the growth onset given the temporal offset. $N_{V_{1ob}}^0$, $N_{V_{3ob}}^0$ and L^0 values are respectively expected to be approximately 3, 1, and in the range 10–20 hyphal diameters. Equation (7) shows a non-linear behaviour of the fit parameters. Consequently we made use of the following procedure: We excluded spurious data, i.e. for time greater than 15 h and for time smaller to 2h. The value of t_0 was manually adjusted in order to obtain simultaneously $N_{V_{1ob}}^0$, $N_{V_{3ob}}^0$ and L^0 in the range of the respective expected values. We assume that the uncertainty on t_0 corresponds to $2\delta t$. Note that t_0 gives access to the lag phase duration. With t_0 as a fixed parameter the least squares fit is linear. The greyed areas in Fig. 10 show the results of the fit (for one standard deviation) on the considered data range. The points are the data with their uncertainties.

Experiment	t_0 (h)	$N_{V_{1ob}}^0$	$\tau_{V_{1ob}}$ (h)	$N_{V_{3ob}}^0$	$\tau_{V_{3ob}}$ (h)	L^0 (mm)	τ_L (h)
(1)	1.7	2.54 ± 0.57	1.67 ± 0.08	1.23 ± 0.37	1.28 ± 0.05	0.81 ± 0.28	1.59 ± 0.09
(2)	2.3	2.72 ± 0.55	1.92 ± 0.09	1.63 ± 0.46	1.51 ± 0.06	0.91 ± 0.31	1.85 ± 0.11
(3)	1.7	2.54 ± 0.52	1.84 ± 0.09	1.47 ± 0.43	1.47 ± 0.06	0.84 ± 0.29	1.79 ± 0.11

Table 2. Summary of the growth rate exponents for $N_{V_{1ob}}$, $N_{V_{3ob}}$ and the total length L extracted from data shown in Fig. 10. The χ^2 values were all found to fall into the range 1–5.

$\tau_{V_{1ob}}$ (h)	$\tau_{V_{3ob}}$ (h)	τ_L (h)
1.81 ± 0.05	1.42 ± 0.03	1.75 ± 0.06

Table 3. Final results of the experimental growth rate exponents, from data shown in Table 2.

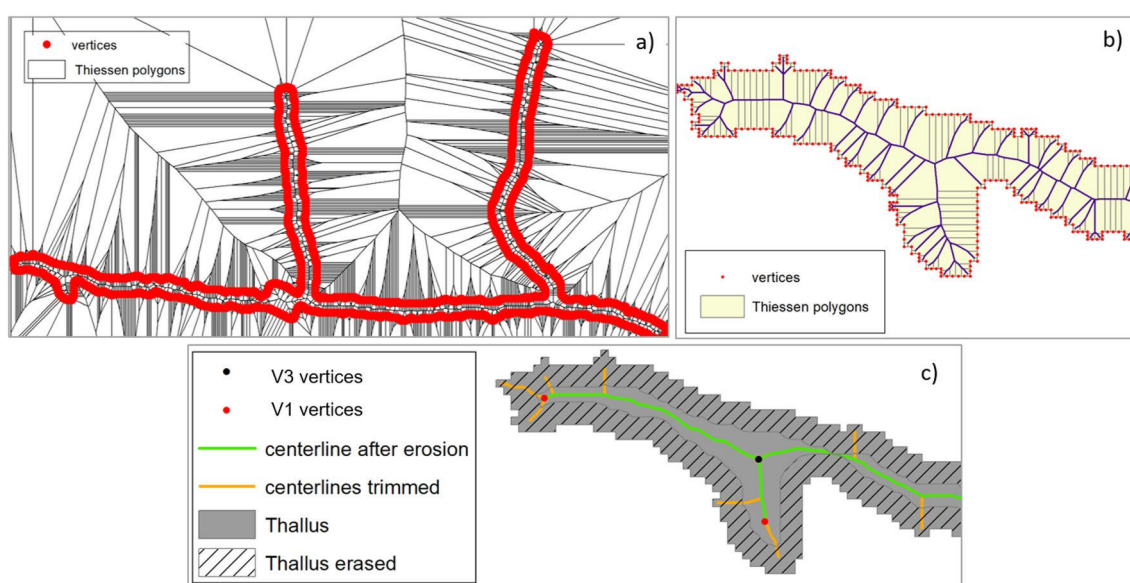


Figure 11. Skeletonization processes of the thallus. (a) Construction of Thiessen polygons and generation of thallus vertices. (b) Zoom in the left part of (a) shows the point-features vertices of the thallus; Thiessen polygons inside the thallus; the first set of centerlines kept is represented in purple. (c) Final geomatic treatments providing the skeleton (green) after the trimming of the short surrounding line segments (the orange ones).

The growth rate exponents τ and the measurement of specific quantitative parameters for the three experiments are summarized in Table 2 and Fig. 10, respectively.

Because these 3 measurements are i.i.d. we assume the final results for the pertinent parameters of the growth are those shown in Table 3. Note the difference between the doubling time $\tau_{V_{1ob}}$ and $\tau_{V_{3ob}}$. This is a straightforward consequence of the contribution of the geometric vertices in the three body vertices collection. Conversely, doubling time for the one body vertices $\tau_{V_{1ob}}$ and total length τ_{V_L} are found to be in agreement.

Skeletonization stage and vertex detection for GIS automatic method. Several methods for generating centerlines, or skeletons, from polygon features have been described in the literature. We can cite Voronoi diagram based method, medial axis transformation algorithm or Delaunay triangulation method^{25,26}. Among those, an automatic Geographic Information System algorithm, ESRI Polygon to Centerline—available online thanks to the ESRI²⁷ platform—appears to be efficient for modelling skeletons of elongated polygonal features²⁵. The *Polygon to Centerline* GIS tool used in this work, based on the creation of Thiessen polygons, is described as follows:

- (i) The first step is to create a large number of vertices from a thallus polygon feature (methodological aspects were discussed in¹²) through an adaptive densification method for improving the centerline quality. Vertices are then converted into point features (red point features in Fig. 11a).

- (ii) Then the Thiessen polygons may be created, each of them contains a single point input feature (i.e. a vertex). We can observe a high number of Thiessen polygons located both inside and outside the fungal thallus, and of course only Thiessen polygons located inside the thallus area interest us. Thus, we extract polygons that overlay the thallus by using the “clip” geoprocessing tool (represented in beige in Fig. 11b), which are then converted into linear features. All linear segments that are connected to the thallus single polygon are removed to constitute the centerlines, represented in purple in Fig. 11b.
- (iii) At this step of the treatments, we can see that a high number of short purple linear segments have to be removed (or trimmed). We used the ESRI “Trim Line” tool, which consists in removing in our case all purple lines that do not touch another line at both end points. The result of this treatment is shown in Fig. 11c (the orange plus green segments).
- (iv) A small number of branching artifacts still need to be removed (the orange ones). The hyphal width being relatively homogeneous, orange centerlines are removed by calculating a morpho-mathematic erosion (creation of a three pixels ‘negative’ buffer from the thallus envelope): all the segments that touch the three pixels wide surrounding area (grey shaded area in Fig. 11c) are trimmed and only the green segments are kept to form the skeleton. It should be specified that this method is efficient to produce centerline features and for working on V_{3ob} vertices, but it slightly alters the position of the apexes (V_{1ob}).
- (v) We then used successively two GIS tools to dissolve all centerline segments into an unique linear feature and to generate a feature class of points for locating the vertices (nodes and apexes). At this processing step, each V_{3ob} vertex is materialized by three superimposed point features when each V_{1ob} vertex corresponds to only one point feature; this makes it possible to distinguish V_{3ob} vertices from V_{1ob} vertices. Finally, V_{3ob} features are dissolved to produce one feature per vertex (instead of three) (see Fig. 6).

Received: 6 July 2021; Accepted: 7 July 2022

Published online: 19 July 2022

References

1. Fricker, M. D., Heaton, L. L. M., Jones, N. S. & Boddy, L. The mycelium as a network. *Microbiol. Spectrum* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0033-2017> (2017).
2. Sanati Nezhad, A., Naghavi, M., Packirisamy, M., Bhat, R. & Geitmann, A. Quantification of cellular penetrative forces using lab-on-a-chip technology and finite element modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 8093–8098. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221677110> (2013).
3. Boswell, G. P., Jacobs, H., Davidson, F. A., Gadd, G. M. & Ritz, K. Functional consequences of nutrient translocation in mycelial fungi. *J. Theor. Biol.* **217**, 459–477. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2002.3048> (2002).
4. Lew, R. R. How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 509–518. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2591> (2011).
5. Heaton, L. *et al.* Analysis of fungal networks. *Fungal Biol. Rev.* **26**, 12–29. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.02.001> (2012).
6. Falconer, R. E., Bown, J. L., White, N. A. & Crawford, J. W. Biomass recycling and the origin of phenotype in fungal mycelia. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **272**, 1727–1734. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3150> (2005).
7. Du, H., Ayouz, M., Lv, P. & Perré, P. A lattice-based system for modeling fungal mycelial growth in complex environments. *Phys. A* **511**, 191–206. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2018.07.051> (2018).
8. Du, H., Tran, T.-B.-T. & Perré, P. A 3-variable PDE model for predicting fungal growth derived from microscopic mechanisms. *J. Theor. Biol.* **470**, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.03.015> (2019).
9. Boswell, G. P. & Hopkins, S. Linking hyphal growth to colony dynamics: Spatially explicit models of mycelia. *Fungal Ecol.* **1**, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.10.003> (2008).
10. Meškauskas, A., Fricker, M. D. & Moore, D. Simulating colonial growth of fungi with the Neighbour-Sensing model of hyphal growth. *Mycol. Res.* **108**, 1241–1256. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001261> (2004).
11. Vidal-Diez de Ulzurrun, G., Baetens, J. M., Van den Bulcke, J. & De Baets, B. Modelling three-dimensional fungal growth in response to environmental stimuli. *J. Theoret. Biol.* **414**, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.11.020> (2017).
12. Dikec, J. *et al.* Hyphal network whole field imaging allows for accurate estimation of anastomosis rates and branching dynamics of the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Sci. Rep.* **10**, 3131. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57808-y> (2020).
13. Newman, *The Structure and Dynamics of Networks* (Princeton University Press, 2006).
14. Latora, V., G. R., Nicosia, V. Complex Networks|Principles, Methods and Applications.
15. Solé, R. V. & Valverde, S. Information theory of complex networks: On evolution and architectural constraints. In *Complex Networks* (eds Ben-Naim, E. *et al.*) 189–207 (Springer, 2004). https://doi.org/10.1007/978-3-540-44485-5_9.
16. Garnier, R. & Taylor, J. *Discrete Mathematics: Proofs, Structures and Applications* 3rd edn. (CRC Press, 2009).
17. Sarrocco, S. Dung-inhabiting fungi: A potential reservoir of novel secondary metabolites for the control of plant pathogens. *Pest Manage. Sci.* **72**, 643–652. <https://doi.org/10.1002/ps.4206> (2016).
18. Silar, P. *Podospora anserina* (HAL, <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02475488>, 2020).
19. *Podospora anserina* genome project. <http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/>. Accessed on 10 Jan 2022.
20. Harris, S. D. Branching of fungal hyphae: Regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia* **100**, 823–832 (2008).
21. Abd-El salam, K. A., Moslem, M. A. & Bahkali, A. H. First morpho-molecular identification of *Rhizoctonia solani* AG-7 from potato tuber-borne sclerotium in Saudi Arabia. *Afr. J. Microbiol. Res.* **3**, 952–956. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000328> (2009).
22. Simonin, A., Palma-Guerrero, J., Fricker, M. & Glass, N. L. Physiological significance of network organization in fungi. *Eukaryot. Cell* **11**, 1345–1352. <https://doi.org/10.1128/EC.00213-12> (2012).
23. Du, H., Lv, P., Ayouz, M., Besserer, A. & Perré, P. Morphological characterization and quantification of the mycelial growth of the brown-rot fungus *Postia placenta* for modeling purposes. *PLoS One* **11**, e0162469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162469> (2016).
24. B. Efron, R. J. T. An Introduction to the Bootstrap.
25. Lewandowicz, E. & Flisek, P. A method for generating the centerline of an elongated polygon on the example of a watercourse. *ISPRS Int. J. Geo Inf.* **9**, 304. <https://doi.org/10.3390/ijgi9050304> (2020).
26. Szombara, S. Comparison of methods used in cartography for the skeletonisation of areal objects. *Geoinform. Pol.* **14**, 8. <https://doi.org/10.1515/gein-2015-0008> (2015).

27. <https://pro.arcgis.com/fr/pro-app/latest/tool-reference/topographic-production/polygon-to-centerline.htm>. Accessed 15 Octo 2020.

Acknowledgements

We warmly thank Sylvie Cangemi for her expert technical assistance and Frédéric Filaine for the improvement of the experimental set-up. Clara Ledoux is supported by a PhD scholarship from the Doctoral School MTCI (ED 563). This work was supported by the IdEx Université de Paris, ANR-18-IDEX-0001. Special thanks to Florence for her legendary optimism.

Author contributions

C.L. performed biological experiments, contributed to their analysis and discussed the results. G.R.R. contributed to the data analysis and discussed the results. C.B. realized the GIS automatic approach and discussed the results. Ch.L. contributed to the data analysis and discussed the results. F.C.L. and E.H. conceived the experimental setup. F.C.L., E.H. and P.D. conceived the ideas and the analysis, interpreted the data and wrote the article. P.D. performed the simulation. All authors reviewed and amended the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to É.H.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Distributions angulaires (contraintes de croissance et souches mutantes)

Les paragraphes suivants présentent des résultats complémentaires concernant les angles de branchement, qui ne sont pas développés dans l'article [149].

Tout d'abord, une procédure identique de mesure des angles est réalisée pour les branchements latéraux en conditions de culture standards. On rappelle que les branchements latéraux n'ont pas lieu au niveau de l'extrémité de l'hyphé, mais le long de celle-ci. Les angles θ_e et θ_o associés aux hyphes latérales sont définis de la même manière que pour les branchements apicaux.

De plus, les mesures d'angles sont également effectuées sur des images provenant d'expériences dans des conditions de culture différentes. L'objectif est d'analyser si les distributions angulaires de θ_e et θ_o sont affectées par les conditions de croissance. Pour cela, les angles sont mesurés à partir des images des mycéliums issus des expériences sous contraintes présentées dans la section 3, p.73 (voir également section 2.2.3, p.67). Les six conditions de cultures étudiées sont rappelées sur la figure 5.6. De même que pour les conditions de culture standards détaillées ci-dessus, les mesures sont effectuées sur trois réplicats pour chaque condition, avec un effectif de 66 branchements.

D'autre part, trois souches mutantes de *P. anserina* sont également observées afin d'extraire les distributions angulaires associées à leurs réseaux respectifs : $\Delta pah1\Delta pah5$ [151], $\Delta kef1$ [153], et $\Delta PaMpk1\Delta PaMpk2\Delta PaMpk3$ [154]. Ces trois souches ayant été décrites comme présentant un mycélium comparativement à la souche sauvage, il est intéressant d'évaluer si cette désorganisation du réseau est quantifiable par l'étude des angles de branchement. Des images des mycéliums observés avec notre dispositif expérimental sont présentées sur la figure 5.5. Les phénotypes particuliers des souches sont succinctement évoqués ici, et plus de précisions concernant les gènes délétés sont disponibles dans la section 2.1.3, p.63.

- $\Delta pah1\Delta pah5$: la fréquence des branchements est fortement supérieure à celle de la souche sauvage [151] [152].
- $\Delta kef1$: le nombre d'anastomoses est très important (le nom du gène délété *KEF1* signifie « KEep-on-Fusing 1 ») [153].
- $\Delta PaMpk1\Delta PaMpk2\Delta PaMpk3$: les branchements sont irréguliers et certaines hyphes sont courbées [154].

De plus, pour les trois souches mutantes, la vitesse de croissance des hyphes est réduite par rapport à la souche sauvage. On notera que pour la souche $\Delta kef1$, nous avons observé sur nos images des hyphes avec une croissance particulièrement curviligne (figure 5.5). Ces trois souches sont cultivées en conditions standards, et les angles de branchement sont étudiés en suivant une procédure identique à celle décrite précédemment.

Toutes les mesures réalisées pour les expériences sous contraintes ou à partir de souches mutantes concernent uniquement les branchements apicaux. De fait, la plupart des mycéliums issus de ces expériences présentent un faible nombre de branchements latéraux détectables, dans la mesure où les thalles sont parfois peu développés ou très denses.

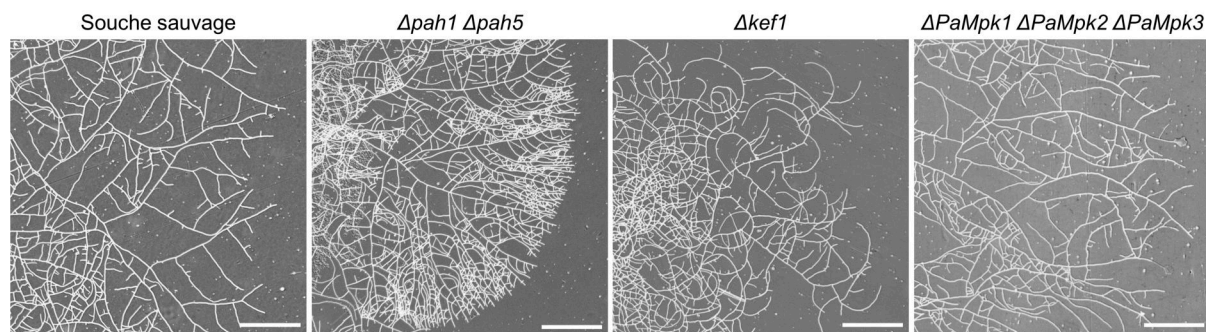


FIG. 5.5 – Fronts de croissance des mycéliums cultivés sur feuille de cellophane en conditions standards, extraits des panoramas des thalles complets. Les souches présentées sont la souche sauvage de *P. anserina* et les trois souches mutantes étudiées ici, dont le nom est indiqué au-dessus de l'image. Barres d'échelle : 500 μm .

Les distributions de θ_e et θ_o sont synthétisées sur la figure 5.6. On observe que globalement, les moyennes des distributions angulaires sont toutes similaires à celles des conditions standards. La distinction angulaire décrite les deux types d'hyphes d'exploration et d'exploitation est systématiquement retrouvée, soulignant ainsi que ce processus de branchement particulier est robuste. Certaines conditions, comme le stress ionique (C3), ou les modifications de température (C5 et C6), semblent induire une gamme de valeurs légèrement plus étendue. Les valeurs des moyennes et des écarts-types de chaque distribution sont présentées dans l'annexe D, p.239.

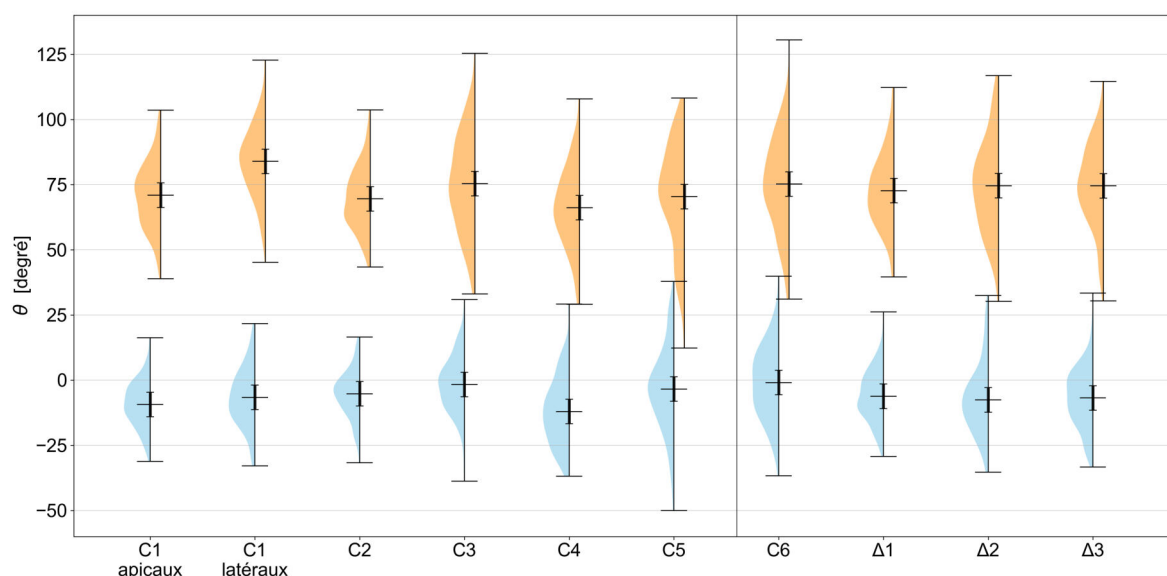


FIG. 5.6 – Distributions angulaires de θ , présentées de façon identique à la figure 5.4. Seuls les branchements apicaux sont étudiés. Les conditions de culture sont : (C1) conditions standards, (C2) milieu pauvre (sans source de carbone), (C3) stress ionique (ajout de KCl), (C4) stress lumineux, (C5) température faible, (C6) température élevée. $\Delta 1$ correspond à la souche $\Delta pah1 \Delta pah5$, $\Delta 2$ à $\Delta kef1$, $\Delta 3$ à $\Delta PaMpk1 \Delta PaMpk2 \Delta PaMpk3$. Les souches mutantes sont cultivées en conditions standards. $N = 198$ (3×66) branchements pour chaque expérience.

5.2.3 Sens de rotation des branchements

On s'intéresse ici à l'orientation de l'angle θ_o en fixant un sens de rotation positif global pour toute l'image. Ce dernier est arbitrairement choisi comme étant le sens horaire. Pour chaque branchement, on détermine si l'angle défini entre le prolongement de l'hyphe mère vers l'hyphe d'exploitation est orienté dans le sens horaire (+) ou antihoraire (-), comme indiqué sur la figure 5.7.

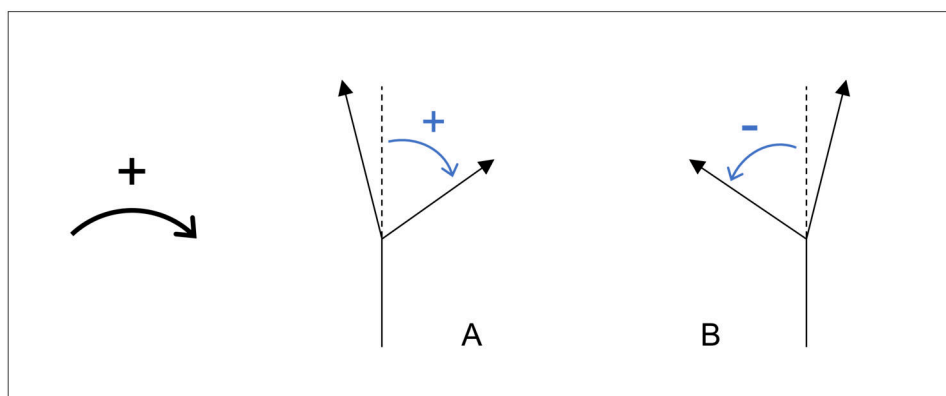


FIG. 5.7 – Schéma définissant le sens horaire comme étant positif. Cette convention s'applique à tous les branchements de l'image. Les angles θ_o peuvent être orientés dans le sens positif (A) ou négatif (B).

L'étude est menée sur les mêmes collections de branchements que celles utilisées dans la partie précédente concernant θ_e et θ_o , soit $N = 198$ branchements par condition. En considérant n le nombre d'angles dans le sens positif, on estime la probabilité associée au sens horaire par $P_N = \frac{n}{N}$, la probabilité complémentaire étant $1 - P_N$. L'incertitude est estimée avec l'écart-type de la loi binomiale comme $\sigma^2 = N P_N(1 - P_N)$. Les résultats sont présentés en pourcentage sur la figure 5.8.

On s'intéresse tout d'abord à la condition de référence « C1 apicaux », c'est-à-dire à l'étude des branchements apicaux pour l'expérience en conditions standards. Un test binomial est mis en oeuvre pour évaluer si la fréquence d'occurrence des orientations positives s'écarte significativement d'une probabilité théorique de 0,5. Le degré de signification, ou p -value, est estimé à 0,27 par le biais du test binomial. Cette valeur étant supérieure à 0,05, on ne rejette pas l'hypothèse d'équiprobabilité. On considère donc que l'orientation dans le sens positif ou négatif est équiprobable pour la condition de référence.

On cherche ensuite à comparer les autres conditions vis-à-vis de la référence à l'aide d'un test de Dunnett, qui estime les p -values associées pour chaque paire condition-référence, la référence étant la condition « C1 apicaux ». Les valeurs des p -values sont corrigées avec la méthode de Bonferroni, afin de les ajuster en fonction du nombre de tests réalisés pour contraindre le seuil nominal d'erreur à 5%. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.1. Les valeurs des p -values étant supérieures à 0,05 pour tous les couples, on peut considérer que toutes les conditions sont comparables à la référence, c'est-à-dire que les probabilités d'orientation dans le sens horaire

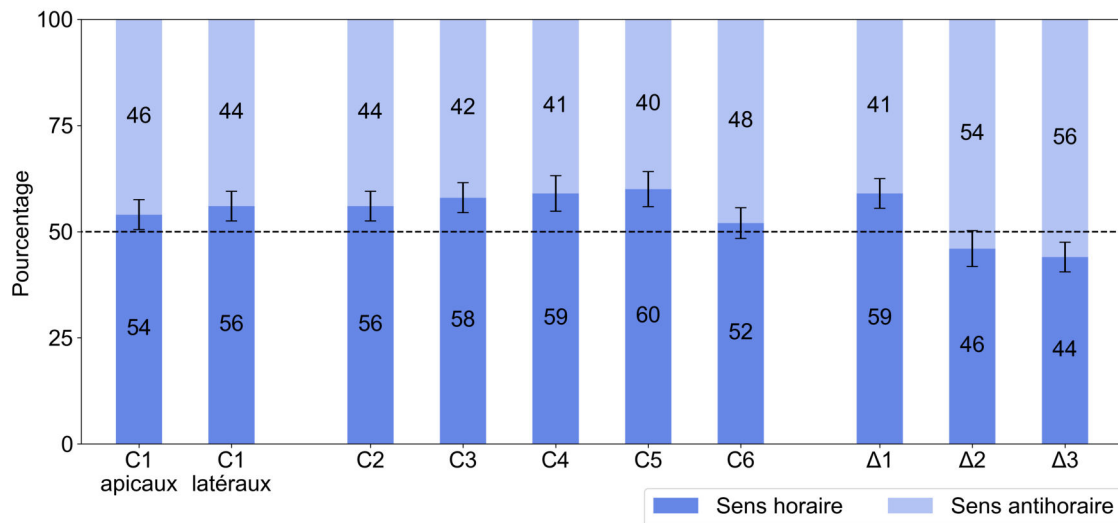


FIG. 5.8 – Pourcentage d’angles θ_o orientés dans le sens horaire et antihoraire pour différentes conditions de croissance (détaillées dans la légende de la figure 5.6). $N = 198$ pour chaque condition. Voir le texte pour l’estimation de l’incertitude. La ligne en pointillé représente l’équiprobabilité.

ou antihoraire sont équiprobables. En conclusion, nous ne trouvons aucun indice indiquant une orientation préférentielle globale lors du branchement.

TAB. 5.1 – Orientation dans le sens horaire ou antihoraire : p -values calculées par le test de Dunnett pour chaque condition en comparaison avec la référence.

	C1 latéral	C2	C3	C4	C5	C6	$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$
p -value	1	1	1	1	0,19	1	1	1	0,51

5.2.4 Orientation des branchements par rapport à la courbure de l’hyphe

Enfin, on étudie l’orientation de l’angle θ_o par rapport à la courbure naturelle de l’hyphe. Deux configurations peuvent se présenter : l’hyphe d’exploitation peut croître du côté *extrado* de la courbure, ou bien du côté *intrado*, comme schématisé sur la figure 5.9. La répartition entre ces deux catégories est déterminée pour chaque branchement en étudiant le signe de l’angle θ_e : s’il est négatif, le branchement est *extrado* ; s’il est positif, le branchement est *intrado*. Cependant, pour certains branchements, la précision de la mesure de l’angle θ_e ne permet pas de déterminer la nature *extrado* ou *intrado* du branchement. Ces cas indéterminés représentent moins de 10% de l’effectif total, et seront répartis équitablement entre les deux catégories.

Les résultats sont présentés sur la figure 5.10 pour toutes les conditions, et l’incertitude est calculée de la même manière que dans la partie précédente (voir section 5.2.3). De même, on réalise tout d’abord un test binomial sur la condition de référence. Ce test binomial avec une probabilité de succès $p = 0,5$ appliqué à la condition de référence (« C1 apicaux) indique

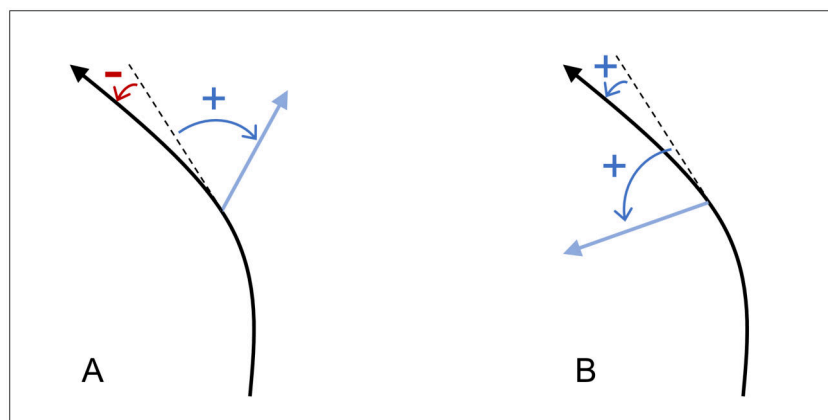


FIG. 5.9 – (A) Configuration *extrado* : l'hyphe d'exploitation est dirigée vers l'extérieur de la courbure. L'angle θ_e est négatif. (B) Configuration *intrado* : l'hyphe d'exploitation est dirigée vers l'intérieur de la courbure. L'angle θ_e est positif. On rappelle que l'angle θ_o orienté depuis le prolongement de l'hyphe mère vers l'hyphe d'exploitation définit le sens positif.

une p -value de 6.10^{-21} . La valeur étant largement inférieure à 0,05, on rejette l'hypothèse d'équiprobabilité. La probabilité de configurations *extrado* est donc considérée supérieure à celle des cas *intrado* pour la condition de référence.

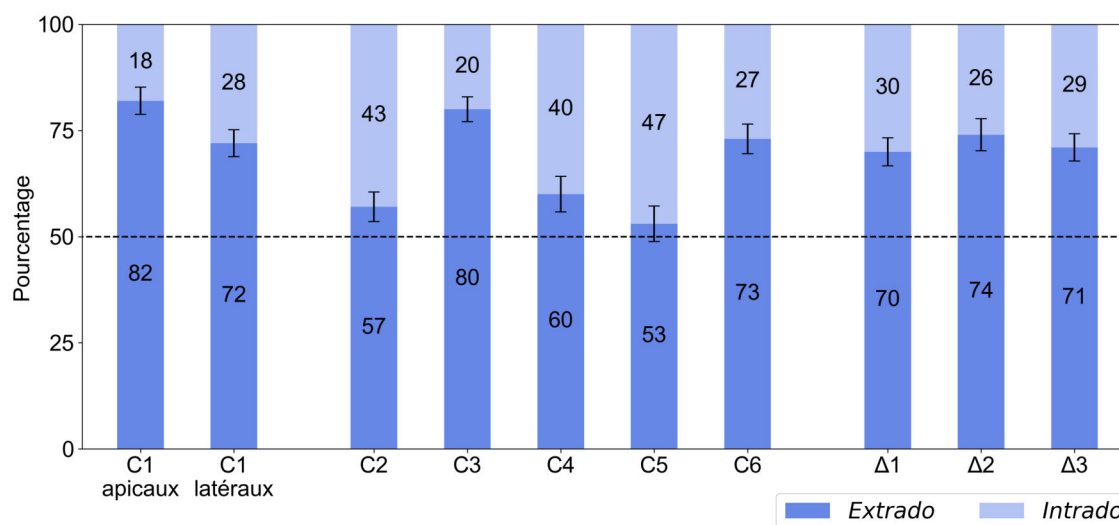


FIG. 5.10 – Pourcentage de configurations *extrado* et *intrado* pour différentes conditions (détaillées dans la légende de la figure 5.6). $N = 198$ pour chaque condition. La ligne en pointillé représente l'équiprobabilité.

Le test de Dunnett permet ensuite de comparer les autres conditions à la référence. Les p -values calculées par le test de Dunnett avec la correction de Bonferroni sont résumées dans le tableau 5.2. Les valeurs associées aux conditions C2, C4, C5 et Δ1 étant inférieures à 0,05, on considère que ces conditions ne sont pas comparables à la référence, et l'hypothèse d'équiprobabilité ne peut donc pas être rejetée. Toutes les autres conditions présentent une p -value supérieure à 0,05, et on considère ainsi qu'elles sont comparables à la référence. On

notera que les conditions $\Delta 1$, $\Delta 2$ et $\Delta 3$ sont toutes les trois associées à des valeurs de p -values très proches de 0,05. De ce fait, la compatibilité ou non avec la référence est discutable, et un plus grand nombre d'échantillons permettrait de distinguer les cas sans ambiguïté.

TAB. 5.2 – Configurations extrado ou intrado : p -values calculées par le test de Dunnett pour chaque condition en comparaison avec la référence.

	C1 latéral	C2	C3	C4	C5	C6	$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$
p -value	0,15	2.10^{-7}	1	5.10^{-5}	7.10^{-19}	0,27	0,03	0,62	0,06

5.2.5 Discussion

Le processus de branchement constitue un des éléments déterminants de l'architecture du réseau mycélien. Nous avons choisi d'étudier la distribution des angles de branchement de *P. anserina* par rapport au prolongement de l'hyphe mère. Deux angles ont ainsi été définis : l'angle d'exploration θ_e et l'angle d'exploitation θ_o , avec des valeurs estimées à 10° et 70° respectivement, dans le cas des branchements apicaux. Chez d'autres espèces fongiques, l'angle de branchement total, correspondant à la somme de θ_e et θ_o , a été estimé, et sa valeur est globalement proche des résultats obtenus dans notre étude. Par exemple, l'angle moyen est évalué entre 80° et 90° chez *R. solani* [131] [122], et à environ 80° chez *P. placenta* [132].

Les angles associés aux branchements latéraux ont également été analysés sur le mycélium de la souche sauvage de *P. anserina*. On constate une valeur de l'angle θ_o légèrement supérieure (environ 80°) à celle mesurée pour les branchements apicaux. Cette indication pourrait constituer un paramètre supplémentaire de différenciation entre les hyphes apicales et latérales, en complément des vitesses de croissance (voir section 4.2, p.105), ou de la position des nœuds (voir section 4.3, p.118). La notion d'angle exploratoire θ_e ne s'applique pas réellement au cas des branchements latéraux, dans la mesure où l'apex latéral émerge sur une hyphe déjà existante. La valeur de θ_e est ainsi directement liée à la courbure spontanée de l'hyphe. Dans une moindre mesure, un raisonnement similaire peut être appliqué aux branchements apicaux de *P. anserina*, qui sont plus précisément subapicaux, comme évoqué dans la section 4.1.1, p.102. On pourrait en effet considérer ces derniers comme des branchements latéraux se produisant très proches de l'apex. L'angle θ_e serait alors indépendant du processus de branchement, et dépendrait de la courbure locale de l'hyphe.

De plus, un travail similaire a été réalisé sur des images issues d'expériences sous contraintes de croissance, ou bien avec des souches mutantes de *P. anserina*. Les résultats semblent indiquer que la distribution angulaire reste globalement identique à celle observée pour la référence (la souche sauvage en conditions standards) : le mécanisme de branchement semble être conservé. Par contre, le déclenchement du branchement, qui joue également un rôle clé dans l'organisation du mycélium, peut être fortement affecté. Chez la souche mutante $\Delta pah1\Delta pah5$ par exemple, la fréquence des branchements est par exemple très fortement augmentée par rapport à la souche sauvage (figure 5.5). Une analyse complémentaire intéressante consisterait à évaluer l'impact de la fréquence des nœuds sur l'efficacité d'exploration du réseau, à la manière du travail effectué

sur les distributions angulaires grâce à une simulation du réseau (voir ci-dessous).

Les mesures d'angles réalisées sur les images expérimentales ont été confrontées à un travail s'appuyant sur une modélisation du réseau de *P. anserina* sous la forme d'un arbre binaire. L'avantage de la simulation réside dans la liberté d'explorer de larges gammes de valeurs pour les paramètres. Il a ainsi été montré que les valeurs mesurées sur les images génèrent un réseau pour lequel la surface de recouvrement entre les hyphes est minimale. Cette organisation du réseau favorise une exploration et une exploitation optimales de l'environnement par les hyphes en croissance.

Par ailleurs, quelle que soit la condition de croissance, nous avons estimé à partir des mesures que l'angle d'exploitation θ_o n'est pas orienté préférentiellement dans un sens de rotation (horaire ou antihoraire). Une conclusion similaire peut être déduite de l'étude des trois souches mutantes.

Enfin, nous avons cherché à déterminer si les branches d'exploitation s'orientent plus favorablement vers l'extérieur ou vers l'intérieur de la courbure de l'hyphe. Les résultats diffèrent en fonction de la condition étudiée. Pour la souche sauvage en conditions de culture standards, le branchement subapical se produit majoritairement à l'extrado de la courbure de l'hyphe principale. Cette configuration pourrait favoriser l'exploration du milieu vers des régions qui ne sont pas encore colonisées, contrairement au cas intrado, où la branche émergente sera plutôt dirigée vers le centre du mycélium.

Les mesures des angles ont été réalisées sur un grand nombre de branchements (environ 200) et sur trois réplicats indépendants pour toutes les conditions, afin de pouvoir effectuer des estimations fiables. Ce travail repose cependant sur une sélection manuelle des branchements, qui peut éventuellement induire un biais dans le choix des nœuds considérés. Les relevés de coordonnées de points, à partir desquels sont calculés les angles, sont par ailleurs à l'origine d'une erreur de mesure non négligeable sur la valeur de l'angle de branchement. Enfin, l'opérateur s'appuie sur l'utilisation d'un cercle de rayon fixe, dont la valeur de cinq diamètres d'hyphe peut être discutée. Le choix de cette valeur résulte de la prise en compte simultanée de la réduction de l'incertitude de mesure et de l'intérêt que présente un petit rayon, permettant de réduire la sensibilité aux oscillations naturelles de croissance de l'hyphe (erreur systématique). L'incertitude associée à la mesure de l'angle est quant à elle minimisée par une haute valeur du rayon du cercle (erreur aléatoire, voir figure 5.3). Nous avons effectué des mesures d'angles à l'aide d'un cercle de rayon deux fois supérieur (10 diamètres d'hyphes), et n'avons pas constaté de variations significatives des résultats présentés dans cette section.

5.3 Densité des apex

Un deuxième travail s'appuyant sur la confrontation entre la simulation du réseau fongique et les observations expérimentales est présenté dans cette section. On s'intéresse ici à l'évolution de la densité du mycélium, en considérant le nombre d'apex ainsi que la surface occupée par le thalle.

5.3.1 Introduction

Le réseau mycélien se complexifie au cours du temps en combinant deux processus : la croissance de chaque hyphe au niveau de son extrémité, et le branchement des hyphes. Ces deux processus assurent un accès efficace aux ressources nutritives, indispensables à la survie de l'organisme. Comme mentionné précédemment (voir section 4.1.1, p.102), il existe deux types de branchement chez *P. anserina* : les branchements apicaux qui se produisent au niveau de l'extrémité de l'hyphe, et les branchements latéraux qui interviennent le long de celle-ci. Se pose alors la question du rôle de ce deuxième type de branchement, qui nécessite une réorganisation de la répartition des ressources au sein du mycélium en comparaison avec les branchements apicaux, qui concentrent l'activité uniquement à l'extrémité des hyphes. Le maintien de l'existence des branches latérales suite aux multiples sélections évolutives suggère qu'elles présentent un intérêt dans la dynamique du réseau. L'étude menée ci-après a permis de proposer des avantages liés à chacun des deux types de branchement respectivement. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la densité des apex, étudiée dans le cadre de la simulation du réseau d'une part, et avec les observations expérimentales d'autre part. L'observable de la densité présente l'avantage de prendre en compte à la fois la quantité et la distribution spatiale de la matière.

La première partie de l'analyse concernant la simulation s'appuie sur le modèle basé sur un arbre binaire, décrit dans la section précédente 5.2, p.151. Ce modèle a été ajusté en implémentant les observations expérimentales concernant les branchements apicaux et latéraux. À partir de la modélisation, il est possible de prédire une évolution de la densité en trois phases distinctes, avec un minimum atteint lors de la deuxième phase. D'autre part, ce comportement est également retrouvé sur la densité expérimentale, issue d'un mycélium en croissance sur un milieu riche M2 et sur un milieu pauvre M0 respectivement.

Simulation

Le premier modèle utilisé pour l'étude des angles de branchement (voir section 5.2.2, p.152) est ajusté de manière à rendre compte plus fidèlement de la dynamique de croissance du mycélium de *P. anserina*, tout en implémentant un faible nombre de paramètres et de lois de probabilité. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des descriptions statistiques des branchements permettant de caractériser leur répartition spatiale et temporelle (voir sections 4, p.101 et 5.2, p.151). Les observations prises en compte pour l'ajustement sont les suivantes :

- La répartition des branchements apicaux est décrite par une région de dominance apicale sans branchement, suivie d'une loi sans mémoire (voir section 4.3.2, p.120).

- Les branchements latéraux se produisent à une certaine distance minimale de l'apex de l'hyphe mère, supérieure à la distance de dominance apicale. Il est donc possible de les distinguer des branchements apicaux par le biais de cette mesure.
- Deux branches latérales successives émergent généralement proches l'une de l'autre (voir section 4.3.3, p.124).
- La courbure spontanée de l'hyphe est estimée par sa tortuosité.
- Les mesures expérimentales des angles de branchement en conditions standards indiquent que l'orientation des branches d'exploitation (branchement apical) et des branches latérales dans le sens horaire ou antihoraire est compatible avec l'hypothèse d'équiprobabilité, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de rotation globale du thalle (voir section 5.2.3, p.175).
- En conditions standards, les branches d'exploitation et les branches latérales émergent majoritairement à l'extérieur de la courbure locale de l'hyphe mère, c'est-à-dire que celle-ci pilote l'orientation des deux types de branches (voir section 5.2.4, p.176).

On introduit ensuite la densité, définie comme le ratio entre le nombre d'apex A et la surface générée par la distribution spatiale de ceux-ci. On choisit de déterminer cette surface par le produit des racines des valeurs propres de la matrice des localisations des apex (r_1 et r_2), dont l'évolution peut être considérée comme linéaire sur l'intervalle de temps étudié (typiquement 20 h). On estime alors que $r_i(t) = B_i t$, et la densité s'exprime comme $\rho(t) = \frac{A(t)}{r_1(t)r_2(t)}$. Par ailleurs, le nombre d'apex A évolue de manière exponentielle et peut s'écrire sous la forme $A(t) = C 2^{\omega t}$ (voir section 3, p.73). Finalement, la densité s'exprime comme : $\rho(t) = D \frac{2^{\omega t}}{t^2}$, avec $D = \frac{C}{B_1 B_2}$.

Étant donné que le nombre d'apex évolue de manière exponentielle, et la surface de manière linéaire, il est attendu que la densité diverge lorsque le temps s'approche de 0 ou tend vers de grandes valeurs. Ainsi, l'évolution de la densité présentera un minimum, atteint à un temps t_{\min} (environ 6 heures), qui définit plusieurs phases de croissance. On peut suggérer que la première phase, pour laquelle la densité diminue, est caractérisée par l'exploration, en favorisant la colonisation de l'environnement. Lors de la deuxième phase pour laquelle t_{\min} est atteint, la densité est stable. Cette phase de transition provient de l'émergence des premiers branchements latéraux, qui modifient la répartition de la masse au sein du mycélium. Enfin, la densité augmente lors de la troisième phase, pour laquelle l'exploitation de l'environnement devient importante, c'est-à-dire l'absorption des ressources et la densification de présence des hyphes sur la surface.

Observations expérimentales

La deuxième partie de l'étude est une approche expérimentale, pour laquelle la densité des apex est analysée pour un mycélium issu d'une culture sur milieu riche M2 d'une part, et sur milieu pauvre M0 d'autre part (voir section 2.2.3, p.67). La densité est définie de la même manière que pour la simulation, et son évolution est suivie pour trois réplicats dans chacune des deux conditions de culture. Les courbes de densité expérimentale présentent une allure similaire à celle extraite à l'aide du modèle : la densité diminue, puis atteint un minimum au

temps t_{\min} , avant de croître. On peut par ailleurs mettre en évidence que la première phase de décroissance correspond à la durée pendant laquelle aucun branchement latéraux ne s'est produit sur le mycélium initial, comme évoqué précédemment. Cette durée peut être estimée en s'appuyant sur la distance minimale séparant l'apex du nœud latéral, ainsi que sur la vitesse de croissance des hyphes.

En s'appuyant sur l'évolution du nombre d'apex et de la surface (définie par le produit des racines des valeurs propres) respectivement, il est par ailleurs possible de prédire que la valeur de $t_{\min} = \frac{2}{\omega \log(2)}$ dépend uniquement du taux de croissance, et donc des conditions de culture. Les observations expérimentales sont en accord avec cette relation, dans la mesure où les courbes de densité mettent en évidence un retard du minimum dans le cas de la condition sur milieu pauvre M0 (environ 8 heures) par rapport à la condition sur milieu riche M2 (environ 6 heures).

5.3.2 Article

L'article intitulé « Prediction and experimental evidence of different growth phases of the *Podospora anserina* hyphal network » disponible ci-dessous sera soumis au journal au journal Scientific Reports. Les auteurs de cet article sont : Clara Ledoux, Florence Chapeland-Leclerc, Gwenaël Ruprich-Robert, Cécilia Bobée, Christophe Lalanne, Éric Herbert et Pascal David.

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Élément sous droit, diffusion non autorisée

Chapitre 6

Observation des hyphes en fluorescence

6.1	Introduction	199
6.1.1	Principe de la fluorescence	200
6.1.2	Dispositif expérimental en fluorescence	200
6.1.3	Incertitudes de mesure	201
6.2	Septa	201
6.2.1	Introduction	201
6.2.2	Marquage fluorescent des septa et procédure de mesure	204
6.2.3	Article apical	205
6.2.4	Distances entre les septa	205
6.2.5	Discussion	208
6.3	Noyaux	210
6.3.1	Introduction	210
6.3.2	Marquage fluorescent des noyaux et mesures	211
6.3.3	Zone d'exclusion des noyaux	211
6.3.4	Répartition des noyaux à un point de branchement	213
6.3.5	Discussion	214
6.4	Spitzenkörper	216
6.4.1	Marquage fluorescent du Spitzenkörper	216
6.4.2	Intensité de fluorescence et vitesse de croissance	216
6.4.3	Discussion	218
6.5	Conclusion	219

6.1 Introduction

Dans ce dernier chapitre, l'analyse du mycélium est menée à l'échelle intracellulaire, par observation en microscopie de fluorescence. En particulier, trois structures intracellulaires ont été considérées : les septa, les noyaux, et le Spitzenkörper (SPK). Ces structures, ainsi que la méthode de marquage fluorescent correspondant, seront présentées par la suite dans des parties spécifiques à chacune d'entre elles. Le dispositif expérimental en fluorescence a été mis

au point au cours de cette thèse (voir section 2.4, p.70). Quelques analyses dynamiques ont pu être réalisées grâce à ce dispositif, notamment en lien avec le processus de branchement des hyphes. Ces résultats préliminaires ainsi que d'éventuelles perspectives seront évoqués dans cette section.

6.1.1 Principe de la fluorescence

La méthode de fluorescence employée ici repose sur le marquage d'éléments cellulaires non fluorescents par des molécules capables de fluorescer : les fluorophores. L'objectif est d'observer la répartition et la dynamique des structures marquées au sein de l'hyphe. Par exemple, la protéine fluorescente verte (ou GFP pour « Green Fluorescent Protein ») issue de la méduse *Aequorea victoria* fait partie des fluorophores les plus utilisés en microscopie [197]. Généralement, le gène codant la protéine fluorescente est fusionné au gène de la protéine d'intérêt, de telle sorte que la protéine de fusion synthétisée par la cellule sera fluorescente. Des colorants fluorescents, généralement moins spécifiques, peuvent par ailleurs être directement employés pour marquer des structures cellulaires *in vivo* [198]. Parmi ces colorants, les exemples du Calcofluor-white et du FM 4-64 seront évoqués au cours de ce chapitre (voir sections 6.2.2, p.204 et 6.4.1, p.216).

Le fluorophore est choisi principalement en fonction de son rendement quantique, c'est-à-dire le ratio entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par la molécule fluorescente [197]. En cas de co-marquage, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de chaque fluorophore sont également prises en compte afin de limiter les recouvrements entre les spectres. De plus, la durée d'exposition au rayonnement d'excitation doit être réduite au maximum dans le but d'éviter la phototoxicité et le photoblanchiment, c'est-à-dire la perte de la fluorescence progressive en répercussion de l'excitation prolongée du fluorophore. Le photoblanchiment est particulièrement sensible lors du suivi de structures cellulaires en dynamique [198]. Enfin, la concentration des colorants fluorescents est choisie la plus faible possible, afin de limiter la cytotoxicité, tout en conservant une intensité de fluorescence suffisante à la détection des structures marquées [199].

6.1.2 Dispositif expérimental en fluorescence

Contrairement au dispositif d'acquisition en lumière blanche, conçu pour enregistrer des images du mycélium complet sur une durée de 20 heures de croissance, l'observation en fluorescence ne se prête pas à l'acquisition d'images avec de telles dimensions et sur de longues durées. Comme évoqué précédemment, les fluorophores sont en effet sujets au photoblanchiment, et l'utilisation renouvelée de colorants sur le mycélium peut engendrer une cytotoxicité croissante au cours du temps. Ainsi, l'observation en fluorescence sera localisée sur des régions du mycélium précisément choisies, à l'aide d'objectifs avec un grossissement $\times 10$ ou $\times 63$. On notera que le déplacement automatisé de l'échantillon sous l'objectif permet d'agrandir la surface de mycélium observée, et les images individuelles (généralement quatre) peuvent ensuite être assemblées. La durée d'acquisition entre deux images successives est généralement de 15 ou 30 secondes.

De la même manière que pour les expériences en champ clair, les hyphes sont guidées en

deux dimensions du fait de la présence d'une membrane de cellophane recouvrant le milieu de culture solide. Bien que celle-ci autofluoresce légèrement, notamment en présence de longueurs d'onde dans le domaine des UV et du bleu, les structures visées dans nos expériences restent clairement visibles. La membrane permet de conserver la mise au point sur les hyphes tout au long de l'acquisition, dans la mesure où celles-ci restent à la surface de la feuille de cellophane. De plus, afin d'éviter le dessèchement du milieu, et donc la perte de la mise au point, un couvercle entourant l'objectif du microscope recouvre l'échantillon. Sauf mention contraire, les expériences sont menées en conditions de culture standards. Le dispositif d'observation en fluorescence est décrit en détail dans la section 2.4, p.70.

6.1.3 Incertitudes de mesure

L'observation du mycélium de *P. anserina* en fluorescence donne accès au diamètre réel des hyphes. En effet, sur les images acquises avec notre dispositif en lumière blanche, le diamètre des hyphes apparent, évalué à $10\ \mu\text{m}$, est surestimé du fait de la diffusion du faisceau lumineux incident. La valeur réelle est mesurée comme étant deux fois plus faible sur les images en fluorescence. Les diamètres des hyphes apicales et latérales ne sont pas trouvés significativement différents, avec des valeurs de $4,9 \pm 0,4$ et $4,3 \pm 0,5\ \mu\text{m}$ respectivement ($N = 50$ pour chacune des catégories).

Les incertitudes de mesure sur les images acquises en fluorescence sont construites de manière identique à celles utilisées en lumière blanche. Dans toute cette section, nous utiliserons les incertitudes suivantes :

- L'incertitude sur le temps σ_t correspond à la durée nécessaire pour réaliser l'acquisition des images individuelles à assembler (généralement quatre images), soit $\sigma_t = 1\ \text{s}$.
- L'incertitude sur les longueurs mesurées sur les images est estimée à un demi-diamètre d'hyphe, soit $\sigma_L = 3\ \mu\text{m}$.

6.2 Septa

6.2.1 Introduction

Rôle des septa

Présents chez de nombreux ascomycètes et basidiomycètes, les septa sont des cloisons de paroi qui séparent l'hyphe en compartiments, ou articles, qui restent connectés entre eux généralement grâce à un pore septal central laissant passer les macromolécules et les organites [57] [71]. Les septa ne sont pas essentiels à la croissance puisque certains champignons n'en possèdent pas [200]. Chez *N. crassa*, les septa sont principalement constitués de chitine, et leur composition n'est pas tout à fait identique à celle de la paroi latérale de l'hyphe [98] [97] (voir section 1.2.5, p.31). La septation des hyphes peut être mise en parallèle avec la cytotérière chez les levures, mais le processus s'interrompt néanmoins à une compartimentation et non à une séparation

des cellules. De plus, à l'inverse des levures unicellulaires, toutes les divisions des cellules ne sont pas systématiquement accompagnées d'une septation chez les champignons filamenteux, qui peuvent alors posséder plusieurs noyaux par article [200] [97] [201].

Les septa ont été décrits comme favorisant la rigidification de l'hyphe en fournissant un support structural supplémentaire, afin de davantage résister à la pression de turgescence. Par ailleurs, les pores des cloisons peuvent être obstrués afin de limiter les fuites de cytoplasme en cas de lésion localisée. Par ailleurs, les cloisons étanches permettent d'instaurer une hétérogénéité et la différenciation cellulaire au sein du mycélium en contrôlant le flux de cytoplasme [71] [97] [57] [201].

Formation des septa

Chez *N. crassa*, la formation d'un septum requiert tout d'abord le recrutement des protéines BUD-3 et BUD-4, des marqueurs du site de septation, la formine BNI-1 (polymérisation de l'actine F), et la GTPase RHO-4. Le septum commence ensuite à apparaître de manière diffuse, comme un enchevêtrement de filaments d'actine, en présence de la myosine 2 (voir section 1.2.4, p. 25). Les filaments condensés finissent par former le « contractile actomyosin ring » (CAR), une structure complexe composée d'un squelette d'actine en anneau et de protéines ancrées, notamment des myosines et des formines. Enfin, le CAR se rétrécit, et génère la force de contraction guidant le développement de la paroi et de la membrane du septum, avant de disparaître (figure 6.1) [200] [97] [201] [63].

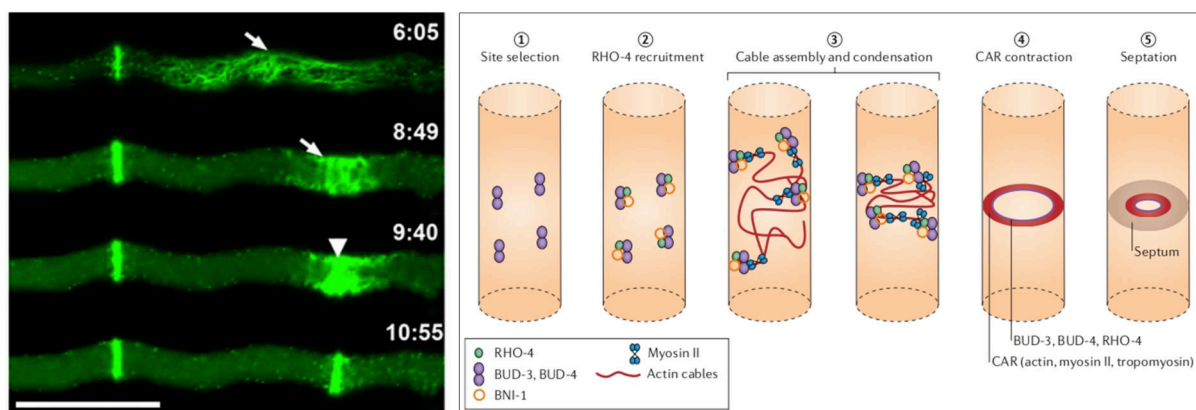


FIG. 6.1 – À gauche, exemple de formation d'un septum chez *N. crassa*. Les câbles d'actine (flèches) coalescent pour former le CAR (tête de flèche), puis le septum (barre d'échelle : 10 μ m) (adapté de [200]). À droite, schématisation des étapes de formation d'un septum [63].

Influence des septa sur l'écoulement cytoplasmique

Chez les champignons filamenteux, l'écoulement cytoplasmique au sein de l'hyphe peut être perturbé par la présence des septa. Les pores ayant un diamètre compris entre 50 et 500 nm [56], ils constituent un réel rétrécissement du tube d'écoulement du cytoplasme, généralement d'un facteur 10 à 100. La conservation du volume implique que la vitesse du flux augmente

drastiquement lors du passage du pore. Des vitesses très élevées allant jusqu'à plus de $200 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ont pu être mesurées chez *N. crassa* au niveau du septum (figure 6.2) [202].

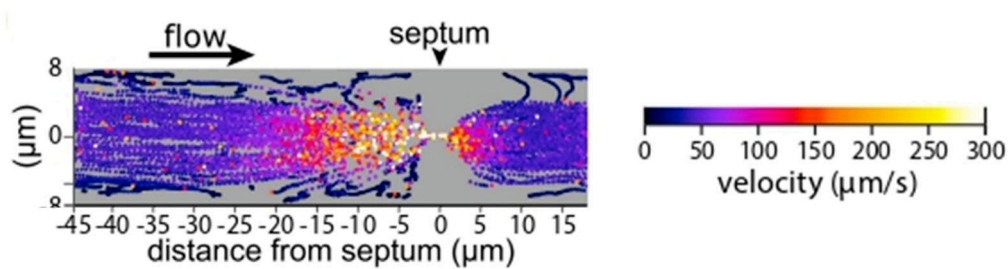


FIG. 6.2 – Chez *N. crassa*, la vitesse du flux cytoplasmique est drastiquement augmentée lors du passage du pore d'un septum. De plus, le flux pré et post-septum est asymétrique : la vitesse diminue beaucoup plus rapidement après passage du septum qu'en amont (adapté de [202]).

Obstruction des pores septaux

Contrairement à la morphologie des levures où chaque cellule est isolée, l'ensemble du mycélium peut être affecté en cas de lésion sur une hyphe. Les champignons filamenteux ont développé un mécanisme de protection leur permettant d'obstruer les pores des septa à l'aide de structures spécifiques et très diversifiées en fonction de l'espèce [97] [57].

En 1864, Voronine remarque la présence de corps capables de boucher les pores chez certains champignons filamenteux ascomycètes [203]. On nommera par la suite « corps de Voronine » ces organites spécialisés présents chez les ascomycètes, généralement ancrés directement au niveau du pore septal et pouvant se déplacer afin d'obstruer totalement ce dernier de manière réversible (figure 6.3). Ces organites sphériques, hexagonaux ou rectangulaires sont au nombre de trois à six autour du pore. Suite à l'obstruction des pores en quelques secondes, des matériaux de paroi peuvent être ajoutés entre 30 minutes à 3 heures plus tard, afin de consolider la fermeture septale [57] [108] [71] [204]. De plus, chez *N. crassa* et *A. nidulans*, le diamètre du pore peut être régulé par des protéines associées aux septa, les « septal associated proteins » (SPA), qui forment des agrégats au niveau de l'ouverture du septum (figure 6.3) [73] [56].

Chez *N. crassa*, il a été observé que les corps de Voronine sont ancrés non pas au niveau du septum, mais légèrement plus loin sur la paroi latérale de l'hyphe (figure 6.3). Cette particularité pourrait s'expliquer par le fait que des corps de Voronine plus éloignés des pores seraient moins susceptibles de les obstruer accidentellement, notamment en présence d'un flux cytoplasmique élevé chez les espèces à croissance rapide comme *N. crassa* [71] [205] [73].

Chez les basidiomycètes, on observe souvent des septa à dolipore, c'est-à-dire avec des cloisons enflées autour du pore (figure 6.3). Le processus d'obstruction des dolipores s'effectue grâce aux coiffes des pores septaux, les « septal pore caps » (SPC) [34] [71] [73].

Si l'obstruction des pores septaux est très efficace pour protéger le reste de l'organisme en cas de lésions sur une hyphe, il a été montré que les pores peuvent être également être obstrués au sein d'hyphe intactes. Par exemple, chez les espèces appartenant au genre *Aspergillus*, les septa au centre du mycélium sont davantage fermés que ceux à la périphérie au sein d'un mycélium sain. Cette limitation de la continuité cytoplasmique induit notamment une hétérogénéité en

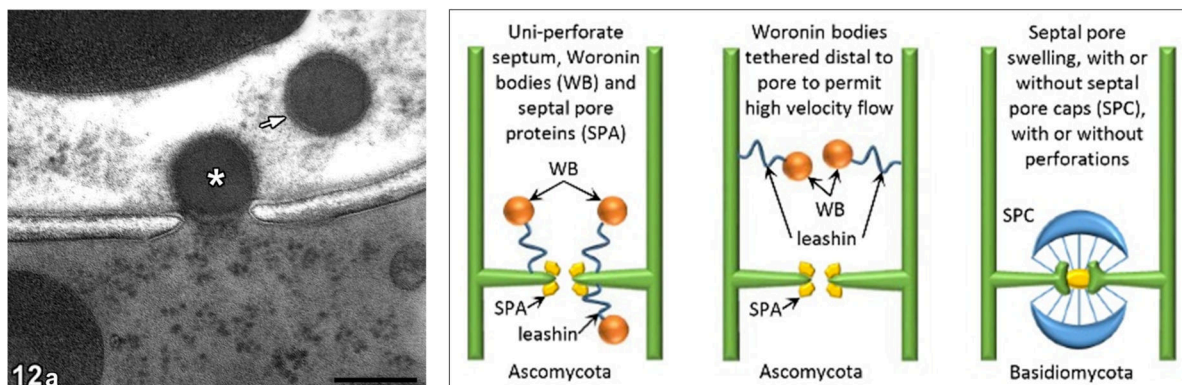


FIG. 6.3 – À gauche, image d'un pore septal obstrué par un corps de Voronine chez l'ascomycète *Fusarium verticillioides* (microscopie électronique en transmission, barre d'échelle : 300 nm) [34]. À droite, schémas des principaux systèmes d'obstruction des pores chez les ascomycètes et les basidiomycètes (adapté de [73]). Voir le texte pour les détails.

termes d'expression des gènes : certaines hyphes présentent une haute activité de transcription et de traduction, alors que d'autres ont une activité plus réduite. Ces observations reflètent l'activité de croissance des hyphes sur le front de croissance, plus actives que celles au centre du mycélium [206] [71] [84].

6.2.2 Marquage fluorescent des septa et procédure de mesure

Les septa des hyphes de *P. anserina* sont marqués à l'aide du colorant fluorescent Calcofluor-white (CFW), très largement utilisé pour marquer les parois des levures et des champignons filamenteux [198]. Le CFW est excité par un rayonnement dans le spectre des UV, et émet dans les longueurs d'onde du bleu (voir section 2.4, p.70). Les molécules de CFW s'intercalent dans les chaînes de chitine en formation, et se retrouvent ainsi liées à la paroi des hyphes et aux septa, principalement constitués de chitine. Il a été montré qu'utilisé à de faibles concentrations, typiquement inférieures à 15 μM , le CFW n'altère pas la croissance des cellules [207].

Si les septa sont clairement repérables sur les images en fluorescence ainsi obtenues, l'hyphé est également entièrement visible puisque le CFW marque la paroi cellulaire. Les mesures de distance associées aux septa sont effectuées directement sur les images à l'aide du logiciel ImageJ. Les souches utilisées dans les expériences sont la souche sauvage de *P. anserina*, ainsi que les trois souches mutantes $\Delta\text{pah1}\Delta\text{pah5}$, Δkef1 , et $\Delta\text{PaMpk1}\Delta\text{PaMpk2}\Delta\text{PaMpk3}$ présentées dans les sections 2.4, p.70, et 5.2, p.151. Les cultures sont menées en conditions standards. On notera que chez *P. anserina* comme chez *N. crassa*, les septa sont formés les uns après les autres le long de l'hyphé, dans la direction de croissance. Chez d'autres espèces, l'apparition des cloisons peut être désordonnée, à l'exemple des hyphes d'*Aspergillus fumigatus*, pour lesquelles un septum peut se former entre deux septa déjà existants [199].

6.2.3 Article apical

On s'intéresse tout d'abord à la longueur $\ell_{s,apex}$, séparant l'apex et le septum le plus proche. Cette mesure est effectuée au moment où le septum apparaît. La période d'acquisition des images de 30 secondes permet d'identifier l'instant d'apparition du septum avec précision. Par ailleurs, on associe à chaque $\ell_{s,apex}$ la longueur de l'hyphe ℓ_{tot} , mesurée entre l'apex et un point de repère commun fixé arbitrairement le long de l'hyphe (figure 6.4).

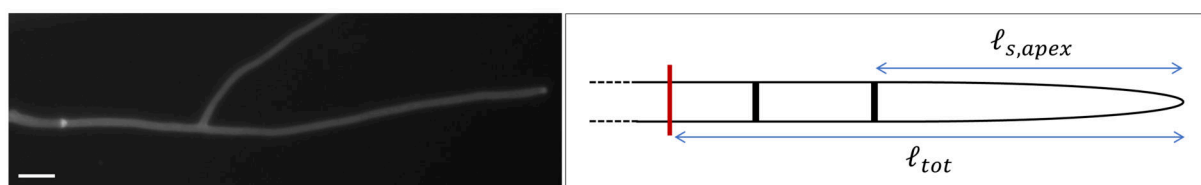


FIG. 6.4 – À gauche, image typique du premier septum dans la région apicale sur une hyphe de *P. anserina* marquée au CFW (barre d'échelle : 20 μm). À droite, définition de la longueur $\ell_{s,apex}$ séparant l'apex du plus proche septum au moment de son apparition (compartiment apical). La longueur ℓ_{tot} entre le point de repère (rouge) et l'apex est également relevée.

La longueur $\ell_{s,apex}$ est représentée en fonction de ℓ_{tot} sur la figure 6.5. La distribution des points met en évidence l'existence d'une longueur minimale du compartiment apical, d'environ 100 μm .

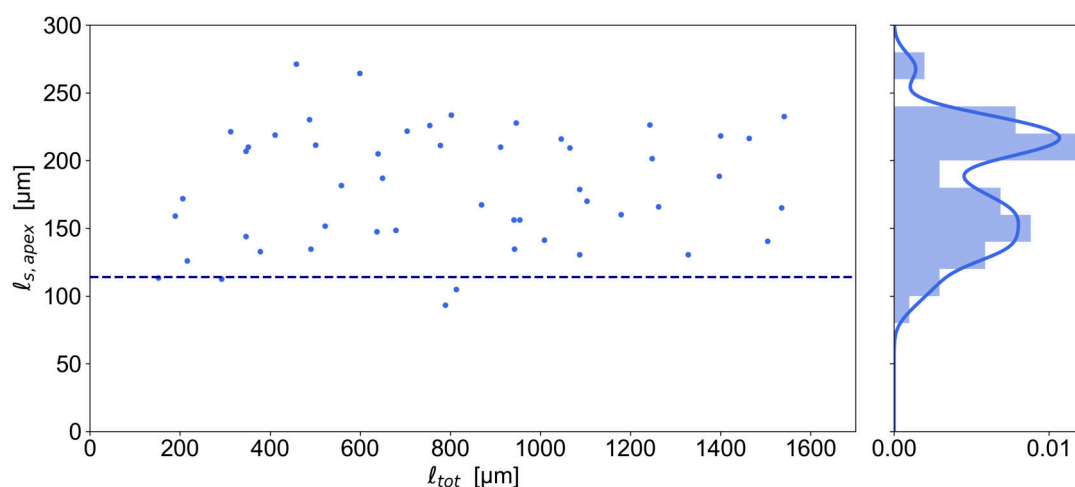


FIG. 6.5 – Longueur $\ell_{s,apex}$ en fonction de ℓ_{tot} . Les barres d'erreur sont inférieures à la taille des marqueurs. La droite en pointillé ($y = 110 \mu\text{m}$) est placée de telle sorte que 95% des points soient situés au-dessus de la ligne ($N = 51$). La distribution des longueurs $\ell_{s,apex}$ est représentée verticalement à droite (bins : 20 μm), et la ligne indique la densité de probabilité.

6.2.4 Distances entre les septa

On considère ici la distance ℓ_s entre deux septa (figure 6.6). Les relevés sont effectués d'une part sur des images du mycélium de la souche sauvage de *P. anserina*, cultivée sur milieu riche M2 et sur milieu pauvre M0, et d'autre part sur des images des souches mutantes $\Delta pah1\Delta pah5$, $\Delta kef1$, et $\Delta PaMpk1\Delta PaMpk2\Delta PaMpk3$, en croissance sur milieu riche M2 (voir section 2.2.3, p. 67).

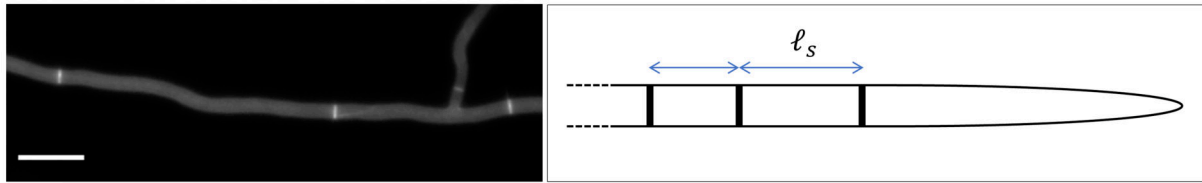


FIG. 6.6 – À gauche, visualisation des septa répartis sur une hyphe de *P. anserina* (souche sauvage) marquée au CFW (barre d'échelle : 20 μm). À droite, définition de la longueur ℓ_s séparant deux septa.

Par ailleurs, les longueurs ℓ_{api} entre les nœuds apicaux (voir section 4.3.2, p.120) sont également mesurées pour toutes les souches. Les distributions des longueurs ℓ_{api} et ℓ_s sont ensuite analysées en suivant une procédure à celle détaillée dans la section 4.3.2, p.120 : les fonctions de répartition associées sont ajustées à l'aide d'une loi sans mémoire :

$$f(\ell) = 1 - \exp(-\alpha(\ell - L_0))$$

avec $\ell = \ell_{api}$ ou ℓ_s , et L_0 la valeur de décalage des points en abscisse, représentant une région initiale d'interdiction de nucléation (septa ou branchements). Un exemple d'ajustement pour la fonction de répartition des nœuds et pour celle des septa est présenté sur la figure 6.7 pour la souche sauvage sur milieu riche M2. Un travail identique est réalisé pour la condition sur milieu pauvre ainsi que pour les trois souches mutantes (milieu M2).

Pour chaque condition, on cherche à quantifier la distance entre les nœuds ou entre les septa d'une manière représentative. Il convient pour cela de tenir compte des deux régions où la nucléation (de branchements ou de septa) suit successivement une loi d'interdiction puis une loi sans mémoire. On construit alors la grandeur $L_{1/2}$ qui combine L_0 et α , définie comme $L_{1/2} = L_0 + \ell_{1/2}$, avec $f(\ell_{1/2}) = 0,5$. Toutes les valeurs sont synthétisées dans le tableau 6.1.

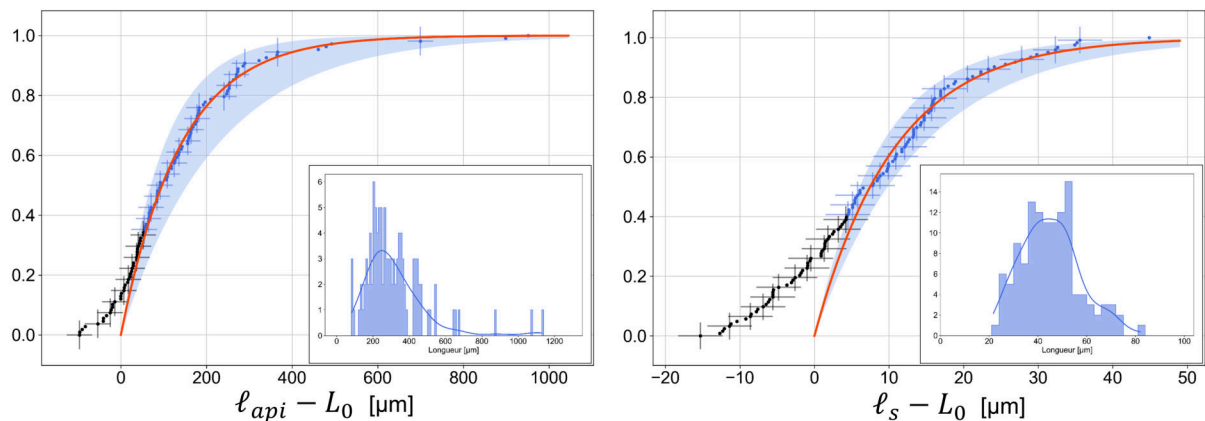


FIG. 6.7 – À gauche, fonction de répartition associée à la distribution des longueurs entre les nœuds ℓ_{api} , et à droite, des longueurs entre les septa ℓ_s . Les histogrammes lissés des longueurs sont indiqués dans les encarts. Les points noirs sont exclus de l'ajustement, les points bleus sont conservés. Les points expérimentaux sont décalés de L_0 , puis ajustés avec la fonction $f(\ell) = 1 - \exp(-\alpha(\ell - L_0))$ représentée par la ligne rouge. La surface bleue autour de l'ajustement représente un écart-type.

TAB. 6.1 – Paramètres des ajustements des fonctions de répartition $f(\ell) = 1 - \exp(-\alpha(\ell - L_0))$, pour les N longueurs entre les nœuds ℓ_{api} et entre les septa ℓ_s . $L_{1/2} = L_0 + \ell_{1/2}$, avec $f(\ell_{1/2}) = 0,5$. S/M2 ou S/M0 : souche sauvage sur milieu riche M2 ou pauvre M0; $\Delta 1$: souche $\Delta pah1\Delta pah5$; $\Delta 2$: souche $\Delta kef1$; $\Delta 3$: souche $\Delta PaMpk1\Delta PaMpk2\Delta PaMpk3$ sur milieu riche M2.

		N	R^2	L_0 [μm]	α [mm^{-1}]	$L_{1/2}$ [μm]
Nœuds (ℓ_{api})	S/M2	109	0,99	180 ± 30	$7,2 \pm 2,1$	276 ± 40
	S/M0	86	0,98	190 ± 30	$7,7 \pm 3,4$	280 ± 46
	$\Delta 1$ /M2	222	0,99	38 ± 3	$46 \pm 4,0$	53 ± 3
	$\Delta 2$ /M2	97	0,99	180 ± 30	$14 \pm 8,1$	240 ± 41
	$\Delta 3$ /M2	108	0,98	80 ± 15	$6,1 \pm 2,6$	194 ± 40
Septa (ℓ_s)	S/M2	124	0,97	37 ± 3	93 ± 22	44 ± 3
	S/M0	131	0,98	39 ± 3	88 ± 19	47 ± 3
	$\Delta 1$ /M2	72	0,94	23 ± 2	81 ± 20	32 ± 3
	$\Delta 2$ /M2	105	0,99	32 ± 3	94 ± 28	39 ± 4
	$\Delta 3$ /M2	95	0,95	37 ± 3	56 ± 12	49 ± 4

Les paramètres L_0 et α caractérisent la dynamique de branchement ou de septation, puisque L_0 décrit la loi d'interdiction, et α la fréquence d'apparition des branches ou des septa (suivant une loi sans mémoire). Tout d'abord, en étudiant ces paramètres pour la distribution des nœuds, on remarque que la condition de la souche mutante $\Delta pah1\Delta pah5$, notée $\Delta 1$ dans le tableau 6.1, n'est pas compatible avec la référence (S/M2). De fait, la valeur d'interdiction de L_0 est très faible par rapport à la référence, alors que la valeur de α est très supérieure, indiquant une fréquence de branchement augmentée. On notera que la valeur de L_0 est également non compatible avec la référence pour la souche $\Delta PaMpk1\Delta PaMpk2\Delta PaMpk3$ ($\Delta 3$). En revanche, en considérant le paramètre $L_{1/2}$, seule la condition $\Delta 1$ est significativement inférieure à la référence.

En nous intéressant ensuite aux septa, on constate que le paramètre L_0 de la condition $\Delta 1$ n'est pas compatible avec la référence, alors que la valeur de α est compatible. De même que pour les nœuds, le paramètre $L_{1/2}$ est significativement inférieur à la référence uniquement pour la condition $\Delta 1$. Ainsi, il semblerait qu'une dynamique de branchement réduite soit liée à une faible activité de septation dans le cas de la souche $\Delta pah1\Delta pah5$. On peut éventuellement supposer que les distances entre les nœuds et celles entre les septa sont corrélées.

Par ailleurs, la répartition des septa proches les uns des autres pour la souche $\Delta pah1\Delta pah5$ pourrait être la conséquence de sa vitesse de croissance, plus faible que celle de la souche sauvage. En effet, nous avons estimé la vitesse d'extension des hyphes apicales de $\Delta pah1\Delta pah5$ avec la

procédure décrite dans la section 4.2.1, p.106, qui se trouve réduite d'un facteur 2 environ en comparaison de la souche sauvage ($2,147 \pm 0,005 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ ($N = 20$), et $4,594 \pm 0,007 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ ($N = 40$) respectivement). La réduction de la vitesse pourrait justifier une distance inter-septa réduite pour les hyphes de la souche $\Delta\text{pah1}\Delta\text{pah5}$. Cependant, sur un milieu de culture pauvre, la souche sauvage est également ralentie ($3,502 \pm 0,008 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$, voir section 4.3.5, p.129), mais les valeurs de $L_{1/2}$ sont néanmoins compatibles avec la référence. Il semblerait donc que la répartition particulière des septa pour la souche $\Delta\text{pah1}\Delta\text{pah5}$ soit liée non pas à la vitesse d'extension réduite des hyphes, mais à la mutation associée à cette souche, provoquant une perturbation du mécanisme régissant la répartition des septa.

6.2.5 Discussion

Ainsi, nous avons déterminé que loin d'être distribués au hasard, les septa de *P. anserina* sont localisés suivant des règles bien précises. Tout d'abord, il a été observé que le septum le plus proche de l'apex apparaît à une distance minimale d'environ $100 \mu\text{m}$ de celui-ci. Chez *N. crassa*, une organisation similaire a été décrite, avec un compartiment apical de $165 \pm 3 \mu\text{m}$ ($N = 50$) [200]. Par ailleurs, Harris [167] propose d'identifier les branchements latéraux par leur position relative aux articles septaux : les hyphes latérales sont séparées de l'apex par un ou plusieurs septa. Chez *P. anserina*, les branchements latéraux n'ont en effet jamais lieu au sein du compartiment apical, puisque la distance minimale le séparant de l'apex est de $480 \pm 50 \mu\text{m}$ (voir section 4.3.3, p.124), soit une valeur largement supérieure aux longueurs des articles apicaux mesurées ici (environ $250 \mu\text{m}$ au maximum). On notera cependant qu'en s'appuyant sur ce critère, la distinction avec les nœuds apicaux n'est pas toujours possible chez *P. anserina*, car les branchement apicaux ne se produisent pas systématiquement au sein du compartiment apical.

De plus, les septa sont formés de manière régulière le long de l'hyphe chez *P. anserina* (valeur la plus probable : $45 \mu\text{m}$, écart-type : $12 \mu\text{m}$). Le compartiment apical est ainsi généralement plus long que les articles classiques (entre deux septa). En comparaison, les longueurs des compartiments classiques ont été évaluées autour de $39 \mu\text{m}$ (écart-type : $16 \mu\text{m}$) chez *A. nidulans* [208], et de 93 ± 2 ($N = 36$) chez *N. crassa* [200].

La régularité d'apparition des septa suggère que ceux-ci sont corrélés avec le cycle cellulaire [97]. Pourtant, les facteurs de déclenchement de la formation d'un septum restent encore peu connus. Chez *A. nidulans*, la formation des septa semble clairement contrôlée par la position des noyaux et la progression du cycle cellulaire. Cette coordination est beaucoup moins claire chez des espèces proches de *P. anserina* comme *N. crassa*, où la division des noyaux est asynchrone [74] [71]. D'après nos observations des noyaux au sein des hyphes de *P. anserina* étudiés dans la section suivante 6.3, la division des noyaux semble également asynchrone.

D'autre part, il a été observé chez certaines espèces que les septa semblaient déclencher le branchement latéral (figure 6.8). L'hypothèse pouvant justifier ce phénomène repose sur l'idée que le septum constitue une barrière partielle pour les vésicules sécrétoires en circulation au sein de l'hyphe. Ces dernières s'accumuleraient alors localement, provoquant un branchement

situé juste avant la position du septum [73] [166]. Cependant, cette hypothèse ne s'applique pas à toutes les espèces : il a par exemple été observé chez *N. crassa* que les hyphes latérales tendaient plutôt à émerger au centre des articles [166]. Une organisation similaire est observée pour *P. anserina* : le déclenchement du branchement latéral ne semble pas associé directement à la position des septa (figure 6.8).

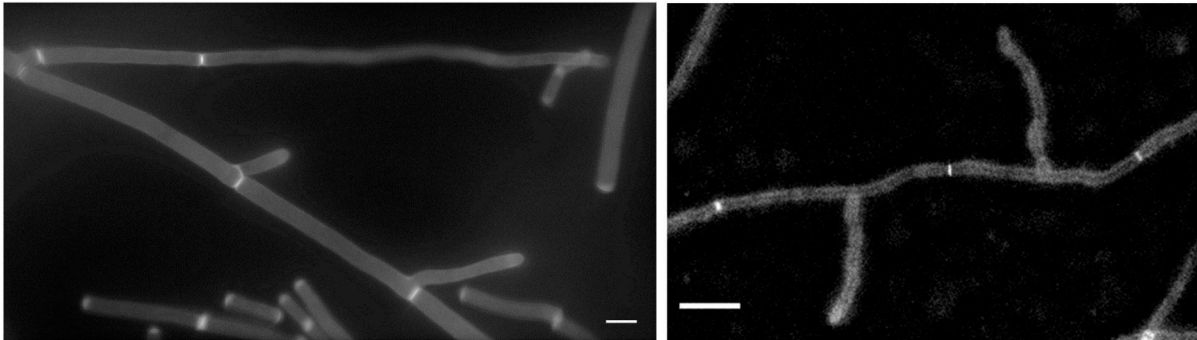


FIG. 6.8 – À gauche, hyphes de l'ascomycète *Galactomyces candidum* marquées au CFW, où les deux branches latérales sont associées aux septa (barre d'échelle : 3 µm) [166]. À droite, hyphes de *P. anserina* marquées au CFW, avec des branchements latéraux observés au centre des articles (barre d'échelle : 20 µm).

En revanche, nous avons pu envisager une corrélation entre la répartition (et non le déclenchement) des septa et celle des nœuds apicaux. Pour cela, nous avons analysé sur les hyphes de la souche sauvage de *P. anserina* et sur des souches mutantes les répartitions des nœuds apicaux d'une part, et des septa d'autre part. Seule la souche $\Delta pah1\Delta pah5$ présente à la fois des branches et des septa plus rapprochés que pour la souche sauvage. De plus, la répartition des septa ne semble pas dépendre de la vitesse de croissance, comme mentionnée par ailleurs pour *A. nidulans* [208]. En effet, chez *P. anserina*, les distributions des longueurs des articles septaux pour la souche sauvage sur milieu M2 et M0 sont similaires. Ces résultats pourraient suggérer que le processus de branchement apical et de formation des septa ne sont pas indépendants. Néanmoins, il est important de mentionner que les analyses concernent une souche mutante pour laquelle deux homéogènes ont été délétés : *pah1* et *pah5* (voir section 2.1.3, p. 63), ces derniers étant notamment impliqués dans la morphogénèse du mycélium. Ainsi, le déclenchement des branchements et l'apparition des septa ont pu être affectés indépendamment par les mutations. Dans ce cas, les particularités morphologiques constatées au niveau des nœuds apicaux et des septa ne seraient pas corrélées. De plus, dans le cas d'une corrélation, cette étude ne permet pas de déterminer si la répartition des branchements est la conséquence de celle des septa, ou inversement.

6.3 Noyaux

6.3.1 Introduction

Les noyaux sont le deuxième élément intracellulaire étudié grâce à l'approche en fluorescence. Ces organites jouent un rôle essentiel au sein de la cellule : ils renferment le matériel génétique et coordonnent de nombreuses activités cellulaires, notamment relatives au métabolisme, à la croissance et à la division cellulaire. Le noyau est le siège de la réplication, et la recombinaison et de la transcription de l'ADN [4].

La plupart des capacités de biosynthèse d'une hyphe requiert la présence d'un noyau. Leur répartition, et donc leur migration au sein du cytoplasme commun, sont ainsi indispensables au développement de l'hyphe [209] [210] [211]. Par ailleurs, cette circulation des noyaux promeut la diversité génétique au sein de l'espèce, puisque le mixage de noyaux génétiquement différents augmente la probabilité d'échange de matériel génétique [209] [212].

La migration des noyaux au sein de l'hyphe dépend de deux processus : le transport passif par le flux de cytoplasme, et le transport actif lié au cytosquelette (voir sections 1.2.3, p.24 et 1.2.4, p.25). Chez *N. crassa* et *A. nidulans*, il a été observé que si la plupart des noyaux se déplacent à la vitesse de l'apex, certains migrent momentanément plus rapidement, alors que d'autres ont des mouvements rétrogrades. Ces dynamiques peuvent s'expliquer par le transport actif impliquant des protéines motrices, qui peuvent se déplacer dans les deux directions, et atteindre des vitesses supérieures à celle de l'apex [213] [209] [212].

Le transport actif des noyaux s'effectue par l'action des dynéines et des kinésines (voir section 1.2.4, p.25) sur les microtubules. Ces derniers sont ancrés sur l'enveloppe nucléaire au niveau des « spindle pole bodies » (SPB) [210] [213] [214]. Il s'agit de « microtubule organizing centers » (MTOC) (voir section 1.2.4, p.25), jouant notamment un rôle dans la migration des chromatides sœurs lors de la mitose [4] [215]. Xiang [209] a proposé un modèle relatif aux mouvements particuliers des noyaux, pouvant se déplacer alternativement dans le sens de croissance et dans le sens contraire. Le modèle suppose que certaines dynéines sont ancrées au niveau du cortex cellulaire. Lorsque ces protéines circulent le long des microtubules tout en restant liées au cortex, elles provoquent le déplacement de ces derniers. Les microtubules entraînent avec eux les noyaux, auxquels ils sont liés au niveau du SPB (figure 6.9).

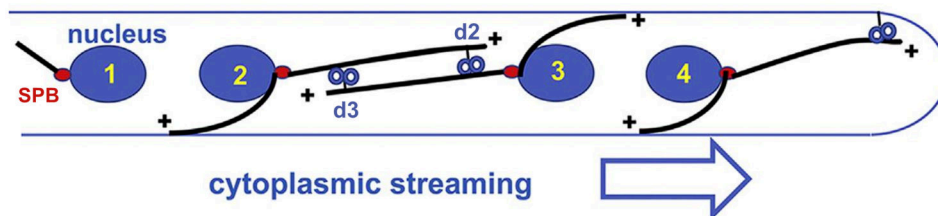


FIG. 6.9 – Les noyaux peuvent être tractés par les dynéines ancrées au cortex cellulaire par l'intermédiaire des microtubules (voir texte). De plus, les dynéines 2 (d2) et 3 (d3) non ancrées permettent le rapprochement des noyaux 2 et 3 en circulant chacune vers l'extrémité (-) du microtubule antiparallèle (adapté de [209]).

On s'intéresse ici à la dynamique des noyaux dans les hyphes de *P. anserina*, dans l'optique d'identifier des divergences éventuelles entre les hyphes apicales et latérales. De plus, nous étudierons la répartition des noyaux au cours d'un branchement apical.

6.3.2 Marquage fluorescent des noyaux et mesures

Les noyaux sont observés en fluorescence grâce à un marquage GFP sur une protéine spécifique du noyau (MCM1, voir section 2.4, p.70). Cette méthode de marquage se révèle très efficace, d'autant plus que la GFP présente un excellent rendement quantique et une grande résistance au photoblanchiment [198]. De plus, l'autofluorescence de la membrane de cellophane permet de distinguer le contour des hyphes (figure 6.10). Il est ainsi possible d'effectuer simultanément un relevé de la position des noyaux et de l'apex au cours du temps.

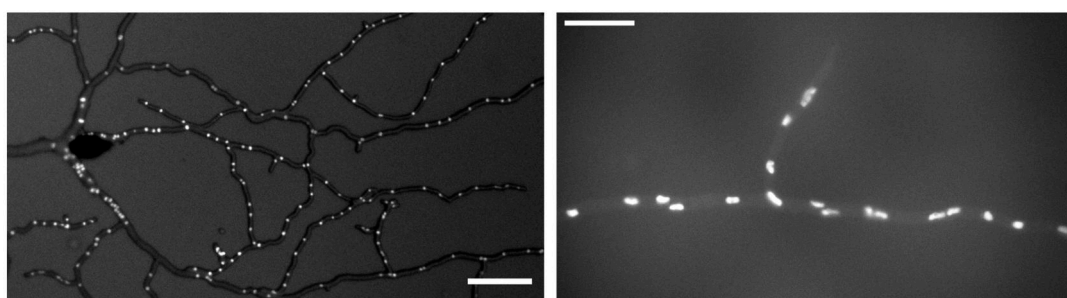


FIG. 6.10 – Hyphes de *P. anserina* dont les noyaux sont marqués avec la GFP (protéine MCM1-GFP). À gauche, image du mycélium autour de l'ascospore (barre d'échelle : 50 μm). À droite, hyphe à la périphérie du mycélium (barre d'échelle : 10 μm).

Les noyaux de *P. anserina* sont de taille similaire à ceux de *N. crassa*, dont le diamètre a été évalué entre 2 et 4 μm [74] [216]. La fiabilité du suivi des noyaux requiert une fréquence d'acquisition des images relativement élevée dans la mesure où les noyaux se divisent fréquemment. Les collections d'images sont enregistrées sur une durée typique de 15 minutes, avec une période d'acquisition de 30 secondes.

6.3.3 Zone d'exclusion des noyaux

Tout d'abord, comme décrit chez plusieurs champignons filamenteux (voir section 6.3.5, p.214), les hyphes de *P. anserina* possèdent une région à leur extrémité dépourvue de noyaux : il s'agit de la zone d'exclusion des noyaux, de longueur z . Un exemple de l'évolution de z au cours du temps est représenté pour trois hyphes apicales sur la figure 6.11. Au vu des incertitudes, on peut considérer que z est constant sur l'intervalle de temps étudié.

Des collections temporelles de longueurs z sont extraites pour des hyphes apicales ($N = 41$) et latérales ($N = 31$) sur environ 15 minutes, comme explicité sur l'exemple figure 6.11. En considérant que la longueur de la zone d'exclusion est stable au cours du temps, on extrait la moyenne de chaque collection temporelle. Les distributions obtenues sont présentées sur

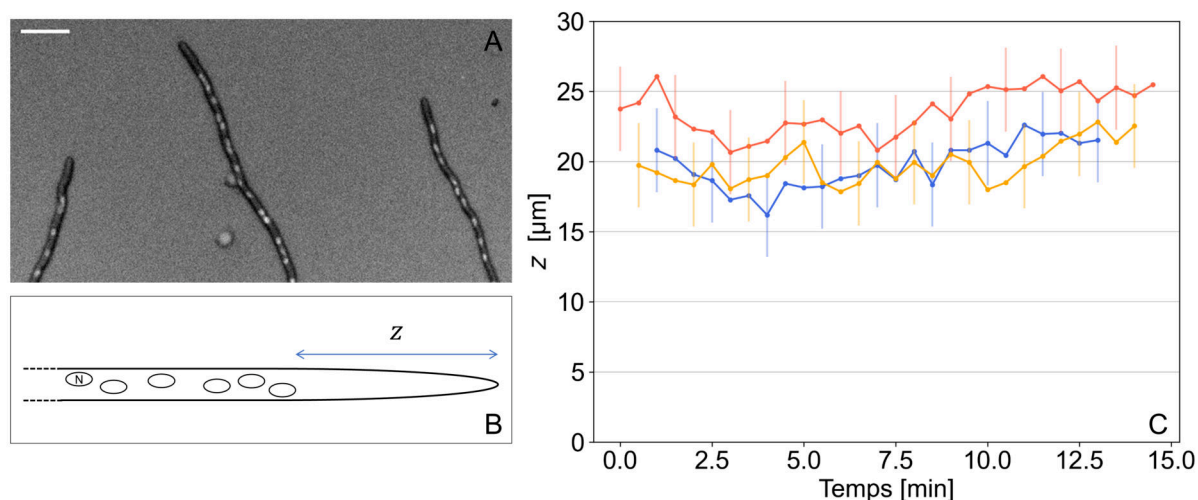


FIG. 6.11 – (A) Le marquage fluorescent des noyaux des hyphes apicales de *P. anserina* permet de mettre en évidence une zone d'exclusion des noyaux à l'apex (barre d'échelle : $20\ \mu\text{m}$). (B) La zone d'exclusion de longueur z est dépourvue de noyaux (notés N). (C) Évolution de z au cours du temps pour trois hyphes apicales. Les barres d'erreur sont marquées tous les trois points.

la figure 6.12, et mettent en évidence des valeurs globalement plus faibles pour les branches latérales.

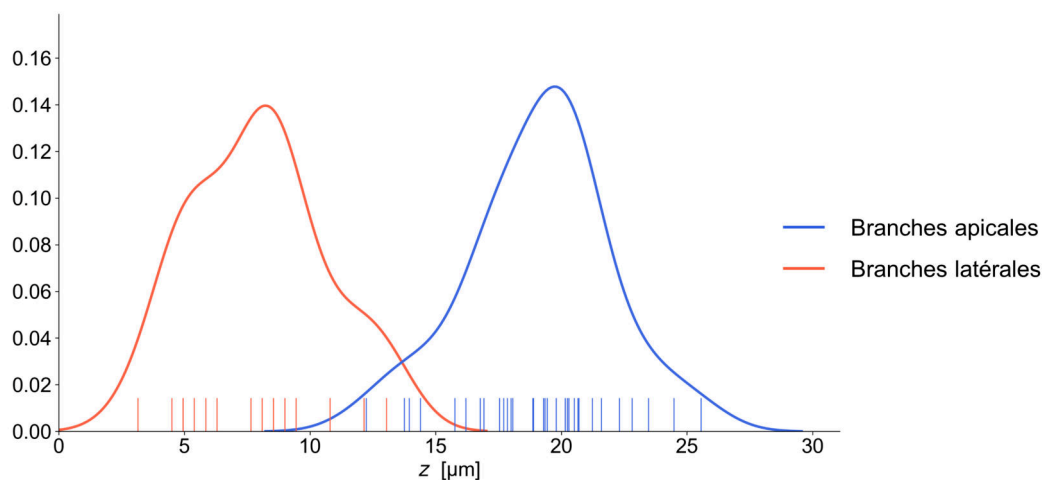


FIG. 6.12 – Densités de probabilité estimées par noyaux pour la longueur z , pour des hyphes apicales (valeur la plus probable : $20\ \mu\text{m}$, écart-type : $2,8\ \mu\text{m}$, $N = 41$) et des hyphes latérales (valeur la plus probable : $8\ \mu\text{m}$, écart-type : $2,6\ \mu\text{m}$, $N = 31$). Les valeurs de z sont indiquées par les traits verticaux.

Du fait de l'observation d'une zone d'exclusion de longueur constante, la vitesse des noyaux est en moyenne égale à la vitesse d'extension de l'apex. Cependant, comme mentionné précédemment, certains noyaux ont des mouvements ponctuellement rétrogrades par rapport à la direction de croissance. De plus, nous avons observé chez *P. anserina* qu'un noyau peut en doubler un autre, indiquant ainsi qu'ils n'évoluent pas à la même vitesse. Ces comportements ont été analysés en suivant simultanément la position de l'apex d'une part et celle de certains noyaux au sein de l'hyphe d'autre part. On notera que la vitesse de croissance de l'apex est considérée comme

relativement constante, comme indiqué dans la section 4.2, p.105.

La figure 6.13 représente l'évolution temporelle de Δd , la différence entre la distance parcourue par l'apex d_a et celle parcourue par un noyau d_n : $\Delta d = \frac{d_a - d_n}{d_a}$. Lorsque le noyau est transporté à la vitesse de croissance, Δd est nulle, et lorsque que noyau est plus rapide, Δd est négative. Comme le montre la figure 6.13, les trois noyaux étudiés ici connaissent des phases successives d'accélération, de ralentissement, et même de déplacement dans le sens opposé à la croissance. On retrouve néanmoins qu'en moyenne, la valeur de Δd est très faible, signifiant que le noyau se déplace globalement à la vitesse de l'apex. Pour chacun des trois noyaux présentés en exemple sur la figure 6.13, la moyenne de Δd et l'écart-type de la distribution sont : $0,05 \pm 0.55$ (bleu), $0,11 \pm 0.28$ (orange), $0,02 \pm 0.68$ (jaune). Un travail identique est effectué pour 10 noyaux, et la moyenne de Δd correspondante est estimée à $0,010 \pm 0,002$.

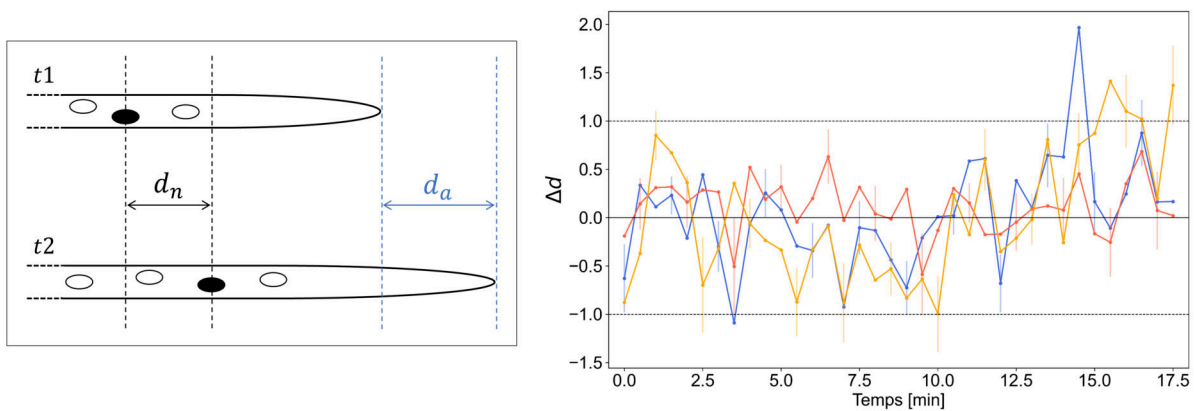


FIG. 6.13 – À gauche, définitions des distances d_a : la distance parcourue par l'apex pour un intervalle de temps $t_2 - t_1$, et d_n : la distance parcourue par le noyau suivi (noir) sur la même durée $t_2 - t_1$. On définit $\Delta d = \frac{d_a - d_n}{d_a}$. À droite, évolution temporelle de Δd pour trois noyaux au sein d'une même hyphe. Les mouvements rétrogrades (par rapport à l'orientation de l'apex) sont repérables lorsque la ligne horizontale d'équation $y = 1$ est dépassée. Les points expérimentaux sont reliés pour chaque noyau, et les barres d'erreur sont marquées tous les trois points.

6.3.4 Répartition des noyaux à un point de branchement

Enfin, la dynamique des noyaux est observée au niveau d'un nœud apical. Lorsqu'un branchement se produit au niveau de l'apex, les noyaux peuvent soit poursuivre dans la branche a_e orientée dans la direction de l'hyphes mère, soit bifurquer dans la branche a_o , comme indiqué sur l'encart de la figure 6.14 (voir section 4.2, p.105). Le nombre de noyaux N_n dans chaque branche peut alors être déterminé à chaque intervalle de temps t , associé à une longueur de l'hyphes mère en croissance $L(t)$. Celle-ci est mesurée entre l'apex et le point de branchement. Les relevés sont effectués au niveau de plusieurs points de branchement apicaux.

La figure 6.14 représente N_n en fonction de L pour les hyphes a_e et a_o respectivement. Les points expérimentaux des deux collections sont ajustés linéairement. On notera que les zéros des droites d'ajustement sont 15 ± 4 et $18 \pm 4 \mu\text{m}$ pour a_e et a_o respectivement. Ces valeurs sont compatibles avec l'existence de la zone d'exclusion des noyaux qui existe dès la naissance de la branche apicale (voir figure 6.12). La relation de proportionnalité estimée entre le nombre

de noyaux et la longueur de la branche suggère que la densité des noyaux est constante au cours du temps. De plus, les coefficients directeurs des deux droites associées à a_e et a_o sont compatibles à un écart-type près ($0,133 \pm 0,005 \mu\text{m}^{-1}$ et $0,123 \pm 0,005 \mu\text{m}^{-1}$ respectivement), indiquant que les densités de noyaux sont similaires dans les branches a_e et a_o sur la gamme explorée, représentant environ une trentaine de diamètres d'hyphe.

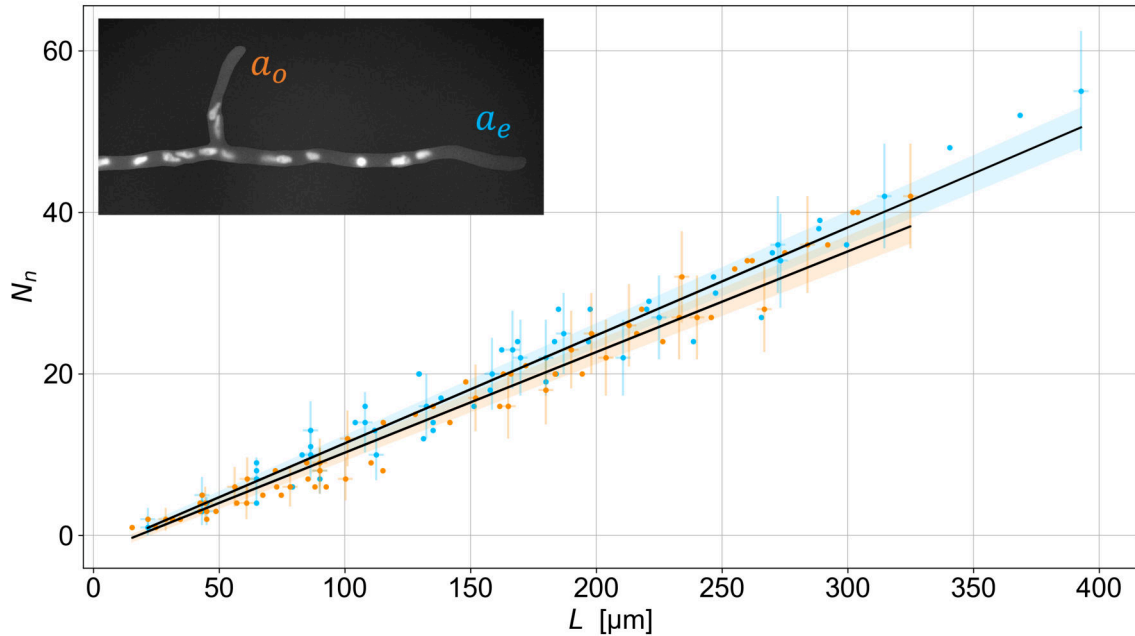


FIG. 6.14 – Au niveau d'un branchement apical, les noyaux peuvent poursuivre dans la branche a_e , ou bien bifurquer vers la branche a_o (encart). On représente l'évolution du nombre de noyaux N_n dans chaque branche (a_e en bleu, a_o en orange) en fonction de la longueur de l'hyphe L . L'incertitude sur N_n est estimée par $\sqrt{N_n}$. Les droites noires représentent l'ajustement linéaire sur les points expérimentaux, et les surfaces bleue et orange l'incertitude associée (un écart-type) pour a_e ($0,133 \pm 0,005 \mu\text{m}^{-1}$) et a_o ($0,123 \pm 0,005 \mu\text{m}^{-1}$) respectivement.

6.3.5 Discussion

Ainsi, la répartition des noyaux dans la région apicale apporte un critère supplémentaire de distinction entre les branches apicales et latérales. En effet, la zone d'exclusion des noyaux a été estimée comme deux fois plus courte pour les hyphes latérales que pour les hyphes apicales. Il a été envisagé que cette région dépourvue de noyaux serait favorable à la libre circulation de la machinerie de croissance à l'apex, qui serait potentiellement entravée par des organites massifs comme les noyaux [4]. L'activité étant réduite au niveau des apex latéraux, la longueur de la zone d'exclusion pourrait être plus faible. Cette région d'exclusion a par ailleurs largement été décrite chez *N. crassa*, mais la distinction entre les deux natures de branches n'est généralement pas précisée. La longueur z a par exemple été estimée à $12,9 \pm 4,4 \mu\text{m}$ [213], $14 \mu\text{m}$ [217], ou encore entre 20 et $25 \mu\text{m}$ [214], contre respectivement $8 \pm 2,6$ et $20 \pm 2,8 \mu\text{m}$ dans ce travail pour les hyphes latérales et apicales de *P. anserina*.

D'autre part, nous avons observé chez *P. anserina* que la densité de noyaux semblait constante au cours du temps, et similaire au sein des deux hyphes issues d'un branchement apical. Ainsi, la répartition des noyaux au niveau du nœud apical s'effectuerait de telle sorte que la densité de noyaux globale reste stable à la fois dans le temps et dans l'espace [218]. On notera que comme montré chez *N. crassa* [214], nous avons observé que la division des noyaux semblait asynchrone chez *P. anserina*. Il serait par ailleurs intéressant d'analyser également la dynamique de répartition des noyaux au niveau d'un branchement latéral, où l'activité métabolique paraît ralentie.

La duplication des noyaux entre en jeu dans le maintien de leur nombre par unité de longueur. On peut directement estimer le taux de duplication des noyaux nécessaire au maintien de la densité lors de la croissance. La densité linéique ρ_L est directement le coefficient directeur de la droite N_n en fonction L (figure 6.14). Avec une vitesse moyenne de l'apex $V_{a_e} = 4,592 \pm 0,008 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ (voir section 4.2.2, p. 107), la vitesse de duplication des noyaux s'écrit $\rho_L V_{a_e}$. En considérant l'hyphé a_e pour laquelle $\rho_L = 0,133 \pm 0,005 \mu\text{m}^{-1}$, $\rho_L V_{a_e} = 0,61 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$, soit environ une duplication de noyau toutes les 2 minutes. Bien que le mécanisme de circulation des noyaux n'ait pas encore été totalement décrit, il apparaît que les processus de régulation sont rétroagis de manière à permettre une distribution homogène des noyaux au sein de l'hyphé.

La circulation des noyaux est en partie liée à l'activité des microtubules. Parmi ces derniers, certains sont ancrés au niveau du cortex cellulaire, et peuvent alors être entraînés au sein de la branche émergente au cours d'un branchement, et présenter des trajectoires obliques [74]. Les noyaux, directement liés aux microtubules au niveau du SPB, suivent alors probablement la trajectoire du cytosquelette, et bifurquent depuis l'hyphé mère vers la nouvelle branche, où de nouveaux microtubules sont polymérisés (figure 6.15) [166] [88].

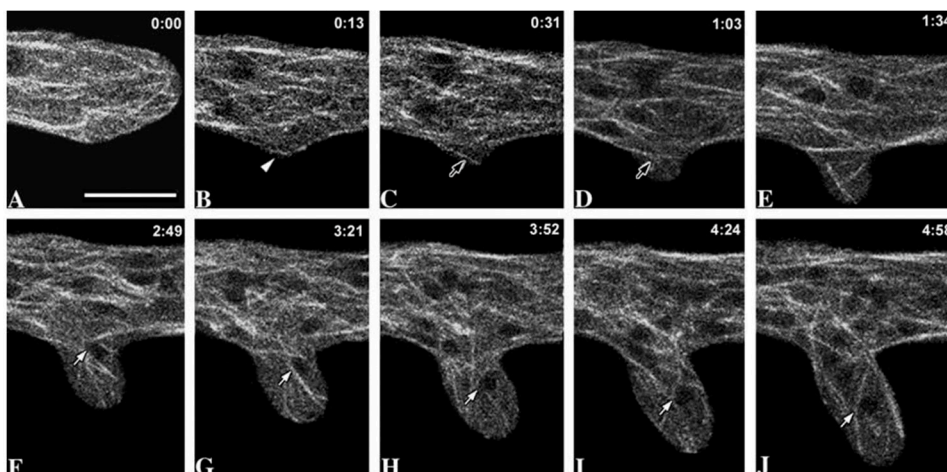


FIG. 6.15 – Microtubules marqués avec la GFP au niveau d'un branchement chez *N. crassa*. Des microtubules s'engouffrent dans la branche naissante (flèches noires). Le déplacement d'un noyau dans la branche est suivi (flèche blanche). Le temps est en min.s. Barre d'échelle : 5 μm (adapté de [88]).

6.4 Spitzenkörper

Le SPK, principalement composé d'une accumulation de vésicules sécrétoires à l'apex, constitue l'élément clé de la croissance apicale. Les caractéristiques relatives à cette structure ont été détaillées dans la section 1.2.7, p.34.

Comme décrit chez plusieurs espèces filamenteuses, dont *N. crassa* [39] [98] [107] [219], nous avons observé chez *P. anserina* la disparition du SPK marqué en fluorescence lors de l'arrêt de la croissance de l'hyphe. Dans ce contexte, nous avons cherché à établir un lien éventuel entre la vitesse de croissance de l'apex et l'intensité de fluorescence du SPK observé à l'extrémité d'hyphes apicales et latérales.

6.4.1 Marquage fluorescent du Spitzenkörper

Le marquage fluorescent du SPK de *P. anserina* est réalisé grâce au colorant FM 4-64, également utilisé pour étudier l'endocytose (voir section 1.2.9, p.40) et le trafic de vésicules sécrétoires (voir section 1.2.8, p.38) dans les cellules fongiques et de végétaux [63] [220] [221]. Il y a 20 ans, cette molécule fluorescente, dont le nom fait référence au chimiste Fei Mao, a révolutionné l'observation intracellulaire chez les champignons [207] [220].

Il s'agit d'un colorant spécifique de la membrane plasmique, mais également de la membrane de la plupart des organites - à l'exception de l'enveloppe du noyau [198]. Le FM 4-64 est une molécule amphiphile : elle possède à la fois un groupe hydrophile et un autre hydrophobe. Cette propriété lui permet de s'insérer du côté extérieur de la membrane plasmique, mais l'empêche de la traverser. Le colorant entre dans l'espace intracellulaire uniquement par le biais de l'endocytose, et constitue ainsi un excellent rapporteur de ce processus [220] [222]. L'utilisation de ce marqueur a d'ailleurs permis de mettre en évidence l'existence de l'endocytose chez la levure *S. cerevisiae*, puis chez les champignons filamenteux [118]. Le FM 4-64 est ensuite distribué aux membranes des différents organites, probablement grâce au trafic de vésicules au sein de l'hyphe. Chez *N. crassa*, l'ordre de marquage des structures observé au cours du temps est le suivant : la membrane plasmique, les endosomes (voir section 1.2.9, p.40), les vésicules constituant le SPK, et les membranes des vacuoles et des mitochondries [198].

Nous utilisons ici le colorant fluorescent FM 4-64 sur les hyphes de *P. anserina* afin de visualiser et de mesurer l'intensité de fluorescence du SPK au cours du temps. Cette structure est facilement repérable sur les images en fluorescence, comme indiqué sur la figure 6.16. Les procédures de préparation de l'échantillon et de traitement des images sont décrites dans la section 2.4, p.70. On notera que la durée de suivi du SPK pour chaque hyphe étudiée est relativement courte (environ 5 minutes), dans la mesure où le colorant est rapidement sensible au photoblanchiment.

6.4.2 Intensité de fluorescence et vitesse de croissance

L'intensité de fluorescence du SPK est estimée sur chaque image de la collection temporelle associée à une hyphe. Le profil de l'intensité fluorescente suivant une coupe longitudinale au

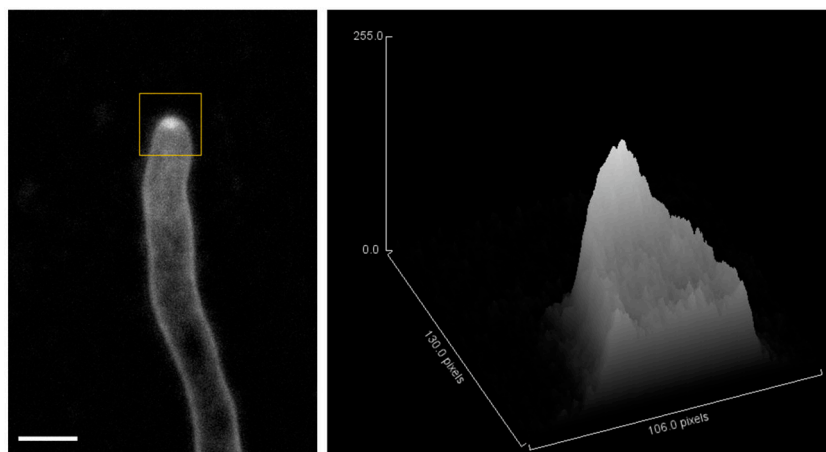


FIG. 6.16 – À gauche, extrémité d'une hyphe de *P. anserina* marquée au FM 4-64 (barre d'échelle : $5\mu\text{m}$). À droite, projection selon l'axe z de l'intensité de fluorescence (unité arbitraire) de l'apex (encadré en jaune sur la figure de gauche).

niveau de l'apex est extrait pour chaque image successive (figure 6.17). On estime que l'intensité du SPK correspond à la valeur maximale de chaque courbe, notée I , à un instant donné. D'autre part, la vitesse d'extension de l'apex v est extraite sur l'intervalle de temps considéré pour chaque hyphe (soit environ 5 minutes), en suivant la procédure détaillée dans le cas d'images acquises en champ clair (voir section 4.2.1, p. 106).

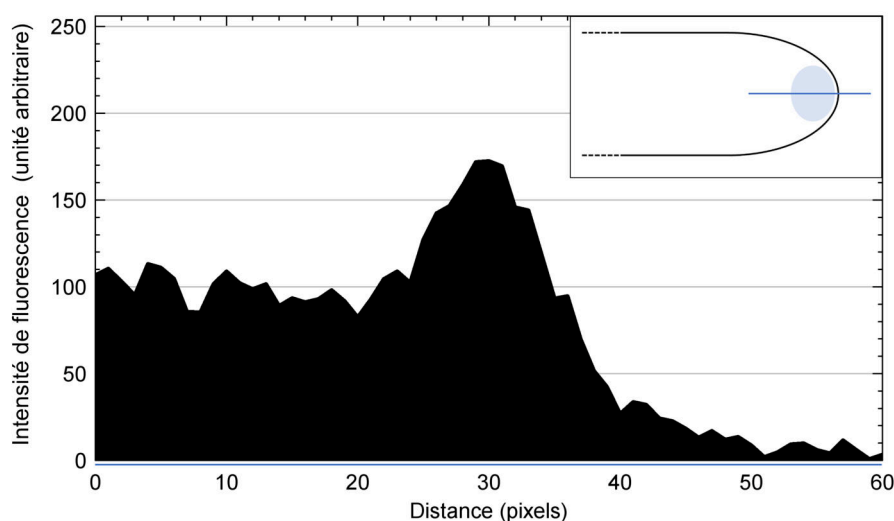


FIG. 6.17 – Profil de l'intensité de fluorescence suivant une coupe longitudinale sur les images de l'apex, comme représenté dans l'encart. La ligne bleue a une longueur de 60px, soit environ un diamètre d'hyphe. La valeur maximale de la courbe I est considérée comme représentant l'intensité du SPK.

On représente sur la figure 6.18 l'évolution de I au cours de la durée de suivi de trois apex, qui indique que compte tenu de l'incertitude de mesure, les collections des maxima I mesurés au cours du temps ne montrent pas de tendance particulière. Ainsi, on peut approximer chaque collection temporelle associée à un SPK par sa moyenne \hat{I} , qui sera représentée en fonction de la vitesse de croissance v (figure 6.18).

Les points expérimentaux sont ajustés à l'aide d'une fonction affine $\hat{I} = av + b$. Les paramètres estimés avec un écart-type sont : $a = 31 \pm 1 \text{ min} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ et $b = 8 \pm 3$. Ainsi, la vitesse de croissance est linéairement corrélée avec l'intensité de fluorescence du SPK. La vitesse de l'hyphe peut alors être utilisée comme un marqueur (externe) reflétant l'intensité de l'activité métabolique du SPK (structure intracellulaire). On note que l'ordonnée à l'origine b n'est pas compatible avec la valeur nulle en considérant une incertitude d'un écart-type. Il peut être éventuellement envisagé que la croissance de l'hyphe ne soit possible qu'à partir d'une certaine intensité du SPK seuil, de valeur faible. Cette intensité refléterait le nombre minimal de vésicules sécrétoires nécessaire pour initier la croissance.

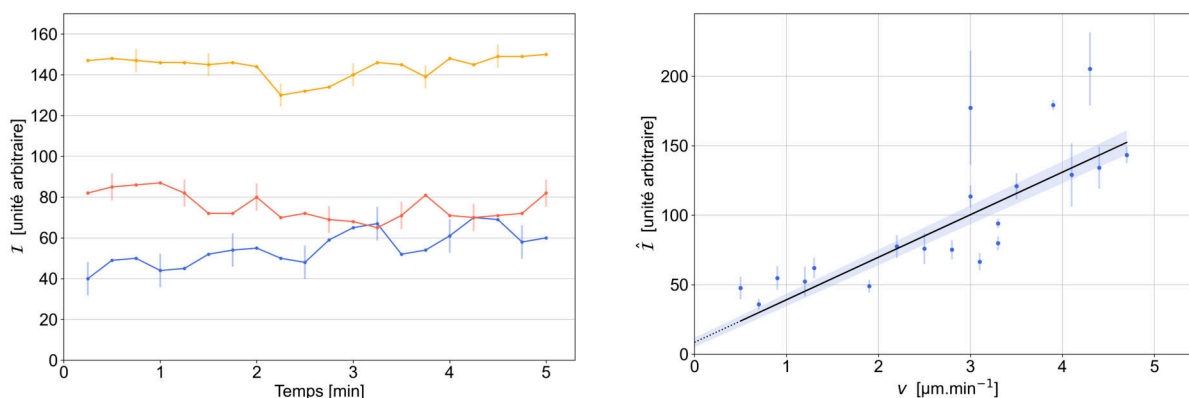


FIG. 6.18 – À gauche, évolution temporelle de l'intensité du SPK pour trois hyphes. Chaque point correspond à la valeur maximale I du profil d'intensité fluorescente de l'apex (voir figure 6.17). Les barres d'erreur marquées tous les trois points représentent l'écart-type de chaque collection de données. À droite, chaque point correspond à la moyenne \hat{I} d'une collection temporelle d'intensités I . Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de chaque collection. Les points ont été ajustés linéairement (droite noire, prolongée en pointillé au-delà de l'intervalle d'ajustement) et la surface bleue représente un écart-type. $N = 20$.

6.4.3 Discussion

En s'appuyant sur l'hypothèse qu'une croissance rapide de l'hyphe requiert un nombre accru de vésicules sécrétoires à l'apex, une corrélation entre l'intensité de fluorescence des vésicules constituant le SPK et la vitesse d'extension semble envisageable. Au vu des résultats expérimentaux, ces deux grandeurs semblent proportionnelles chez *P. anserina*. De même, il a été observé chez *N. crassa* qu'à l'initiation de la croissance du mycélium, le SPK n'était pas visible, probablement en raison d'un nombre insuffisant de vésicules à l'apex [67].

Bien que très simple d'utilisation, le colorant fluorescent FM 4-64 utilisé pour visualiser le SPK de *P. anserina* marque également de nombreuses structures au sein de l'hyphe, comme évoqué précédemment. Une alternative consisterait à construire une souche mutante pour laquelle une protéine spécifique du SPK serait marquée avec un fluorophore, comme la GFP par exemple. Des telles constructions ont été réalisées chez *N. crassa*, avec notamment le marquage de chitine synthases (CHS), des enzymes constituant en partie le SPK. On peut par exemple citer les travaux de Rico-Ramírez *et al.* [99] (CHS-4-GFP), de Riquelme *et al.* [223] (CHS-3-GFP et

CHS-6-GFP) ou de Garduño-Rosales *et al.* [204] (CHS-1-mCherry). Cette méthode de marquage permettrait d'obtenir une fluorescence plus spécifique du SPK, et une intensité probablement plus durable dans le temps.

Par ailleurs, les dynamiques des SPK chez *P. anserina* pourraient être étudiées au niveau des branchements. De fait, chez *N. crassa* et *A. niger*, le branchement apical (dichotomique) provoque la disparition temporaire du SPK, précédant l'apparition de deux nouveaux apex [79] [167]. À l'inverse, le branchement subapical n'engendre pas d'altération du SPK de l'hyphe mère, et un nouveau SPK est formé à l'apex de la branche émergente [170] [224]. Le marquage spécifique du SPK chez *P. anserina* permettrait de constater si des comportements similaires sont observables. De même, l'apparition du SPK à l'extrémité d'une branche latérale pourrait être analysée. Enfin, il pourrait être envisagé d'observer la position précise du SPK, ce dernier ayant été décrit comme situé à l'extrême apex pour les hyphes rapides, et davantage rétracté dans les hyphes plus lentes [219].

6.5 Conclusion

Ainsi, l'observation en fluorescence constitue une approche complémentaire à l'analyse de la structure et de la dynamique du mycélium de *P. anserina* en champ clair. Nous avons cherché à établir des liens éventuels entre les résultats issus de ces deux approches. Quelques résultats préliminaires ont été présentés, notamment focalisés sur les régions apicales des hyphes ainsi que les points de branchement.

Tout d'abord, l'étude de la répartition des septa le long des hyphes de la souche sauvage et de souches mutantes a permis de proposer une éventuelle corrélation entre les longueurs des articles et les distances inter-nœuds apicaux. La validation de cette observation reste délicate du fait de l'emploi de souches mutantes, pour lesquelles plusieurs aspects métaboliques peuvent être affectés, et provoquer des perturbations individuellement au niveau des septa d'une part et des branchements d'autre part. Il pourrait être envisagé de poursuivre l'étude avec la souche sauvage cultivée dans des conditions sous contraintes. Par exemple, il semblerait qu'une température élevée (35°C) induise un mycélium caractérisé par une fréquence de branchement apicaux augmentée (voir article dans la section 3.4, p.80). La longueur des articles pourrait être évaluée dans de telles conditions de culture, afin de vérifier une éventuelle corrélation avec la distance inter-nœuds apicaux. Ensuite, la répartition des noyaux au sein de l'hyphe apparaît comme liée au processus de branchement. En effet, il semble que les noyaux soient dispersés de telle sorte que leur densité reste relativement constante au sein des deux hyphes issues du branchement apical. L'étude pourrait être étendue aux branchements latéraux, afin de vérifier si un équilibre similaire y est à l'œuvre. Enfin, nos observations indiquent une tendance selon laquelle une vitesse de croissance élevée est liée à une forte concentration de vésicules sécrétoires à l'apex, identifiables en fluorescence sous la forme du SPK.

De manière à poursuivre ces travaux, une modification du protocole d'observation serait envisageable afin d'améliorer la qualité des images. En effet, la présence de la membrane de cellophane diminue le contraste entre le fond et l'objet observé. Une méthode d'observation répandue en microscopie inversée consiste à retourner le bloc de milieu solide à la surface duquel est placé l'échantillon, afin de conserver une croissance en deux dimensions et la mise au point, puisqu'il n'y a pas de dessèchement du milieu. Cette procédure ne cause pas de perturbation de la croissance des hyphes, mais est limitée à quelques heures d'observation, dans la mesure où le dioxygène disponible vient à manquer [198] [199] [207].

Par ailleurs, des structures cellulaires supplémentaires pourraient être marquées en fluorescence afin de compléter l'analyse, comme par exemple les microtubules ou l'actine, observés notamment chez *N. crassa* par Mouriño-Pérez *et al.* [88] et Garduño-Rosales *et al.* [204] respectivement. L'étude de co-marquages pourrait également être intéressante, par exemple l'observation simultanée des noyaux et des septa. De fait, un schéma d'écoulement particulier a été observé chez *N. crassa* juste avant le passage d'un septum : des tourbillons se forment, dans lesquels des noyaux peuvent se retrouver piégés pendant plusieurs minutes et former des agrégats [202]. La présence des septa pourrait ainsi provoquer des variations des vitesses de déplacement des noyaux. De plus, comme mentionné précédemment, la dynamique des noyaux est fortement liée aux microtubules, et un co-marquage de ces deux structures permettraient de mieux appréhender leurs comportements interdépendants.

Chapitre 7

Conclusion

Le réseau mycélien des champignons filamenteux présente la particularité de constituer l'intégralité de l'organisme, et pas seulement une partie de celui-ci, contrairement au système vasculaire des animaux par exemple. De ce fait, le mycélium doit assurer la survie de l'organisme depuis la germination de la spore jusqu'à la reproduction, et fait alors face à la problématique majeure de l'accès aux nutriments et à l'énergie indispensables à sa croissance [52]. Aiguisé au fil de l'évolution, le réseau mycélien est une structure redoutablement efficace dans la colonisation des milieux, comme le reflète la présence des champignons filamenteux dans la majorité des écosystèmes terrestres. Leur stratégie d'exploration des substrats s'appuie sur la croissance par l'apex et sur le processus de branchement, par lequel un nouvel apex est créé. Ce mécanisme, caractéristique des réseaux mycéliens, diffère de la stratégie adoptée par les animaux par exemple, qui ont majoritairement recours au déplacement de l'organisme [168].

Bien que, dans la nature, le mycélium soit souvent enfoui dans le substrat ou associé à d'autres organismes, son observation *in vitro* en laboratoire donne directement accès à l'organisation du réseau mycélien. Cette structure est difficile à appréhender dans la mesure où elle évolue et se complexifie en permanence, du fait de la croissance et de la densification du réseau. Il s'agit d'un système vivant dont les limites ne sont pas clairement établies, ni dans le temps, ni dans l'espace [59]. La caractérisation d'une hyphe individuelle est par ailleurs délicate, puisqu'elle croît et interagit avec ses voisines, et que des branchements se produisent périodiquement à l'apex et le long de l'hyphe.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation du mycélium du champignon filamenteux modèle *P. anserina*. L'analyse de l'architecture du réseau et de la dynamique de croissance des hyphes a requis une approche interdisciplinaire multi-échelle : étude à l'échelle du thalle global (Chapitre 3), à l'échelle de l'hyphe (Chapitre 4), et à l'échelle intracellulaire (Chapitre 6). Nous nous sommes également appuyés sur une simulation du réseau branchant de *P. anserina*, calibrée à partir d'observables expérimentaux, et permettant en retour d'effectuer des prédictions sur le comportement mycélien (Chapitre 5).

Le mycélium n'est pas assimilable à une structure homogène, mais s'apparente plutôt à un système dynamique et complexe, composé d'un ensemble d'hyphes dont le comportement individuel influe sur l'organisation globale. Ainsi, la compréhension de la dynamique du thalle global repose sur l'analyse des mécanismes se produisant localement à l'échelle de l'hyphe. Nous nous sommes pour cela attachés à définir des grandeurs caractéristiques du réseau

mesurables expérimentalement. Par ailleurs, nous avons complété l'analyse grâce à une approche intracellulaire en fluorescence. Enfin, l'accès à l'évolution temporelle du thalle, des hyphes, et des structures intracellulaires s'est révélé essentiel dans la caractérisation des dynamiques de croissance, mais également dans l'identification des hyphes, des apex et des nœuds lors des relevés par l'opérateur.

Notre dispositif d'observation en lumière blanche a permis l'acquisition d'images du mycélium de *P. anserina* lors de différentes expériences en conditions contrôlées. Ce dispositif étant facilement modulable au niveau des conditions de croissance, mais également des dimensions des images par exemple, il peut être exploité pour observer d'autres espèces de champignons filamenteux. Il convient de noter ici que notre procédure expérimentale est initiée grâce à la germination d'une ascospore. Contrairement à de nombreux dispositifs d'observation décrits dans la littérature, pour lesquels la culture est menée à partir de fragments de mycélium, le recours systématique à une unité dans un état physiologique identique permet de s'affranchir de l'impact éventuel des conditions de culture du mycélium directement fragmenté. Cette méthode s'appuyant sur une spore isolée issue de la reproduction sexuée peut néanmoins s'adapter aux espèces ne se reproduisant pas par reproduction sexuée : on peut alors envisager d'initier la culture à partir d'un inoculum de spores asexuées (comme les conidies) isolées, ou d'une suspension suffisamment diluée pour observer des comportements individuels. En dernier recours, une solution de mycélium fragmenté standardisée est toujours possible. Des expérimentations sont actuellement en cours au laboratoire pour la caractérisation du réseau de souches de *Trichoderma* sp. à partir de suspensions conidiennes et de *Fomitopsis* sp. à partir de fragments mycéliens (projet de Éva Cabet, ingénieure de recherche au LIED).

Ce dispositif expérimental présente cependant des limites qu'il convient de relever ici. Ainsi, le traitement automatisé des images, adossé au dispositif d'acquisition, est fiable tant que les hyphes sont correctement identifiées les unes par rapport aux autres, soit typiquement pendant une vingtaine d'heures suivant la germination d'une ascospore de *P. anserina*. De plus, la croissance du mycélium est maintenue en deux dimensions du fait de la présence d'une membrane de cellophane recouvrant le milieu de culture. Cette configuration plane modifie le comportement naturel des hyphes, qui évoluent habituellement en trois dimensions, et favorise les rencontres entre les hyphes, aboutissant à des chevauchements ou à des anastomoses. La technique d'acquisition des images en champ clair ne nous permet pas de distinguer les chevauchements, les anastomoses et les points de branchement, tous trois identifiés comme des nœuds *N*. Un nouveau travail de traitement des images est en cours au laboratoire (thèse de Thibault Chassereau), afin de distinguer et de quantifier ces différentes configurations en s'appuyant sur la dynamique de croissance.

Dans le Chapitre 3, nous nous sommes placés à l'échelle du mycélium global, et avons cherché à caractériser la dynamique de croissance du réseau fongique soumis à différentes contraintes, susceptibles d'être rencontrées *in vivo*, par rapport à la condition de référence standard, considérée comme optimale *in vitro* pour la croissance et la reproduction de *P. anserina*. Les contraintes étudiées ici sont i) un stress nutritif, ii) un stress osmotique, iii) un stress lumineux,

iv) deux stress de température (basse et élevée par rapport à l'optimum de 27°C pour *P. anserina*). En complément de l'étude du nombre d'apex, de nœuds et de la longueur, une approche originale en géomatique s'intéressant aux surfaces intra-thalles a permis de quantifier les dynamiques propres à chaque mycélium en croissance sous différentes contraintes. Les différences mises en évidence suggèrent que la morphologie de l'organisme est une conséquence de l'environnement de croissance du champignon, venant modifier de nombreux mécanismes cellulaires. De plus, la disparité observée parmi les thalles après plusieurs jours de croissance souligne l'influence des premières heures de croissance sur la morphologie plus tardive. Ces travaux font l'objet d'un article à soumettre au journal PLOS Biology.

On notera cependant que le champignon est cultivé en conditions de laboratoire, bien éloignées de son environnement de croissance naturel. Si la croissance est restreinte en deux dimensions comme évoqué précédemment, le milieu de culture est également homogène, sans obstacle, et les conditions de température, d'humidité et d'éclairage sont maintenues constantes au cours de l'expérience. Dans son biotope naturel, *P. anserina* fait non seulement face à des ressources éparses, éphémères et éventuellement récalcitrantes, mais aussi à des températures et des rayonnements fluctuants, ainsi qu'à des prédateurs et des espèces compétitrices [73]. Dans ce contexte, il pourrait être envisagé de poursuivre l'analyse de croissance sous contraintes en appliquant des stress ponctuels ou périodiques, comme cela a été initié avec un stress lumineux (section 3.5). Par ailleurs, le mycélium pourrait être soumis à des contraintes combinatoires, afin de se rapprocher davantage de ses conditions de croissance réelles. De même, une expérience pourrait être menée en confrontation avec d'autres espèces fongiques ou bactériennes présentes dans l'environnement naturel de *P. anserina*, afin de quantifier d'éventuels comportements spécifiques.

Les grandeurs extraites à partir de l'analyse du réseau peuvent être considérées comme des caractéristiques fonctionnelles pertinentes, comme le proposent Aguilar-Trigueros *et al.* [42]. Il est ensuite possible d'identifier et de regrouper des stratégies de croissance similaires. Par exemple, certaines architectures du réseau favorisent la connectivité et la robustesse, alors que d'autres limitent le coût énergétique de la construction des hyphes. Enfin, il serait particulièrement enrichissant de combiner ces approches structurelles avec les études génomiques, protéomiques et métabolomiques sur un thalle en croissance en condition de contrainte, afin d'établir une caractérisation plus complète de l'adaptation du champignon soumis à un stress particulier.

Le Chapitre 4 s'est intéressé à l'organisation et à la dynamique de croissance des hyphes, par l'étude i) des vitesses d'extension des apex, ii) de la répartition des branchements le long de l'hyphe, et iii) des interactions entre un apex et une hyphe à proximité. Si ces analyses ont confirmé l'activité intense au niveau des apex du front de croissance, comme largement décrit dans la littérature, elles ont également mis en lumière le rôle majeur des hyphes latérales, très peu étudiées par ailleurs. Nous avons proposé plusieurs critères de distinction de ces branches latérales par rapport aux hyphes apicales, s'appuyant notamment sur la vitesse de croissance et la position du point de branchement. Les hyphes latérales participent à la dynamique de croissance du réseau de *P. anserina*, dont l'architecture serait grandement modifiée en leur absence.

Les observations locales décrites ici sont directement liées à la caractérisation menée à l'échelle du mycélium (Chapitre 3), puisque la dynamique de ce dernier dépend du comportement de l'ensemble des hyphes individuelles. Cependant, les relevés manuels sur les images ne permettent pas de traiter toutes les hyphes de manière exhaustive, et les distributions observées ne représentent qu'une certaine proportion du mycélium complet. Un travail d'automatisation des mesures est en cours au laboratoire (thèse de Thibault Chassereau), et permettra de traiter rapidement un réseau mycélien dans sa globalité. Pour cela, il est notamment nécessaire de pouvoir distinguer les chevauchements, les anastomoses et les points de branchement, mais aussi les hyphes apicales et latérales. On pourra ensuite envisager d'étudier la dynamique locale précise des hyphes en croissance sous contraintes, à partir des images des mycéliums décrits dans le Chapitre 3. L'automatisation des mesures pourra également être appliquée aux réseaux de souches mutantes, dont la morphologie est généralement décrite par l'aspect du thalle à l'échelle macroscopique et par quelques observations microscopiques d'hyphes statiques.

Enfin, le comportement d'une hyphe peut être influencé par la présence de ses plus proches voisines, notamment au niveau de la vitesse de croissance, mais aussi de l'orientation de l'apex, comme nous l'avons évoqué dans ce chapitre. Des travaux préliminaires de microfluidique ont été initiés au laboratoire (thèse de Thibault Chassereau), avec pour objectif d'isoler les hyphes de *P. anserina* dans des microcanaux, et d'analyser la dynamique propre à chacune.

Le réseau branchant de *P. anserina* est adapté à la modélisation mathématique, dans la mesure où il peut être décrit sous la forme d'un arbre binaire, comme présenté dans le Chapitre 5. La simulation du réseau fongique a été paramétrée à partir d'observables expérimentales. Un atout majeur de la simulation réside dans la possibilité d'explorer de larges gammes de valeurs pour certains paramètres d'intérêt. D'une part, nous nous sommes intéressés à la distribution des angles de branchement formés entre les hyphes. La confrontation de la simulation et des observations expérimentales suggère que les angles de branchement sont optimisés pour ce réseau vivant, en termes à la fois d'exploration et d'exploitation de l'espace. Cette étude a été publiée dans Scientific Reports en 2022 [149]. D'autre part, l'étude de la densité du mycélium a mis en évidence l'existence de trois phases de croissance distinctes : la densité décroît, puis suit une phase stationnaire, avant d'augmenter. Cette évolution est observable que le milieu de culture soit optimal pour la croissance (M2), ou appauvri en nutriments (M0). La localisation temporelle de la phase stationnaire est retardée par un taux de croissance plus faible (milieu appauvri en nutriments). Ce deuxième travail combinant l'étude de la modélisation et l'approche expérimentale va être soumis au journal Scientific Reports.

Si le modèle est initialement calibré sur des observables expérimentales simples, il peut ensuite être ajusté plus finement en y implémentant davantage de grandeurs issues de l'étude expérimentale, décrites dans le Chapitre 4 notamment. Un tel travail d'ajustement du modèle a été effectué entre la première simulation pour l'étude des angles de branchement et celle utilisée pour l'analyse de la densité du mycélium. En retour, la simulation permet d'effectuer des prédictions sur différentes grandeurs caractéristiques du réseau. La modélisation présente ainsi un intérêt majeur pour rendre compte du comportement d'un mycélium dont les paramètres ont

été choisis. Par exemple, comme présenté pour l'étude de la densité, on peut aisément générer un réseau mycélien ne produisant pas de branchements latéraux, tandis que la construction d'une souche mutante présentant de telles caractéristiques est particulièrement complexe.

Si nous avons présenté dans ce chapitre des études issues d'une simulation développée au laboratoire par Pascal David (physicien au LIED), d'autres modèles ont été proposés par ailleurs. Nos travaux portant sur l'étude du mycélium de *P. anserina* font partie d'un projet financé par l'ANR (ANR Nematic 2021), en collaboration avec deux équipes de mathématiciens (notamment Yves D'Angelo, LJAD, Université Côte d'Azur et Amandine Véber, MAP5, Université Paris Cité et École polytechnique). Ces équipes ont également développé des études de modélisation du mycélium de *P. anserina* [225] [226].

Enfin, nous avons présenté dans le Chapitre 6 des travaux préliminaires issus de l'observation dynamique en microscopie à fluorescence. Cette approche donne accès à plusieurs structures intracellulaires au sein de l'hyphe. Nous nous sommes focalisés sur i) la réparation des septa, ii) la dynamique des noyaux, et iii) le lien entre l'intensité fluorescente du SPK et la vitesse de croissance. Nous avons cherché à extraire des grandeurs quantitatives à partir des collections d'images temporelles, en suivant la démarche menée pour l'observation en lumière blanche.

L'analyse de la répartition des septa a été mise en parallèle avec celle des nœuds de branchement, issue de l'approche en champ clair développée dans le Chapitre 4. Sur le même modèle, il pourrait être envisagé d'analyser les dynamiques de structures intracellulaires au sein d'hyphes soumises à des contraintes de croissance, telles que celle étudiées dans le Chapitre 3. Notre dispositif d'observation serait facilement adaptable pour mettre en œuvre de telles conditions de croissance.

L'observation en fluorescence est complémentaire des études menées par ailleurs en champ clair, et fournit de précieuses indications sur les mécanismes intracellulaires de croissance. Cette approche donne notamment accès à l'étude des flux au sein de l'hyphe, sur lesquels repose la croissance, puisque l'activité principale est localisée à l'extrémité de l'hyphe. Nous avons présenté quelques travaux s'appuyant sur les flux de noyaux, et nous prévoyons une étude s'intéressant aux flux de nutriments au sein de l'hyphe, par le biais d'un substrat assimilable par *P. anserina* et marqué en fluorescence.

Le comportement du mycélium en croissance résulte de l'interaction de plusieurs processus : mécanismes cellulaires intracellulaires, interactions entre les hyphes, et interactions multiples du mycélium avec son environnement [73]. La compréhension de la croissance du réseau mycélien nécessite plusieurs approches à différentes échelles, afin d'appréhender non seulement chaque élément, mais également la structure globale. Une étude multi-échelle requiert à l'évidence une approche interdisciplinaire, reposant sur différentes techniques et méthodes d'observation, d'analyse et de modélisation. Les travaux présentés s'inscrivent dans ce cheminement à la croisée de plusieurs disciplines, permettant d'appréhender la croissance du réseau mycélien de manière plus complète et rigoureuse. De nombreuses perspectives sont ouvertes et de nouvelles études ont été initiées, afin de poursuivre la caractérisation du réseau mycélien de *P. anserina*, mais également d'autres espèces.

Annexe A

Analyse de la vitesse de croissance et de la densité du thalle global

Cette section s'intéresse à la vitesse de croissance du thalle à l'échelle macroscopique de la boîte de Petri (plusieurs jours de croissance) ainsi qu'à l'échelle du mycélium complet (20 premières heures de croissance). La densité locale et globale du réseau mycélien sera également évoquée. Cette étude est complémentaire à la section 4.2, p.105, dans laquelle les vitesses d'extension des hyphes individuelles sont analysées.

A.1 Vitesse du thalle à l'échelle macroscopique

L'observation du thalle à l'échelle macroscopique donne accès à une estimation de la vitesse de croissance du mycélium dans sa globalité sur plusieurs jours de croissance. Pour cela, des images du mycélium en croissance sur une boîte de Petri en conditions standards sont enregistrées toutes les 30 minutes pendant 6 jours (figure A.1, voir section 2.2.2, p.66). La membrane de cellophane n'est pas utilisée ici, car elle est percée par les hyphes après 2 à 3 jours de croissance seulement.

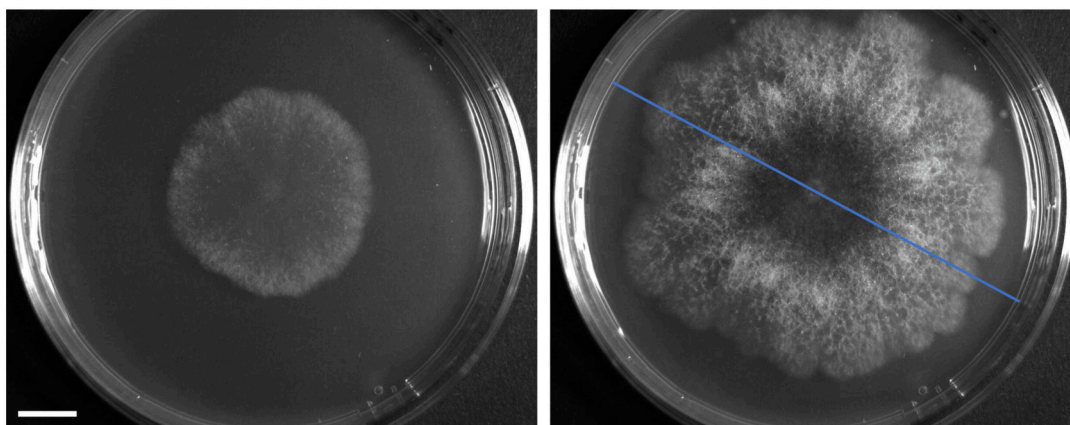


FIG. A.1 – À gauche, le thalle après 2 jours de croissance ; à droite après 6 jours de croissance environ (fin de l'observation). Un exemple de coupe radiale du thalle est représenté par la droite bleue. La résolution des images est $0,09 \text{ mm.px}^{-1}$. Barre d'échelle : 1 cm.

Le front de croissance se distingue nettement du milieu de culture, permettant de suivre l'évolution du diamètre du thalle au cours de la croissance. Pour cela, on réalise cinq kymographes

à partir de coupes radiales sur la boîte de Petri (figure A.2). Les kymographes permettent de suivre l'évolution temporelle de l'intensité des pixels le long d'une ligne (ici une coupe radiale de la boîte de Petri).

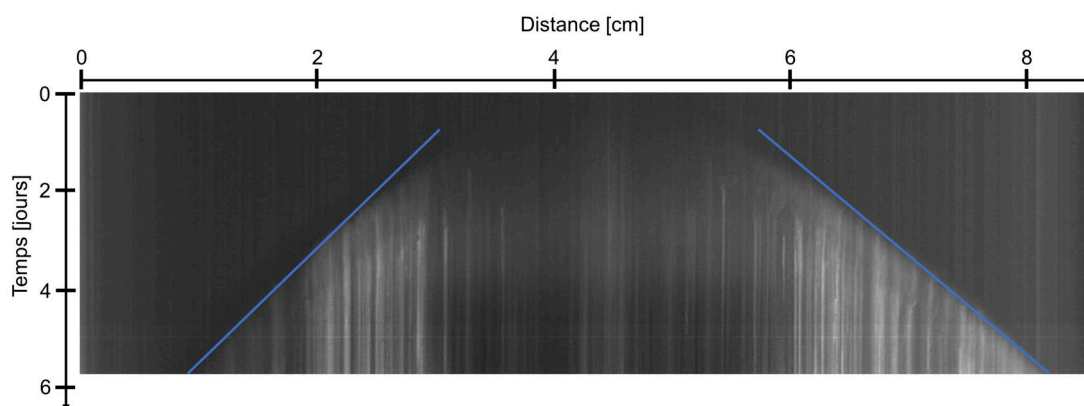


FIG. A.2 – Kymographe réalisé à partir d'une coupe radiale sur le thalle présenté en figure A.1. La distance le long de la coupe est indiquée en abscisse et le temps en ordonnée. Les droites bleues sont tracées manuellement en suivant le gradient de niveaux de gris séparant le mycélium (clair) du milieu de culture (sombre).

En dessous d'un jour de croissance environ, le mycélium est trop grêle pour se distinguer du milieu de culture. Au-delà, on observe une zone légèrement floue entre le thalle et le milieu, qui correspond à la région du front de croissance, moins dense que le centre du mycélium.

Sur chaque kymographe, deux droites sont tracées manuellement afin d'estimer la vitesse de propagation du front de croissance. On notera que les droites suivent fidèlement l'évolution du thalle à partir de 2 jours de croissance, mais qu'elles s'en éloignent en-deçà. Il semblerait ainsi que le mycélium présente une phase de croissance initiale plus rapide, avant d'atteindre une vitesse stationnaire légèrement plus faible.

La moyenne des coefficients de proportionnalité des dix droites est de $6,72 \text{ mm.j}^{-1}$, et l'écart-type est de $0,38 \text{ mm.j}^{-1}$. Cette vitesse de croissance est proche de celle communément admise pour *P. anserina*, soit 7 mm.j^{-1} [10].

A.2 Vitesse globale du mycélium au cours des premières heures de croissance

Dans cette partie, on s'intéresse à la vitesse du mycélium complet en considérant l'ensemble des hyphes individuelles, et non pas le front de croissance du thalle comme dans la partie précédente. L'étude est menée uniquement sur les 20 premières heures de croissance, dans la mesure où le mycélium devient ensuite trop dense pour distinguer chaque hyphe.

L'évolution temporelle de la longueur du mycélium L (voir sections 2.3.3, p.69 et 3, p.73) donne directement accès à la vitesse globale du mycélium V_m au cours du temps, définie ici comme la dérivée de $L(t)$. Les courbes de longueurs sont préalablement lissées à l'aide du filtre Savitzky-Golay (voir section 4.2, p.105). On rappelle que l'incertitude sur L est :

$\sigma_L = \sqrt{(A + N)} \langle \ell \rangle$, avec N le nombre de nœuds et $\langle \ell \rangle$ la longueur d'un segment moyen (voir section 3.2, p.74). Les expériences étant systématiquement réalisées en triplicat, la même procédure est effectuée pour les trois collections de données en conditions standards. L'allure des courbes de la vitesse du mycélium V_m est globalement exponentielle, malgré quelques oscillations ponctuelles (figure A.3).

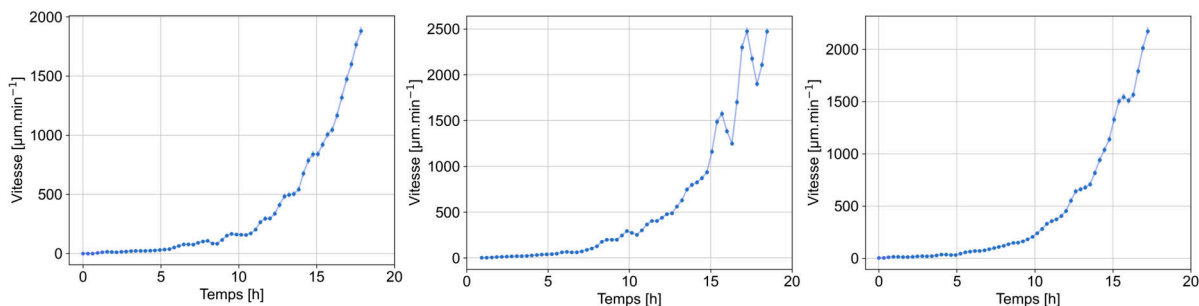


FIG. A.3 – Vitesse du mycélium V_m au cours du temps, calculée en dérivant la courbe d'évolution de la longueur totale du mycélium (lissée). Chaque figure correspond à un réplicat. Les points expérimentaux sont reliés.

La vitesse moyenne d'un apex est calculée par le ratio $V_a(t) = \frac{V_m(t)}{A(t)}$, avec A le nombre d'apex issus de la vectorisation des images (voir section 2.3.3, p.69). La courbe de $A(t)$ est préalablement lissée avec le filtre Savitzky-Golay. L'évolution temporelle de V_a est représentée pour les trois expériences (figure A.4).

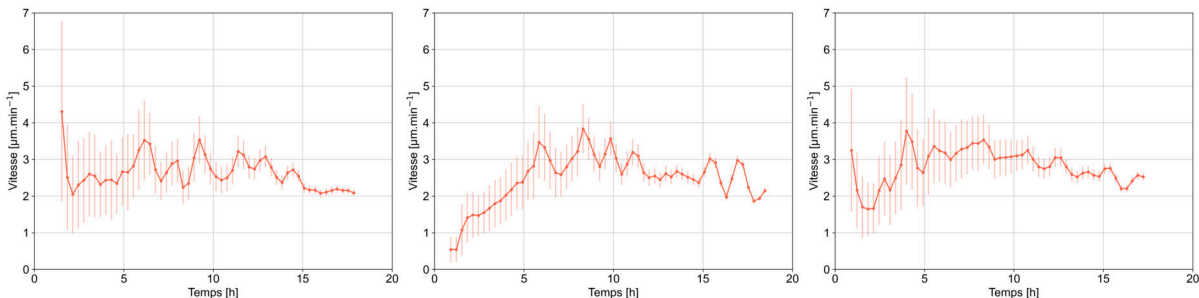


FIG. A.4 – Vitesse moyenne d'un apex $V_a = \frac{V_m}{A}$, avec A le nombre d'apex. La courbe de $A(t)$ est préalablement lissée. Chaque figure correspond à un réplicat.

D'une part, la vitesse moyenne des apex est relativement stable en prenant en compte les barres d'erreur. Des oscillations sont néanmoins observables sur les trois graphes. Afin de vérifier si ce comportement peut être lié à des variations brutales du nombre d'apex A , on représente l'évolution de la grandeur $\Delta_A(t) = \frac{A(t+1) - A(t)}{A(t)}$ (figure A.5). L'incertitude relative au nombre d'apex est $\sigma_A = \sqrt{A}$. Les apex étant très peu nombreux dans les premières heures de croissance, l'erreur associée à Δ_A est particulièrement importante sur les premiers points expérimentaux. Ainsi, la variation du nombre d'apex d'un pas de temps à un autre ne présente pas d'oscillations sensiblement détectables, et ne permet pas de justifier spécifiquement les variations de la vitesse moyenne d'un apex V_a .

D'autre part, sur la quasi-totalité de la durée d'analyse, la vitesse V_a est inférieure à la vitesse typique d'un apex apical $V_{api} = 4,594 \pm 0,007 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ (calculée dans la section 4.2, p.105).

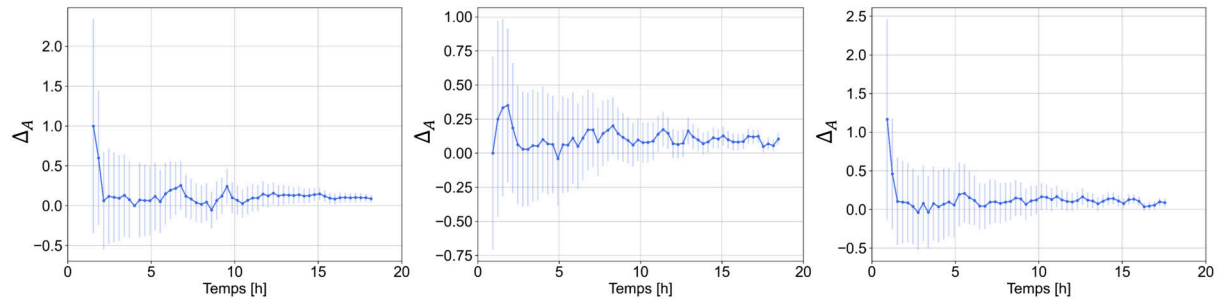


FIG. A.5 – Évolution temporelle de la variation du nombre d'apex $\Delta_A(t) = \frac{A(t+1) - A(t)}{A(t)}$. Chaque figure correspond à un réplicat. Les barres d'erreur sont calculées à partir d'une incertitude sur A telle que $\sigma_A = \sqrt{A}$.

Cette observation s'explique par le fait que la vitesse moyenne par apex V_a est directement impactée par les vitesses réduites des apex latéraux a_{lat} par rapport aux apex apicaux. De plus, lorsque le réseau se densifie, certains apex s'arrêtent spontanément, et participent à la réduction de V_a . Ces interruptions de croissance sont estimées autour de 8% ($N = 280$ apex), en considérant qu'une hyphes ne croît plus lorsque l'apex est immobile jusqu'à la fin de l'expérience (soit au minimum 3 heures).

Cependant, les branches latérales n'interviennent qu'à partir d'une certaine durée de croissance, évaluée à environ 5 heures (voir section 4.3.3, p. 126). L'observation de valeurs de V_a inférieures à V_{api} sur les premières heures de croissance s'explique par le fait que les hyphes directement issues de la germination de l'ascospore connaissent une phase initiale de latence au cours de laquelle elles accélèrent jusqu'à atteindre une vitesse stationnaire dans la gamme de V_{api} (voir section 4.2.3, p. 108).

A.3 Répartition locale des apex

L'étude de la vitesse de croissance décrite dans la section précédente considère l'ensemble des hyphes constituant le mycélium. Cette approche moyenne donc les dynamiques locales et masque les variations éventuelles localisées sur de petites régions du réseau. Ainsi, on s'intéresse ici à la densité locale des apex au sein du mycélium en croissance. Les expériences utilisées comme support de ce travail sont trois réplicats de la croissance de la souche sauvage de *P. anserina* en conditions standards.

A.3.1 Définition d'un maillage

Le densité analysée ici considère la répartition des apex au sein d'un maillage régulier de l'image du mycélium. Le maillage définit un ensemble de cellules carrées de tailles identiques et est centré sur l'ascospore (figure A.7). Cette opération étant effectuée pour la collection d'images successives du mycélium en croissance, l'évolution temporelle du nombre d'apex à l'intérieur d'une cellule est accessible. L'objectif est notamment d'analyser si les dynamiques obtenues sont

similaires d'une cellule à l'autre.

La grandeur A_c représente le nombre d'apex par surface individuelle (cellule) définie par le maillage. Nous nous intéressons à l'évolution temporelle de cette densité locale. Les dimensions des cellules ont été choisies de sorte que les valeurs de A_c ne soient pas trop faibles, ce qui pourrait se produire dans le cas d'un maillage trop fin. Les cellules ne doivent néanmoins pas être trop grandes, au risque de ne pas refléter la densité locale du mycélium. Le choix du maillage s'est porté sur des cellules de 500 px, soit environ un douzième de la largeur de l'image (de forme proche d'un carré). Les résultats présentés ci-dessous sont issus d'une étude avec un maillage de 500 px, délimitant 13×12 cellules. Un travail identique a été réalisé pour un maillage plus fin de 200 px, soit un trentième de l'image, et des observations similaires ont été obtenues.

On notera par ailleurs que l'étude du nombre d'apex peut être considérée comme équivalente à l'étude de la longueur des hyphes présentes dans une cellule. En effet, la trajectoire des hyphes étant globalement rectiligne, les hyphes traversent la cellule, et l'augmentation de la quantité de matière dans celle-ci dépend alors de l'apparition de nouveaux apex sur la surface en question. Ces apex peuvent provenir de branchements sur des hyphes appartenant à la cellule, ou bien de nouvelles hyphes extérieures.

A.3.2 Densité d'apex au sein d'une cellule

Tout d'abord, nous nous focalisons à titre d'exemple sur une cellule définie par le maillage de 500 px, située à trois cellules de l'ascospore. L'évolution du nombre d'apex A_c au cours du temps est représenté sur la figure A.6 A. L'incertitude sur cette grandeur est estimée par $\sqrt{A_c}$, de manière similaire à l'incertitude définie pour le nombre d'apex total A (voir section 3.2, p. 74). L'incertitude sur le temps est évaluée par la durée nécessaire pour réaliser l'acquisition de toutes les images constituant le panorama (l'image du mycélium global, voir section 2.3, p. 68), soit environ 1 minute. Le nombre d'apex A_c est nul sur les 12 premières heures puisque la cellule est initialement vide. Lorsque le premier apex apparaît dans la surface délimitée, A_c commence à croître, et augmente généralement jusqu'à la fin de l'expérience.

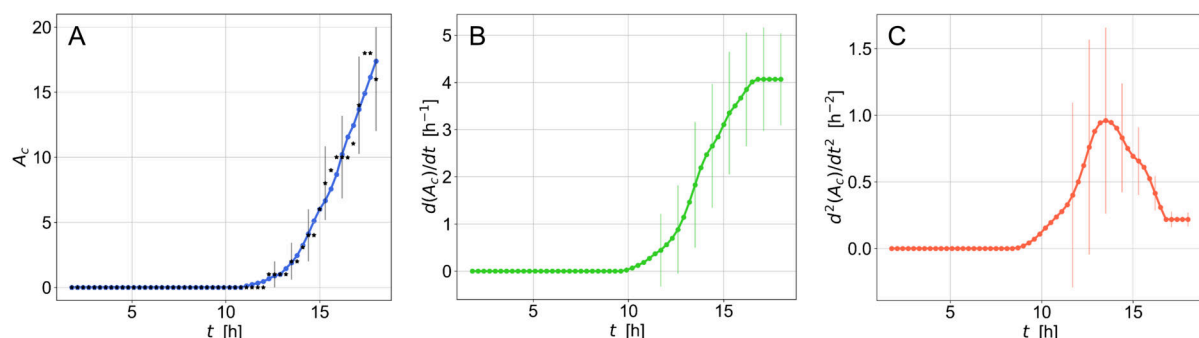


FIG. A.6 – Exemple de l'étude du nombre d'apex A_c sur une cellule de taille 500 px. (A) Évolution temporelle de A_c . Les points expérimentaux sont en noir et les barres d'erreur sont représentées tous les trois points. La courbe bleue est obtenue après lissage. (B) Évolution temporelle de la dérivée de A_c calculée à partir des données lissées. (C) Évolution temporelle de la dérivée seconde de A_c .

D'une part, on cherche à estimer le moment à partir duquel les hyphes envahissent la surface étudiée. Pour cela, on repère le temps t_c pour lequel l'accélération, soit la dérivée seconde de A_c , atteint sa valeur maximale. La courbe A_c est préalablement lissée à l'aide du filtre de Savitzky-Golay, dont les paramètres sont un polynôme d'ordre 1 et une fenêtre de 7 points, ce qui correspond à moyenniser ces derniers. La vitesse (figure A.6 B) est ensuite extraite à partir de la courbe lissée, puis l'accélération (figure A.6 C), dont on repère le temps t_c pour lequel le maximum est atteint (13 heures sur cet exemple).

D'autre part, on extrait également la vitesse de densification v_c à laquelle les apex colonisent la cellule (exprimée en nombre d'apex par unité de temps). Cette grandeur est extraite par le biais d'un ajustement linéaire en considérant les points de la courbe A_c lissée (figure A.6 A) uniquement à partir du temps t_c . Pour cet exemple, $v_c = 3,6 \text{ h}^{-1}$.

A.3.3 Étude du maillage complet

Une procédure identique est appliquée à toutes les surfaces carrées définies par le maillage sur l'image du mycélium complet. Les grandeurs t_c et v_c ont été estimées pour chaque cellule du maillage avec une procédure systématique du fait du grand nombre de surfaces à analyser. Les coefficients de détermination R^2 des ajustements linéaires sont compris dans la gamme 0,5 – 0,98. Un travail d'ajustement plus adapté pour certaines cellules pourrait permettre d'affiner la valeur de v_c extraite.

Les résultats sont synthétisés sur la figure A.7 : la couleur de la cellule indique soit le temps t_c auquel apparaît le premier apex (A), soit la vitesse de densification v_c (B), avec la dernière image du mycélium affichée en surimpression. La répartition spatiale des valeurs de t_c reflète la croissance globalement radiale du mycélium, avec des valeurs faibles pour les cellules proches de l'ascospore, et plus élevées au niveau de la périphérie. Par contre, la dynamique d'apparition des apex dans les cellules ne semble pas suivre le même schéma : les valeurs de v_c sont très hétérogènes d'une cellule à l'autre, et on ne distingue pas de gradient depuis le centre vers la périphérie.

Enfin, la figure A.8 synthétise les résultats obtenus suite à l'étude de trois réplicats en suivant la procédure développée précédemment. La représentation cumule les grandeurs t_c et v_c , ainsi que la distance d mesurée entre le centre du maillage (ascospore) et la cellule étudiée. On retrouve la dynamique de croissance radiale du front de croissance observée précédemment, dans la mesure où les valeurs de t_c sont réparties selon un gradient de couleurs lié à la distance au centre d . En revanche, une large gamme de valeurs de v_c est associée à une même distance d , et donc à un même t_c , reflétant ainsi l'hétérogénéité de la répartition des apex au cours du temps. De plus, les valeurs de v_c élevées ne sont atteignables qu'à partir d'une certaine distance d , ou de manière équivalente à partir d'une certaine valeur de t_c . La densification rapide ne semble donc possible qu'à partir d'un certain stade de développement du mycélium.

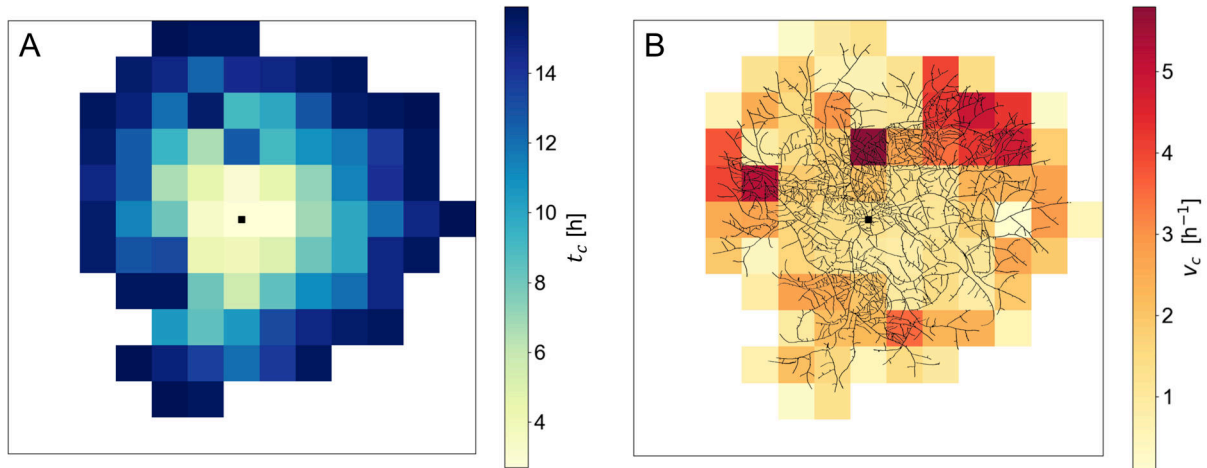


FIG. A.7 – Représentation du maillage centré sur l’ascospore (point noir), qui définit des cellules carrées de 500 px de côté. (A) La couleur de chaque cellule indique la valeur du temps t_c auquel le premier apex apparaît dans la cellule. (B) La couleur de la cellule indique sa vitesse de densification v_c . La dernière image du mycélium est montrée en surimpression.

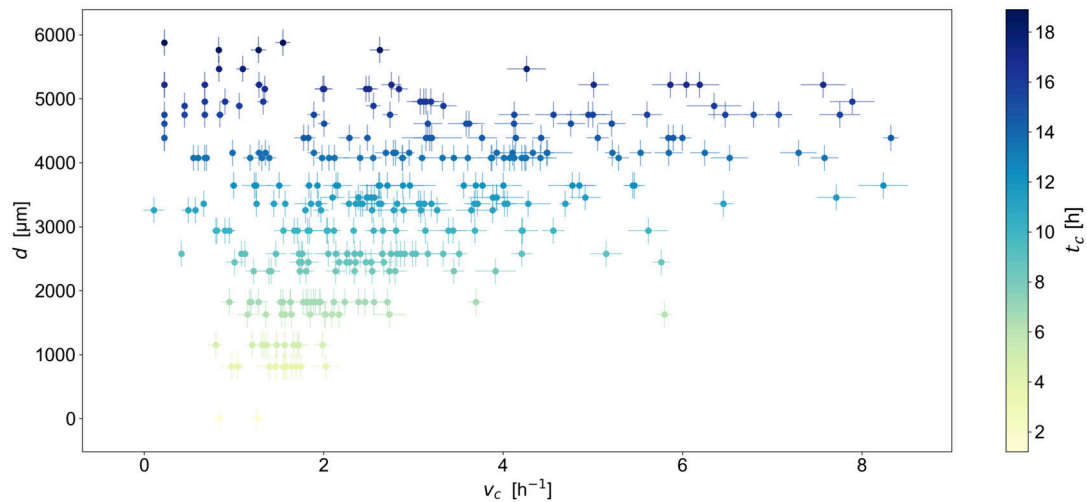


FIG. A.8 – Distance d entre les cellules et le centre du maillage en fonction de v_c . L’incertitude associée à d est estimée à un quart du côté d’une cellule. L’incertitude correspondant à v_c est évaluée grâce à l’ajustement linéaire (un écart-type). La valeur de t_c est indiquée par la couleur du marqueur.

A.4 Conclusion

Si l’observation du thalle à l’échelle macroscopique permet d’estimer la vitesse du front de croissance, cette mesure ne reflète pas la dynamique individuelle de chaque hyphes. La vitesse de croissance peut également être analysée en considérant l’évolution temporelle de la longueur de l’ensemble des hyphes L . Cette approche traduit néanmoins une dynamique moyenne des hyphes, et ne permet pas d’identifier des variations locales de comportement. Nous avons ensuite étudié la répartition locale des apex au sein du mycélium à l’aide d’un maillage régulier, afin de mettre en évidence l’hétérogénéité de la densité locale.

Les résultats obtenus reflètent d’une part la croissance globalement radiale des apex du front de croissance à partir du point initial, l’ascospore. D’autre part, la dynamique de densification

apparaît comme hétérogène sur l'ensemble du mycélium, et la distance au centre ne semble par corrélée à la vitesse de densification. En résumé, il peut être considéré que les hyphes exploratoires se développent radialement depuis l'ascospore centrale, et la densification qui intervient entre ces hyphes principales est plus ou moins rapide en fonction des régions. Le processus de densification est principalement lié aux branchements latéraux, qui interviennent à une distance éloignée de l'apex exploratoire (voir section 4.3, p.118).

La figure A.9 présente un mycélium de *P. anserina* après 48 heures de croissance sur une membrane de cellophane en conditions de culture standards. L'image met en évidence des densités locales variables en fonction des régions au-delà de la durée classiquement fixée de nos expériences (environ 20 heures). L'analyse quantitative (nombre d'apex et longueur du mycélium par exemple) ne peut cependant pas être menée sur de telles images, du fait de la densité trop élevée, qui compromet la distinction des hyphes individuelles.

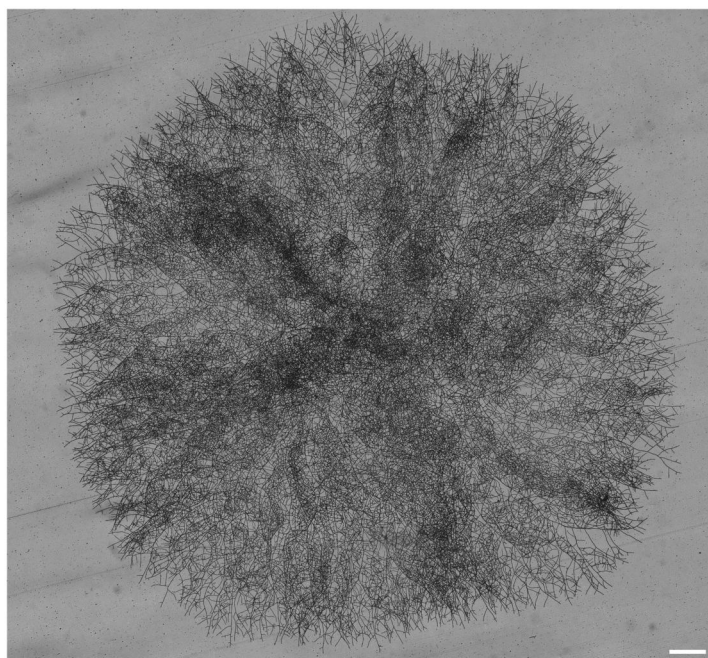


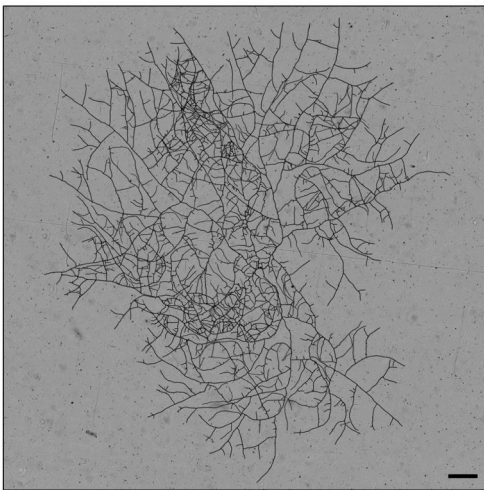
FIG. A.9 – Mycélium de *P. anserina* après 48h de croissance sur membrane de cellophane en conditions standards (barre d'échelle : 1 mm).

Ainsi, nous avons constaté un développement radial du front de croissance de *P. anserina* à la fois sur les 20 premières heures de croissance, mais également à l'échelle macroscopique sur plusieurs jours. *P. anserina* est un champignon ascomycète dont la durée de vie est relativement courte, ce qui ne lui permet pas d'explorer des surfaces très étendues [10]. Son mycélium s'étend circulairement dans toutes les directions, et il ne semble pas capable de s'orienter dans une direction privilégiée. À l'inverse, certains champignons basidiomycètes ont la capacité de favoriser certaines trajectoires, lorsqu'une source de nutriment est rencontrée par exemple, en développant des cordons mycéliens (voir section 1.1.2, p.7) sur de longues périodes de temps. Certaines régions du mycélium peuvent même être recyclées pour alimenter l'extension de nouvelles hyphes [24] [55].

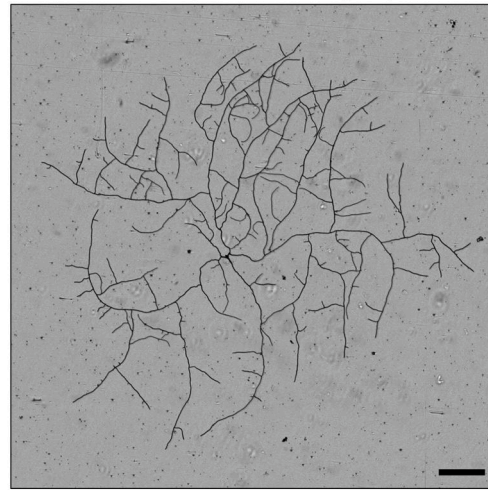
Annexe B

Réseaux mycéliens issus de différentes conditions de culture

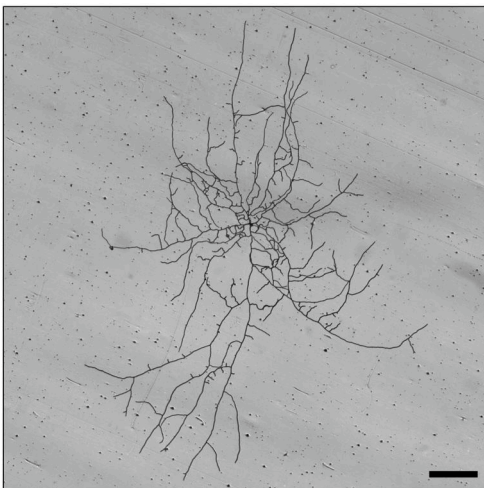
Milieu M2 (conditions standards C1)



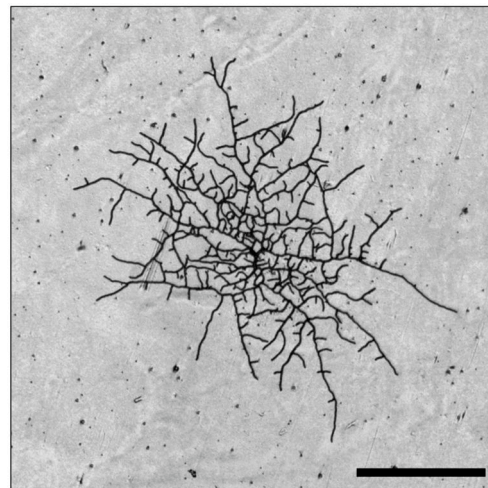
Milieu pauvre M0 (C2)



Milieu M2 + KCl (C3)



Éclairage intense (C4)



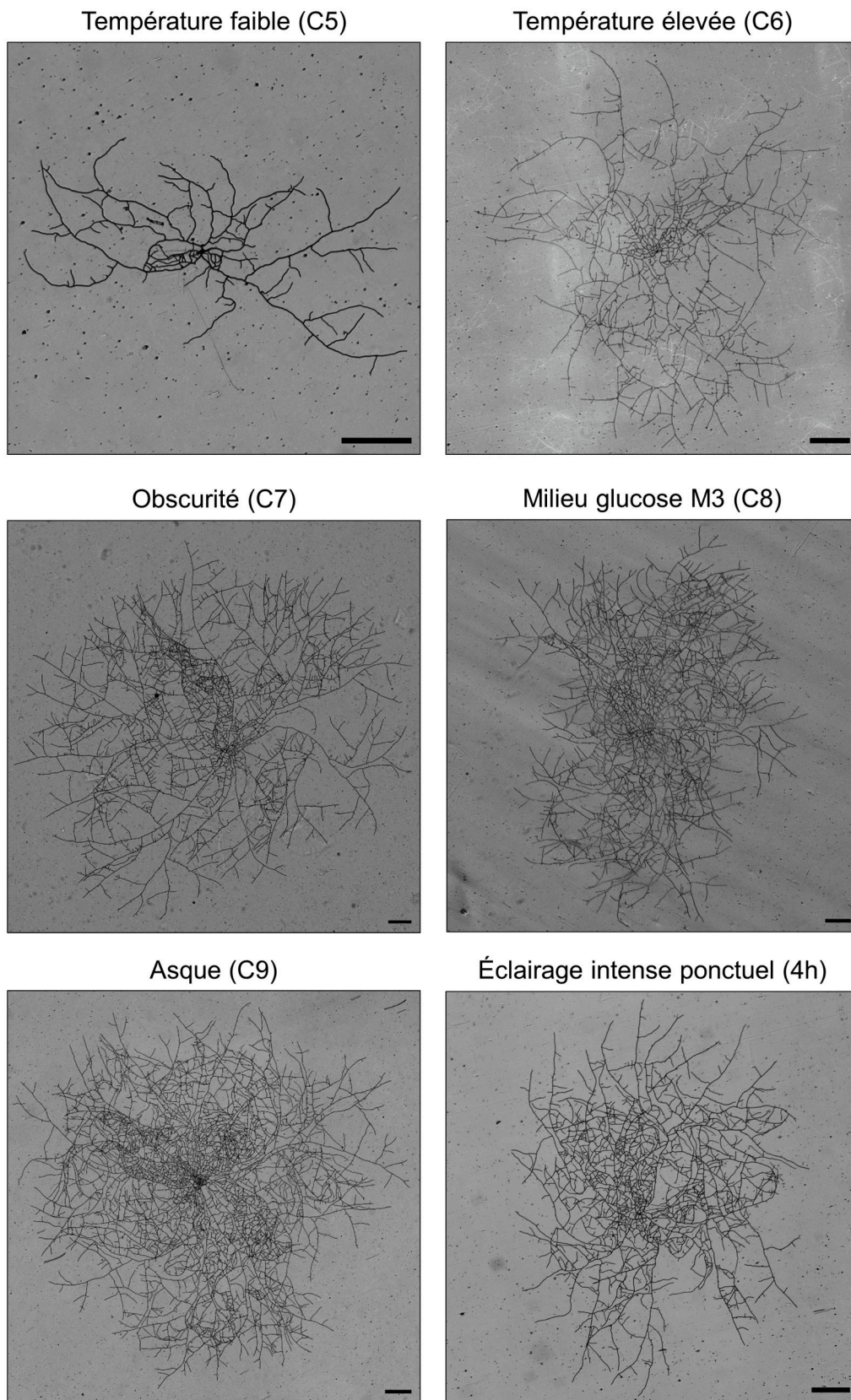


FIG. B.1 – Panoramas obtenus après 17h de croissance dans les différentes conditions de culture étudiées dans ce manuscrit. Les termes associés à chaque panorama renvoient à la condition de culture (voir section 3, p.73). Barres d'échelle : 500 µm.

Annexe C

Ajustements exponentiels des grandeurs A , N , L dans différentes conditions de croissance

TAB. C.1 – Valeurs des paramètres de l'ajustement exponentiel $X(t) = X_0 2^{\frac{(t+t_0)}{\tau_X}}$ (pour $X = A$, N ou L) pour les trois réplicats de chaque condition (voir section 3, p.73). L'incertitude représente un écart-type. L'incertitude sur le temps de décalage t_0 est estimée à 1 heure.

	Exp	t_0 [h]	A_0	τ_A [h]	χ_A^2	N_0	τ_N [h]	χ_N^2	L_0 [mm]	τ_L [h]	χ_L^2
C1	1	0	$2,03 \pm 0,46$	$2,09 \pm 0,12$	3,2	$1,07 \pm 0,35$	$1,68 \pm 0,08$	7,4	$0,84 \pm 0,30$	$2,03 \pm 0,13$	5,7
	2	0,9	$3,01 \pm 0,54$	$2,15 \pm 0,10$	8,2	$1,60 \pm 0,50$	$1,63 \pm 0,06$	7,7	$0,91 \pm 0,31$	$1,95 \pm 0,11$	3,9
	3	0	$2,38 \pm 0,48$	$2,03 \pm 0,11$	2,8	$1,21 \pm 0,37$	$1,57 \pm 0,07$	6,3	$0,88 \pm 0,31$	$1,92 \pm 0,12$	5,5
C2	1	0	$2,46 \pm 0,52$	$2,67 \pm 0,15$	1,1	$1,44 \pm 0,45$	$2,13 \pm 0,10$	3,8	$1,09 \pm 0,38$	$2,67 \pm 0,18$	4,2
	2	0	$2,71 \pm 0,52$	$3,07 \pm 0,17$	5,4	$1,68 \pm 0,52$	$2,50 \pm 0,13$	3,9	$1,05 \pm 0,36$	$2,91 \pm 0,20$	9,4
	3	1,5	$2,70 \pm 0,51$	$3,04 \pm 0,15$	7,6	$1,89 \pm 0,56$	$2,55 \pm 0,11$	4,8	$0,83 \pm 0,29$	$2,80 \pm 0,17$	2,9
C3	1	1,8	$3,01 \pm 0,53$	$3,00 \pm 0,15$	2,6	$1,78 \pm 0,48$	$2,28 \pm 0,09$	10,0	$0,75 \pm 0,26$	$2,75 \pm 0,17$	8,2
	2	0	$1,91 \pm 0,48$	$2,89 \pm 0,24$	4,3	$1,68 \pm 0,57$	$2,13 \pm 0,16$	1,9	$0,45 \pm 0,22$	$2,47 \pm 0,26$	3,7
	3	0	$2,10 \pm 0,38$	$3,06 \pm 0,13$	2,7	$1,34 \pm 0,36$	$2,32 \pm 0,08$	5,0	$0,66 \pm 0,22$	$2,78 \pm 0,15$	1,1
C4	1	2,2	$1,65 \pm 0,57$	$2,66 \pm 0,30$	2,9	$0,61 \pm 0,27$	$1,85 \pm 0,15$	9,4	$0,29 \pm 0,19$	$2,61 \pm 0,42$	3,2
	2	3,7	$2,78 \pm 0,61$	$3,74 \pm 0,28$	4,4	$1,20 \pm 0,38$	$2,65 \pm 0,13$	1,6	$0,39 \pm 0,20$	$3,28 \pm 0,38$	6,8
	3	2,2	$2,81 \pm 0,74$	$3,61 \pm 0,35$	4,1	$1,08 \pm 0,37$	$2,29 \pm 0,14$	5,7	$0,38 \pm 0,21$	$3,13 \pm 0,42$	1,3
C5	1	0	$2,04 \pm 0,45$	$3,50 \pm 0,26$	3,3	$0,80 \pm 0,27$	$2,31 \pm 0,13$	2,9	$0,43 \pm 0,19$	$2,91 \pm 0,27$	9,3
	2	0,9	$2,61 \pm 0,66$	$3,88 \pm 0,39$	7,2	$1,83 \pm 0,61$	$2,73 \pm 0,19$	6,4	$0,79 \pm 0,35$	$3,51 \pm 0,42$	6,0
	3	0,3	$2,58 \pm 0,52$	$3,72 \pm 0,24$	6,8	$1,72 \pm 0,51$	$2,79 \pm 0,14$	2,7	$0,86 \pm 0,31$	$3,35 \pm 0,26$	1,9
C6	1	1,2	$2,52 \pm 0,61$	$1,92 \pm 0,13$	2,8	$1,20 \pm 0,40$	$1,45 \pm 0,07$	4,1	$0,70 \pm 0,30$	$1,91 \pm 0,17$	3,6
	2	2,4	$2,68 \pm 0,68$	$2,12 \pm 0,15$	7,4	$1,68 \pm 0,56$	$1,68 \pm 0,09$	2,7	$0,90 \pm 0,37$	$2,17 \pm 0,19$	1,8
	3	1,6	$3,01 \pm 0,40$	$2,00 \pm 0,08$	2,4	$2,64 \pm 0,54$	$1,70 \pm 0,06$	4,5	$1,01 \pm 0,30$	$2,06 \pm 0,14$	2,8

Annexe C Ajustements exponentiels des grandeurs A , N , L dans différentes conditions de croissance

	Exp	t_0 [h]	A_0	τ_A [h]	χ_A^2	N_0	τ_N [h]	χ_N^2	L_0 [mm]	τ_L [h]	χ_L^2
C7	1	0,3	$2,06 \pm 0,45$	$2,13 \pm 0,11$	3,1	$2,07 \pm 0,58$	$1,62 \pm 0,06$	9,4	$0,41 \pm 0,15$	$1,87 \pm 0,11$	11,0
	2	0,3	$2,42 \pm 0,44$	$1,98 \pm 0,09$	3,5	$1,57 \pm 0,43$	$1,51 \pm 0,05$	1,3	$0,76 \pm 0,25$	$1,85 \pm 0,10$	6,8
	3	0,3	$2,40 \pm 0,49$	$2,00 \pm 0,10$	4,0	$1,19 \pm 0,35$	$1,55 \pm 0,05$	8,2	$0,70 \pm 0,24$	$1,82 \pm 0,10$	8,0
C8	1	1	$2,30 \pm 0,40$	$1,98 \pm 0,08$	5,1	$2,04 \pm 0,54$	$1,65 \pm 0,06$	8,8	$0,71 \pm 0,23$	$1,85 \pm 0,09$	2,9
	2	0	$2,61 \pm 0,49$	$2,06 \pm 0,10$	3,1	$2,10 \pm 0,58$	$1,69 \pm 0,07$	5,4	$0,84 \pm 0,29$	$1,95 \pm 0,12$	6,2
	3	0	$3,39 \pm 0,63$	$2,10 \pm 0,10$	7,2	$2,00 \pm 0,54$	$1,59 \pm 0,06$	1,6	$1,10 \pm 0,36$	$2,00 \pm 0,11$	3,5
C9	1	0,3	$6,58 \pm 1,14$	$2,28 \pm 0,12$	4,8	$6,61 \pm 1,64$	$1,73 \pm 0,06$	2,7	$2,08 \pm 0,62$	$2,07 \pm 0,11$	2,6
	2	0	$5,40 \pm 1,00$	$2,56 \pm 0,15$	5,1	$8,19 \pm 2,04$	$2,08 \pm 0,08$	6,4	$1,85 \pm 0,57$	$2,32 \pm 0,14$	7,0
	3	0,9	$5,40 \pm 0,95$	$2,39 \pm 0,12$	4,9	$9,60 \pm 2,40$	$2,06 \pm 0,08$	1,7	$1,86 \pm 0,56$	$2,18 \pm 0,12$	2,6

Annexe D

Angles de branchement pour différentes conditions de culture

TAB. D.1 – Synthèse des moyennes et des écarts-types des distributions angulaires de θ_e et θ_o pour différentes conditions et différentes souches de *P. anserina*. Seuls les branchements apicaux ont été étudiés, excepté pour C1 latéral. Les valeurs sont issues de moyennes sur trois expériences ($N = 198$, soit 3×66 branchements pour chaque condition). Les incertitudes sur toutes les valeurs sont de 5° . C1 : conditions standards, C2 : milieu pauvre M0, C3 : stress ionique, C4 : stress lumineux, C5 : température faible, C6 : température élevée. S correspond à la souche sauvage, $\Delta 1$ à la souche $\Delta pah1\Delta pah5$, $\Delta 2$ à $\Delta kef1$, $\Delta 3$ à $\Delta PaMpk1\Delta PaMpk2\Delta PaMpk3$. Voir section 5.2, p.151.

Souche	Condition	Moyenne [degré]		Écart-type [degré]	
		θ_e	θ_o	θ_e	θ_o
S	C1 apical	-9	71	9	12
S	C1 latéral	-7	83	11	13
S	C2	-5	69	11	18
S	C3	-1	76	13	19
S	C4	-12	66	16	15
S	C5	-3	70	14	18
S	C6	-1	75	10	14
$\Delta 1$	C1	-6	72	9	12
$\Delta 2$	C1	-7	75	13	18
$\Delta 3$	C1	-7	74	11	15

Bibliographie

- [1] Marcus Roper *et al.* Mycofluidics : The Fluid Mechanics of Fungal Adaptation. en. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 51(1) :511-538, janvier 2019. ISSN : 0066-4189, 1545-4479. DOI : 10.1146/annurev-fluid-122316-045308.
- [2] Fabienne Malagnac *et al.* *Les champignons redécouverts*. Hors collection Nature et Vie Pratique. belin édition, 2013. ISBN : 978-2-7011-5902-7.
- [3] Vera Meyer *et al.* Growing a circular economy with fungal biotechnology : a white paper. en. *Fungal Biol Biotechnol*, 7(1) :5, décembre 2020. ISSN : 2054-3085. DOI : 10.1186/s40694-020-00095-z.
- [4] David Moore *et al.* *21st Century Guidebook to Fungi*. 2011, page 627. ISBN : 9780521186957.
- [5] R. H. Whittaker. New Concepts of Kingdoms of Organisms : Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. en. *Science*, 163(3863) :150-160, janvier 1969. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.163.3863.150.
- [6] Luke L. M. Heaton *et al.* A mechanistic explanation of the transition to simple multicellularity in fungi. en. *Nat Commun*, 11(1) :2594, décembre 2020. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/s41467-020-16072-4.
- [7] Mohammad Bahram *et al.* Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. en. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(2) :fuab058, mars 2022. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1093/femsre/fuab058.
- [8] Philippe Silar. *Protistes Eucaryotes : origine, évolution et biologie des microbes eucaryotes*. fr. Creative Commons, California, 2016. ISBN : 978-2-9555841-0-1. OCLC : 1019558675.
- [9] Gordon W. Beakes *et al.* The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. en. *Protoplasma*, 249(1) :3-19, janvier 2012. ISSN : 0033-183X, 1615-6102. DOI : 10.1007/s00709-011-0269-2.
- [10] Philippe Silar. *Podospora anserina*, 2020. 978-2-9555841-2-5.
- [11] Andrew D. Bowen *et al.* Induction of contour sensing in *Aspergillus niger* by stress and its relevance to fungal growth mechanics and hyphal tip structure. en. *Fungal Genetics and Biology*, 44(6) :484-491, juin 2007. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2006.11.012.
- [12] Abigail C. Leeder *et al.* The social network : deciphering fungal language. en. *Nat Rev Microbiol*, 9(6) :440-451, juin 2011. ISSN : 1740-1526, 1740-1534. DOI : 10.1038/nrmicro2580.
- [13] Christian Ripert. *Mycologie medicale*. Tec & Doc Lavoisier, 2013. ISBN : 978-2-7430-6488-4.
- [14] J. Varga *et al.* Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi. en. *Studies in Mycology*, 69 :57-80, juin 2011. ISSN : 01660616. DOI : 10.3114/sim.2011.69.05.

Bibliographie

- [15] Amir Sanati Nezhad *et al.* The cellular mechanics of an invasive lifestyle. en. *Journal of Experimental Botany*, 64(15) :4709-4728, novembre 2013. ISSN : 1460-2431, 0022-0957. DOI : 10.1093/jxb/ert254.
- [16] Lynne Boddy *et al.* Fungal Ecology : Principles and Mechanisms of Colonization and Competition by Saprotrophic Fungi. en :16, 2016.
- [17] Thomas A. Richards *et al.* Osmotrophy. en. *Current Biology*, 28(20) :R1179-R1180, octobre 2018. ISSN : 09609822. DOI : 10.1016/j.cub.2018.07.069.
- [18] Joseph G. H. Wessels. Tansley Review No. 45 Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. en. *New Phytologist*, 123(3) :397-413, mars 1993. ISSN : 0028-646X, 1469-8137. DOI : 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03751.x.
- [19] Yugo Hayakawa *et al.* Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. en. *Molecular Microbiology*, 81(1) :40-55, juillet 2011. ISSN : 0950-382X, 1365-2958. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2011.07700.x.
- [20] Nick D. Read. Exocytosis and growth do *not* occur only at hyphal tips. en. *Molecular Microbiology*, 81(1) :4-7, juillet 2011. ISSN : 0950-382X, 1365-2958. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2011.07702.x.
- [21] Anum Khan *et al.* Septins and Generation of Asymmetries in Fungal Cells. en. *Annu. Rev. Microbiol.*, 69(1) :487-503, octobre 2015. ISSN : 0066-4227, 1545-3251. DOI : 10.1146/annurev-micro-091014-104250.
- [22] Alexandra Brand *et al.* Mechanisms of hypha orientation of fungi. en. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4) :350-357, août 2009. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2009.05.007.
- [23] S.A. Cantrell *et al.* Unusual fungal niches. en. *Mycologia*, 103(6) :1161-1174, novembre 2011. ISSN : 0027-5514, 1557-2536. DOI : 10.3852/11-108.
- [24] Lynne Boddy *et al.* Fungal network responses to grazing. en. *Fungal Genetics and Biology*, 47(6) :522-530, juin 2010. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2010.01.006.
- [25] Mary Augustina Egbuta *et al.* A Review of the Ubiquity of Ascomycetes Filamentous Fungi in Relation to Their Economic and Medical Importance. en. *AiM*, 06(14) :1140-1158, 2016. ISSN : 2165-3402, 2165-3410. DOI : 10.4236/aim.2016.614103.
- [26] Thomas W Crowther *et al.* Functional and ecological consequences of saprotrophic fungus-grazer interactions. en. *ISME J*, 6(11) :1992-2001, novembre 2012. ISSN : 1751-7362, 1751-7370. DOI : 10.1038/ismej.2012.53.
- [27] Beatriz Águeda *et al.* Mycorrhizal synthesis between *Boletus edulis* species complex and rockroses (*Cistus* sp.) en. *Mycorrhiza*, 18(8) :443-449, octobre 2008. ISSN : 0940-6360, 1432-1890. DOI : 10.1007/s00572-008-0192-3.
- [28] Roman Pachlewski *et al.* Studies of *Cantharellus cibarius*-a mycorrhizal fungus of pine and spruce. *Acta Mycologica*, 31(2) :143-150, 1996.
- [29] Meritxell Riquelme *et al.* Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. en. *Microbiol Mol Biol Rev*, 82(2) :e00068-17, juin 2018. ISSN : 1092-2172, 1098-5557. DOI : 10.1128/MMBR.00068-17.
- [30] Graeme P. Boswell. Modelling combat strategies in fungal mycelia. en. *Journal of Theoretical Biology*, 304 :226-234, juillet 2012. ISSN : 00225193. DOI : 10.1016/j.jtbi.2012.03.036.
- [31] M. R. Islam *et al.* Morphology and mechanics of fungal mycelium. en. *Sci Rep*, 7(1) :13070, décembre 2017. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-017-13295-2.

- [32] Anna Simonin *et al.* Physiological Significance of Network Organization in Fungi. en. *Eukaryot Cell*, 11(11) :1345-1352, novembre 2012. ISSN : 1535-9778, 1535-9786. DOI : 10.1128/EC.00213-12.
- [33] Charles S Hoffman *et al.* An Ancient Yeast for Young Geneticists : A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. en. *Genetics*, 201(2) :403-423, octobre 2015. ISSN : 1943-2631. DOI : 10.1534/genetics.115.181503.
- [34] Robert W. Roberson *et al.* Hyphal Structure. en. In Katherine A. Borkovich *et al.*, éditeurs, *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, pages 8-24. ASM Press, Washington, DC, USA, avril 2010. ISBN : 978-1-55581-473-1. DOI : 10.1128/9781555816636.ch2.
- [35] Levi Yafetto *et al.* Biomechanics of invasive growth by *Armillaria* rhizomorphs. en. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9) :688-694, septembre 2009. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2009.04.005.
- [36] Alexander P. Mela *et al.* Syncytia in Fungi. en. *Cells*, 9(10) :2255, octobre 2020. ISSN : 2073-4409. DOI : 10.3390/cells9102255.
- [37] Otger Campàs *et al.* Strategies for cell shape control in tip-growing cells. en. *American Journal of Botany*, 99(9) :1577-1582, septembre 2012. ISSN : 00029122. DOI : 10.3732/ajb.1200087.
- [38] Fred Chang *et al.* How and why cells grow as rods. en. *BMC Biol*, 12(1) :54, décembre 2014. ISSN : 1741-7007. DOI : 10.1186/s12915-014-0054-8.
- [39] T.G. de Jong *et al.* Modelling fungal hypha tip growth via viscous sheet approximation. en. *Journal of Theoretical Biology*, 492 :110189, mai 2020. ISSN : 00225193. DOI : 10.1016/j.jtbi.2020.110189.
- [40] Roger R. Lew. How does a hypha grow ? The biophysics of pressurized growth in fungi. en. *Nat Rev Microbiol*, 9(7) :509-518, juillet 2011. ISSN : 1740-1526, 1740-1534. DOI : 10.1038/nrmicro2591.
- [41] A. P. J. Trinci *et al.* Tip Growth of Fungal Hyphae. en. *Journal of General Microbiology*, 103(2) :243-248, décembre 1977. ISSN : 0022-1287. DOI : 10.1099/00221287-103-2-243.
- [42] C. A. Aguilar-Trigueros *et al.* Network traits predict ecological strategies in fungi. en. *ISME COMMUN.*, 2(1) :2, janvier 2022. ISSN : 2730-6151. DOI : 10.1038/s43705-021-00085-1.
- [43] I.B. Heath. The Roles of Actin in Tip Growth of Fungi. In K.W. Jeon *et al.*, éditeurs. Tome 123, *International Review of Cytology*, pages 95-127. Academic Press, 1990. DOI : [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60672-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60672-5).
- [44] Norio Takeshita *et al.* Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. en. *Current Opinion in Microbiology*, 20 :34-41, août 2014. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2014.04.005.
- [45] Stephane Douady *et al.* A work on reticulated patterns. en. *Comptes Rendus. Mécanique*, 348(6-7) :659-678, novembre 2020. ISSN : 1873-7234. DOI : 10.5802/crmeca.47.
- [46] Adzкия Salima *et al.* Leaf vein segmentation of medicinal plant using Hessian matrix. en. In *2015 International Conference on Advanced Computer Science and Information Systems (ICACSIS)*, pages 275-279, Depok. IEEE, octobre 2015. ISBN : 978-1-5090-0363-1. DOI : 10.1109/ICACSIS.2015.7415152.
- [47] Solène Song *et al.* Morphogenesis of Gastrovascular Canal Network in Aurelia Jellyfish : possible mechanisms . en, 2022.

Bibliographie

- [48] Marcus Roper *et al.* Fungal Biology : Bidirectional Communication across Fungal Networks. en. *Current Biology*, 29(4) :R130-R132, février 2019. ISSN : 09609822. DOI : 10.1016/j.cub.2019.01.011.
- [49] Busson Valentin *et al.* Emergence of dynamic contractile patterns in slime mold confined in a ring geometry. en. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 55(41) :415401, octobre 2022. ISSN : 0022-3727, 1361-6463. DOI : 10.1088/1361-6463/ac8433. arXiv :2207.13812 [nlin, physics :physics].
- [50] Karen Alim *et al.* Physarum. en. *Current Biology*, 23(24) :R1082-R1083, décembre 2013. ISSN : 09609822. DOI : 10.1016/j.cub.2013.09.040.
- [51] Daniel P Bebbler *et al.* Biological solutions to transport network design. en. *Proc. R. Soc. B.*, 274(1623) :2307-2315, septembre 2007. ISSN : 0962-8452, 1471-2954. DOI : 10.1098/rspb.2007.0459.
- [52] Kristin Aleklett *et al.* Fungal behaviour : a new frontier in behavioural ecology. en. *Trends in Ecology & Evolution*, 36(9) :787-796, septembre 2021. ISSN : 01695347. DOI : 10.1016/j.tree.2021.05.006.
- [53] Robert-Jan Bleichrodt *et al.* Visualising long distance sugar transport in fungi using infrared fluorescence scanning imaging. en. *Fungal Genetics and Biology*, 161 :103699, juillet 2022. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2022.103699.
- [54] Yu Fukasawa *et al.* Ecological memory and relocation decisions in fungal mycelial networks : responses to quantity and location of new resources. en. *ISME J*, 14(2) :380-388, février 2020. ISSN : 1751-7362, 1751-7370. DOI : 10.1038/s41396-019-0536-3.
- [55] M.D. Fricker *et al.* Imaging complex nutrient dynamics in mycelial networks. en. *Journal of Microscopy*, 231(2) :317-331, août 2008. ISSN : 00222720, 13652818. DOI : 10.1111/j.1365-2818.2008.02043.x.
- [56] Robert-Jan Bleichrodt *et al.* Switching from a Unicellular to Multicellular Organization in an *Aspergillus niger* Hypha. en. *mBio*, 6(2) :e00111-15, mai 2015. Reinhard Fischer *et al.*, éditeurs. ISSN : 2161-2129, 2150-7511. DOI : 10.1128/mBio.00111-15.
- [57] Julia Beck *et al.* Woronin bodies, their impact on stress resistance and virulence of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* and their anchoring at the septal pore of filamentous *Ascomycota* : Woronin bodies in the pathogenic mould *A. fumigatus*. en. *Molecular Microbiology*, 89(5) :857-871, septembre 2013. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/mmi.12316.
- [58] Atsushi Tero *et al.* Rules for Biologically Inspired Adaptive Network Design. en. *Science*, 327(5964) :439-442, janvier 2010. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1177894.
- [59] E. C. G. Wille *et al.* Filamentous Fungi Growth as Metaphor for Mobile Communication Networks Routing. en. *Adv. Electr. Comp. Eng.*, 21(2) :59-66, 2021. ISSN : 1582-7445, 1844-7600. DOI : 10.4316/AECE.2021.02007.
- [60] Weipeng Meng *et al.* Cracking to curling transition in drying colloidal films. en. *Eur. Phys. J. E*, 43(10) :64, octobre 2020. ISSN : 1292-8941, 1292-895X. DOI : 10.1140/epje/i2020-11985-4.
- [61] Olivier Devauchelle *et al.* Ramification of stream networks. en. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(51) :20832-20836, décembre 2012. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1215218109.

- [62] Graham W. Gooday. The dynamics of hyphal growth. en. *Mycological Research*, 99(4) :385-394, avril 1995. ISSN : 09537562. DOI : 10.1016/S0953-7562(09)80634-5.
- [63] Adokiye Berepiki *et al.* Actin organization and dynamics in filamentous fungi. en. *Nat Rev Microbiol*, 9(12) :876-887, décembre 2011. ISSN : 1740-1526, 1740-1534. DOI : 10.1038/nrmicro2666.
- [64] Sayumi Fukuda *et al.* Trade-off between Plasticity and Velocity in Mycelial Growth. en. *mBio*, 12(2) :e03196-20, avril 2021. Antonio Di Pietro, éditeur. ISSN : 2150-7511. DOI : 10.1128/mBio.03196-20.
- [65] Meritxell Riquelme. Tip Growth in Filamentous Fungi : A Road Trip to the Apex. en. *Annu. Rev. Microbiol.*, 67(1) :587-609, septembre 2013. ISSN : 0066-4227, 1545-3251. DOI : 10.1146/annurev-micro-092412-155652.
- [66] Norio Takeshita. Coordinated process of polarized growth in filamentous fungi. en. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(9) :1693-1699, septembre 2016. ISSN : 0916-8451, 1347-6947. DOI : 10.1080/09168451.2016.1179092.
- [67] Meritxell Riquelme *et al.* Hyphal ontogeny in *Neurospora crassa* : a model organism for all seasons. en. *F1000Res*, 5 :2801, novembre 2016. ISSN : 2046-1402. DOI : 10.12688/f1000research.9679.1.
- [68] Michelle Momany. Polarity in filamentous fungi : establishment, maintenance and new axes. en. *Current Opinion in Microbiology*, 5(6) :580-585, décembre 2002. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/S1369-5274(02)00368-5.
- [69] Jürgen Wendland. Comparison of Morphogenetic Networks of Filamentous Fungi and Yeast. en. *Fungal Genetics and Biology*, 34(2) :63-82, novembre 2001. ISSN : 10871845. DOI : 10.1006/fgbi.2001.1290.
- [70] Reinhard Fischer *et al.* Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. en. *Mol Microbiol*, 68(4) :813-826, mai 2008. ISSN : 0950-382X, 1365-2958. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2008.06193.x.
- [71] Gero Steinberg *et al.* Cell Biology of Hyphal Growth. en. *Microbiol Spectr*, 5(2) :5.2.30, mars 2017. Joseph Heitman *et al.*, éditeurs. ISSN : 2165-0497. DOI : 10.1128/microbiolspec.FUNK-0034-2016.
- [72] Salomon Bartnicki-Garcia *et al.* Mapping the Growth of Fungal Hyphae : Orthogonal Cell Wall Expansion during Tip Growth and the Role of Turgor. en. *Biophysical Journal*, 79(5) :2382-2390, novembre 2000. ISSN : 00063495. DOI : 10.1016/S0006-3495(00)76483-6.
- [73] Mark D. Fricker *et al.* The Mycelium as a Network. en. *Microbiol Spectr*, 5(3) :5.3.03, mai 2017. Joseph Heitman *et al.*, éditeurs. ISSN : 2165-0497. DOI : 10.1128/microbiolspec.FUNK-0033-2017.
- [74] Meritxell Riquelme *et al.* Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha – a model cell for polarized growth. en. *Fungal Biology*, 115(6) :446-474, juin 2011. ISSN : 18786146. DOI : 10.1016/j.funbio.2011.02.008.
- [75] Roger R Lew. Biomechanics of Hyphal Growth. en :12, 2019.
- [76] Luoyu Wu *et al.* The plasma membrane H⁺-ATPase FgPMA1 regulates the development, pathogenicity, and phenamacril sensitivity of *Fusarium graminearum* by interacting with FgMyo-5 and FgBmh2. en. *Molecular Plant Pathology*, 23(4) :489-502, avril 2022. ISSN : 1464-6722, 1364-3703. DOI : 10.1111/mp.13173.

Bibliographie

- [77] Peng Zhao *et al.* Structure and activation mechanism of the hexameric plasma membrane H⁺-ATPase. en. *Nat Commun*, 12(1) :6439, décembre 2021. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/s41467-021-26782-y.
- [78] Roger R. Lew. Mass flow and pressure-driven hyphal extension in *Neurospora crassa*. en. *Microbiology*, 151(8) :2685-2692, août 2005. ISSN : 1350-0872, 1465-2080. DOI : 10.1099/mic.0.27947-0.
- [79] Salomon Bartnicki-Garcia. Hyphal Tip Growth Outstanding Questions. en. In Heinz Osiewacz, éditeur, *Molecular Biology of Fungal Development*. CRC Press, mai 2002. ISBN : 978-0-203-91071-9. DOI : 10.1201/9780203910719.ch2.
- [80] Valentin Wernet *et al.* Soft but Not Too Soft—How a Rigid Tube Expands without Breaking. en. *mBio*, 12(3) :e00501-21, juin 2021. ISSN : 2150-7511. DOI : 10.1128/mBio.00501-21.
- [81] Max Otto Reinhardt. *Das Wachstum der Pilzhypphen : ein Beitrag zur Kenntniss des Flächenwachstums vegetabilischer Zellmembranen*. G. Borntraeger, 1892.
- [82] J. G. H. Wessels *et al.* Wall Synthesis and Assembly During Hyphal Morphogenesis in *Schizophyllum commune*. en. *Microbiology*, 129(6) :1607-1616, juin 1983. ISSN : 1350-0872, 1465-2080. DOI : 10.1099/00221287-129-6-1607.
- [83] K.C. Herman *et al.* Go with the flow : mechanisms driving water transport during vegetative growth and fruiting. en. *Fungal Biology Reviews*, 41 :10-23, septembre 2022. ISSN : 17494613. DOI : 10.1016/j.fbr.2021.10.002.
- [84] Marcus Roper *et al.* Life as a moving fluid : fate of cytoplasmic macromolecules in dynamic fungal syncytia. en. *Current Opinion in Microbiology*, 26 :116-122, août 2015. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2015.07.001.
- [85] Rukshala Illukkumbura *et al.* Patterning and polarization of cells by intracellular flows. en. *Current Opinion in Cell Biology*, 62 :123-134, février 2020. ISSN : 09550674. DOI : 10.1016/j.ceb.2019.10.005.
- [86] Jens H. Kroeger *et al.* Microfilament Orientation Constrains Vesicle Flow and Spatial Distribution in Growing Pollen Tubes. en. *Biophysical Journal*, 97(7) :1822-1831, octobre 2009. ISSN : 00063495. DOI : 10.1016/j.bpj.2009.07.038.
- [87] Raymond E. Goldstein *et al.* A physical perspective on cytoplasmic streaming. en. *Interface Focus.*, 5(4) :20150030, août 2015. ISSN : 2042-8898, 2042-8901. DOI : 10.1098/rsfs.2015.0030.
- [88] Rosa R. Mouriño-Pérez *et al.* Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. en. *Fungal Genetics and Biology*, 43(6) :389-400, juin 2006. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2005.10.007.
- [89] Salomon Bartnicki-Garcia. Manfred Girbardt and Charles Bracker : outstanding pioneers in fungal microscopy. en. *Nat Rev Microbiol*, 13(1) :52-57, janvier 2015. ISSN : 1740-1526, 1740-1534. DOI : 10.1038/nrmicro3379.
- [90] Gero Steinberg. Hyphal Growth : a Tale of Motors, Lipids, and the Spitzenkörper. en. *Eukaryot Cell*, 6(3) :351-360, mars 2007. ISSN : 1535-9778, 1535-9786. DOI : 10.1128/EC.00381-06.
- [91] Sue L Jaspersen. Anatomy of the fungal microtubule organizing center, the spindle pole body. en. *Current Opinion in Structural Biology*, 66 :22-31, février 2021. ISSN : 0959440X. DOI : 10.1016/j.sbi.2020.09.008.

- [92] Héliciane Palenzuela *et al.* In Vitro Reconstitution of Dynein Force Exertion in a Bulk Viscous Medium. en. *Current Biology*, 30(22) :4534-4540.e7, novembre 2020. ISSN : 09609822. DOI : 10.1016/j.cub.2020.08.078.
- [93] Robert G Orr *et al.* Orchestrating cell morphology from the inside out – using polarized cell expansion in plants as a model. en. *Current Opinion in Cell Biology*, 62 :46-53, février 2020. ISSN : 09550674. DOI : 10.1016/j.ceb.2019.08.004.
- [94] Youssef Chebli *et al.* Transport Logistics in Pollen Tubes. en. *Molecular Plant*, 6(4) :1037-1052, juillet 2013. ISSN : 16742052. DOI : 10.1093/mp/sst073.
- [95] Norio Takeshita *et al.* The Cytoskeleton and Polarity Markers During Polarized Growth of Filamentous Fungi. en. In Dirk Hoffmeister *et al.*, éditeurs, *Biology of the Fungal Cell*, pages 43-62. Springer International Publishing, Cham, 2019. ISBN : 978-3-030-05448-9. DOI : 10.1007/978-3-030-05448-9_3.
- [96] Yainitza Hernández-Rodríguez *et al.* Distinct Septin Heteropolymers Co-Exist during Multicellular Development in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. en. *PLoS ONE*, 9(3) :e92819, mars 2014. Gustavo Henrique Goldman, éditeur. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0092819.
- [97] Rosa R. Mouriño-Pérez. Septum development in filamentous ascomycetes. en. *Fungal Biology Reviews*, 27(1) :1-9, mai 2013. ISSN : 17494613. DOI : 10.1016/j.fbr.2013.02.002.
- [98] Jorge Verdín *et al.* Off the wall : The rhyme and reason of *Neurospora crassa* hyphal morphogenesis. en. *The Cell Surface*, 5 :100020, décembre 2019. ISSN : 24682330. DOI : 10.1016/j.tcs.2019.100020.
- [99] Adriana M. Rico-Ramírez *et al.* Imaging the secretory compartments involved in the intracellular traffic of CHS-4, a class IV chitin synthase, in *Neurospora crassa*. en. *Fungal Genetics and Biology*, 117 :30-42, août 2018. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2018.03.006.
- [100] Yuji Ishitsuka *et al.* Superresolution microscopy reveals a dynamic picture of cell polarity maintenance during directional growth. en. *Sci. Adv.*, 1(10) :e1500947, novembre 2015. ISSN : 2375-2548. DOI : 10.1126/sciadv.1500947.
- [101] Alexander Lichius *et al.* Comparative Live-Cell Imaging Analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* Reveal Novel Features of the Filamentous Fungal Polarisome. en. *PLoS ONE*, 7(1) :e30372, janvier 2012. Alexandra Carolyn Brand, éditeur. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0030372.
- [102] Sarah Taherally *et al.* An image analysis method to survey the dynamics of polar protein abundance in the regulation of tip growth. en. *Journal of Cell Science*, 133(22) :jcs252064, novembre 2020. ISSN : 1477-9137, 0021-9533. DOI : 10.1242/jcs.252064.
- [103] Anna Bergs *et al.* Dynamics of Actin Cables in Polarized Growth of the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. en. *Front. Microbiol.*, 7, mai 2016. ISSN : 1664-302X. DOI : 10.3389/fmicb.2016.00682.
- [104] Meritxell Riquelme *et al.* The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth. en. *MBoC*, 25(8) :1312-1326, avril 2014. Akihiko Nakano, éditeur. ISSN : 1059-1524, 1939-4586. DOI : 10.1091/mbc.e13-06-0299.
- [105] Manfred Girbardt. Die Ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhyphen. *Protoplasma*, 1969.

Bibliographie

- [106] Stanley N. Grove *et al.* Protoplasmic Organization of Hyphal Tips Among Fungi : Vesicles and Spitzenkörper. en. *J Bacteriol*, 104(2) :989-1009, novembre 1970. ISSN : 0021-9193, 1098-5530. DOI : 10.1128/jb.104.2.989-1009.1970.
- [107] Steven D. Harris *et al.* Polarisome Meets Spitzenkörper : Microscopy, Genetics, and Genomics Converge. en. *Eukaryot Cell*, 4(2) :225-229, février 2005. ISSN : 1535-9778, 1535-9786. DOI : 10.1128/EC.4.2.225-229.2005.
- [108] R.W. Roberson. Subcellular structure and behaviour in fungal hyphae. en. *Journal of Microscopy*, 280(2) :75-85, novembre 2020. ISSN : 0022-2720, 1365-2818. DOI : 10.1111/jmi.12945.
- [109] Meritxell Riquelme *et al.* What Determines Growth Direction in Fungal Hyphae ? en. *Fungal Genetics and Biology*, 24(1-2) :101-109, juin 1998. ISSN : 10871845. DOI : 10.1006/fgbi.1998.1074.
- [110] Graham D. Wright *et al.* Optical tweezer micromanipulation of filamentous fungi. en. *Fungal Genetics and Biology*, 44(1) :1-13, janvier 2007. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2006.07.002.
- [111] S. Bartnicki-Garcia *et al.* Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. en. *Protoplasma*, 153(1-2) :46-57, février 1989. ISSN : 0033-183X, 1615-6102. DOI : 10.1007/BF01322464.
- [112] Leonora Martínez-Núñez *et al.* Role of BGT-1 and BGT-2, two predicted GPI-anchored glycoside hydrolases/glycosyltransferases, in cell wall remodeling in *Neurospora crassa*. en. *Fungal Genetics and Biology*, 85 :58-70, décembre 2015. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2015.11.001.
- [113] Zachary S. Schultzhaus *et al.* Endocytosis and exocytosis in hyphal growth. en. *Fungal Biology Reviews*, 29(2) :43-53, juin 2015. ISSN : 17494613. DOI : 10.1016/j.fbr.2015.04.002.
- [114] Jun-ya Shoji *et al.* Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. en. *Current Opinion in Microbiology*, 20 :1-9, août 2014. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2014.03.002.
- [115] Areti Pantazopoulou. The Golgi apparatus : insights from filamentous fungi. en. *Mycologia*, 108(3) :603-622, mai 2016. ISSN : 0027-5514, 1557-2536. DOI : 10.3852/15-309.
- [116] Norio Takeshita *et al.* Pulses of Ca²⁺ coordinate actin assembly and exocytosis for stepwise cell extension. en. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114(22) :5701-5706, mai 2017. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1700204114.
- [117] Miguel Ángel Peñalva. Endocytosis in filamentous fungi : Cinderella gets her reward. en. *Current Opinion in Microbiology*, 13(6) :684-692, décembre 2010. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2010.09.005.
- [118] Blake Commer *et al.* Current views on endocytosis in filamentous fungi. en. *Mycology*, 12(1) :1-9, janvier 2021. ISSN : 2150-1203, 2150-1211. DOI : 10.1080/21501203.2020.1741471.
- [119] Salomon Bartnicki-Garcia *et al.* Experimental measurement of endocytosis in fungal hyphae. en. *Fungal Genetics and Biology*, 118 :32-36, septembre 2018. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2018.07.001.
- [120] Ruth E Falconer *et al.* Biomass recycling and the origin of phenotype in fungal mycelia. en. *Proc. R. Soc. B.*, 272(1573) :1727-1734, août 2005. ISSN : 0962-8452, 1471-2954. DOI : 10.1098/rspb.2005.3150.

- [121] Guillermo Vidal-Diez de Ulzurrun *et al.* Fungal feature tracker (FFT) : A tool for quantitatively characterizing the morphology and growth of filamentous fungi. en. *PLoS Comput Biol*, 15(10) :e1007428, octobre 2019. Timothée Poisot, éditeur. ISSN : 1553-7358. DOI : 10.1371/journal.pcbi.1007428.
- [122] Liselotte De Ligne *et al.* Analysis of spatio-temporal fungal growth dynamics under different environmental conditions. en. *IMA Fungus*, 10(1) :7, décembre 2019. ISSN : 2210-6359. DOI : 10.1186/s43008-019-0009-3.
- [123] G. W. Gooday. An Autoradiographic Study of Hyphal Growth of Some Fungi. en. *Journal of General Microbiology*, 67(2) :125-133, août 1971. ISSN : 0022-1287. DOI : 10.1099/00221287-67-2-125.
- [124] Graeme P. Boswell *et al.* Functional Consequences of Nutrient Translocation in Mycelial Fungi. en. *Journal of Theoretical Biology*, 217(4) :459-477, août 2002. ISSN : 00225193. DOI : 10.1006/jtbi.2002.3048.
- [125] A. P. J. Trinci. The hyphal growth unit of wild type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. en. *Archiv. Mikrobiol.*, 91(2) :127-136, 1973. ISSN : 0302-8933, 1432-072X. DOI : 10.1007/BF00424756.
- [126] A. P. J. Trinci. A Study of the Kinetics of Hyphal Extension and Branch Initiation of Fungal Mycelia. en. *Microbiology*, 81(1) :225-236, janvier 1974. ISSN : 1350-0872, 1465-2080. DOI : 10.1099/00221287-81-1-225.
- [127] Cristina G. Reynaga-Peña *et al.* Analysis of the role of the Spitzenkörper in fungal morphogenesis by computer simulation of apical branching in *Aspergillus niger*. en. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(17) :9096-9101, août 1997. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.94.17.9096.
- [128] David J. Barry *et al.* Morphological quantification of filamentous fungal development using membrane immobilization and automatic image analysis. en. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36(6) :787-800, juin 2009. ISSN : 1367-5435, 1476-5535. DOI : 10.1007/s10295-009-0552-9.
- [129] Gamaliel Sánchez-Orellana *et al.* Automated, continuous video microscopy tracking of hyphal growth. en. *Fungal Genetics and Biology*, 123 :25-32, février 2019. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2018.11.006.
- [130] Stefanie S. Schmieder *et al.* Bidirectional Propagation of Signals and Nutrients in Fungal Networks via Specialized Hyphae. en. *Current Biology*, 29(2) :217-228.e4, janvier 2019. ISSN : 09609822. DOI : 10.1016/j.cub.2018.11.058.
- [131] G. Vidal-Diez de Ulzurrun *et al.* Automated image-based analysis of spatio-temporal fungal dynamics. en. *Fungal Genetics and Biology*, 84 :12-25, novembre 2015. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2015.09.004.
- [132] Huan Du *et al.* Morphological Characterization and Quantification of the Mycelial Growth of the Brown-Rot Fungus *Postia placenta* for Modeling Purposes. en. *PLoS ONE*, 11(9) :e0162469, septembre 2016. Daniel Cullen, éditeur. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0162469.
- [133] Stefan Schmieder *et al.* From three-dimensional morphology to effective diffusivity in filamentous fungal pellets. en. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(12) :3360-3371, décembre 2019. ISSN : 0006-3592, 1097-0290. DOI : 10.1002/bit.27166.

- [134] D.J. Barry *et al.* Microscopic characterisation of filamentous microbes : towards fully automated morphological quantification through image analysis : MICROSCOPIC CHARACTERISATION OF FILAMENTOUS MICROBES. en. *Journal of Microscopy*, 244(1) :1-20, octobre 2011. ISSN : 00222720. DOI : 10.1111/j.1365-2818.2011.03506.x.
- [135] Hassan Khalil *et al.* Morphological growth pattern of *Phanerochaete chrysosporium* cultivated on different *Miscanthus x giganteus* biomass fractions. en. preprint, In Review, juillet 2020. DOI : 10.21203/rs.3.rs-42651/v1.
- [136] Felix Richter *et al.* Fungi-on-a-Chip : microfluidic platforms for single-cell studies on fungi. en. *FEMS Microbiology Reviews* :fuac039, août 2022. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1093/femsre/fuac039.
- [137] Marie Held *et al.* Probing the growth dynamics of *Neurospora crassa* with microfluidic structures. en. *Fungal Biology*, 115(6) :493-505, juin 2011. ISSN : 18786146. DOI : 10.1016/j.funbio.2011.02.003.
- [138] Raghad Soufan *et al.* Pore-Scale Monitoring of the Effect of Microarchitecture on Fungal Growth in a Two-Dimensional Soil-Like Micromodel. en. *Front. Environ. Sci.*, 6 :68, juillet 2018. ISSN : 2296-665X. DOI : 10.3389/fenvs.2018.00068.
- [139] Kristin Aleklett *et al.* Fungal foraging behaviour and hyphal space exploration in micro-structured Soil Chips. en. *ISME J*, 15(6) :1782-1793, juin 2021. ISSN : 1751-7362, 1751-7370. DOI : 10.1038/s41396-020-00886-7.
- [140] Alex Hopke *et al.* Crowdsourced analysis of fungal growth and branching on microfluidic platforms. en. *PLoS ONE*, 16(9) :e0257823, septembre 2021. Richard A Wilson, éditeur. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0257823.
- [141] A. P. J. Trinci *et al.* Occlusion of the septal pores of damaged hyphae of *Neurospora crassa* by hexagonal crystals. en. *Protoplasma*, 80(1-3) :57-67, mars 1974. ISSN : 0033-183X, 1615-6102. DOI : 10.1007/BF01666351.
- [142] H. L. Adams *et al.* The use of image analysis for morphological measurements on filamentous microorganisms. en. *Biotechnol. Bioeng.*, 32(5) :707-712, août 1988. ISSN : 0006-3592, 1097-0290. DOI : 10.1002/bit.260320516.
- [143] Huan Du *et al.* A lattice-based system for modeling fungal mycelial growth in complex environments. en. *Physica A : Statistical Mechanics and its Applications*, 511 :191-206, décembre 2018. ISSN : 03784371. DOI : 10.1016/j.physa.2018.07.051.
- [144] Huan Du *et al.* A 3-variable PDE model for predicting fungal growth derived from microscopic mechanisms. en. *Journal of Theoretical Biology*, 470 :90-100, juin 2019. ISSN : 00225193. DOI : 10.1016/j.jtbi.2019.03.015.
- [145] Timothy C. Cairns *et al.* A quantitative image analysis pipeline for the characterization of filamentous fungal morphologies as a tool to uncover targets for morphology engineering : a case study using aplD in *Aspergillus niger*. en. *Biotechnol Biofuels*, 12(1) :149, décembre 2019. ISSN : 1754-6834. DOI : 10.1186/s13068-019-1473-0.
- [146] Leonardo Peraza-Reyes *et al.* Peroxisomes and sexual development in fungi. en. *Front. Physiol.*, 4, 2013. ISSN : 1664-042X. DOI : 10.3389/fphys.2013.00244.
- [147] Eric Espagne *et al.* The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospira anserina*. en. *Genome Biol*, 9(5) :R77, 2008. ISSN : 1465-6906. DOI : 10.1186/gb-2008-9-5-r77.

- [148] J. Dikec *et al.* Hyphal network whole field imaging allows for accurate estimation of anastomosis rates and branching dynamics of the filamentous fungus *Podospora anserina*. en. *Sci Rep*, 10(1) :3131, février 2020. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-020-57808-y.
- [149] Clara Ledoux *et al.* Prediction and experimental evidence of the optimisation of the angular branching process in the thallus growth of *Podospora anserina*. en. *Sci Rep*, 12(1) :12351, juillet 2022. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-022-16245-9.
- [150] G Rizet. Les phenomenes de barrage chez *Podospora anserina* : analyse genetique des barrages entre les souches s et S. *Rev. Cytol. Biol. Veg*, 13 :51-92, 1952.
- [151] Evelyne Coppin *et al.* Systematic Deletion of Homeobox Genes in *Podospora anserina* Uncovers Their Roles in Shaping the Fruiting Body. en. *PLoS ONE*, 7(5) :e37488, mai 2012. Vishnu Chaturvedi, éditeur. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0037488.
- [152] Sylvie Arnaise *et al.* *pah1* : a homeobox gene involved in hyphal morphology and microconidiogenesis in the filamentous ascomycete *Podospora anserina*. en. *Mol Microbiol*, 39(1) :54-64, janvier 2001. ISSN : 0950-382X, 1365-2958. DOI : 10.1046/j.1365-2958.2001.02163.x.
- [153] Jinane Ait Benkhali *et al.* A Network of HMG-box Transcription Factors Regulates Sexual Cycle in the Fungus *Podospora anserina*. en. *PLoS Genet*, 9(7) :e1003642, juillet 2013. Joseph Heitman, éditeur. ISSN : 1553-7404. DOI : 10.1371/journal.pgen.1003642.
- [154] Hervé Lalucque *et al.* A Non-Mendelian MAPK-Generated Hereditary Unit Controlled by a Second MAPK Pathway in *Podospora anserina*. en. *Genetics*, 191(2) :419-433, juin 2012. ISSN : 1943-2631. DOI : 10.1534/genetics.112.139469.
- [155] Jana Lasser *et al.* NET : a new framework for the vectorization and examination of network data. en. *Source Code Biol Med*, 12(1) :4, décembre 2017. ISSN : 1751-0473. DOI : 10.1186/s13029-017-0064-3.
- [156] Paul Shore *et al.* The MADS-Box Family of Transcription Factors. en. *Eur J Biochem*, 229(1) :1-13, avril 1995. ISSN : 0014-2956, 1432-1033. DOI : 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20430.x.
- [157] Drauzio E.N. Rangel *et al.* Fungal strategies for dealing with environment- and agriculture-induced stresses. en. *Fungal Biology*, 122(6) :602-612, juin 2018. ISSN : 18786146. DOI : 10.1016/j.funbio.2018.02.002.
- [158] Alistair J. P. Brown *et al.* Stress Adaptation. en. *Microbiol Spectr*, 5(4) :5.4.04, août 2017. Joseph Heitman *et al.*, éditeurs. ISSN : 2165-0497. DOI : 10.1128/microbiolspec.FUNK-0048-2016.
- [159] Alene Alder-Rangel *et al.* The Third International Symposium on Fungal Stress – ISFUS. en. *Fungal Biology*, 124(5) :235-252, mai 2020. ISSN : 18786146. DOI : 10.1016/j.funbio.2020.02.007.
- [160] Ying Zhang *et al.* Fungi–Nematode Interactions : Diversity, Ecology, and Biocontrol Prospects in Agriculture. en. *JoF*, 6(4) :206, octobre 2020. ISSN : 2309-608X. DOI : 10.3390/jof6040206.
- [161] A. Donald A’Bear *et al.* Contrasting Effects of Elevated Temperature and Invertebrate Grazing Regulate Multispecies Interactions between Decomposer Fungi. en. *PLoS ONE*, 8(10) :e77610, octobre 2013. Daniel Ballhorn, éditeur. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0077610.

Bibliographie

- [162] Doris Tisch *et al.* Light regulation of metabolic pathways in fungi. en. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85(5) :1259-1277, février 2010. ISSN : 0175-7598, 1432-0614. DOI : 10.1007/s00253-009-2320-1.
- [163] Valérie Gautier *et al.* Important role of melanin for fertility in the fungus *Podospora anserina*. en. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 11(8) :jkab159, août 2021. J Berman, éditeur. ISSN : 2160-1836. DOI : 10.1093/g3journal/jkab159.
- [164] Radames J.B. Cordero *et al.* Functions of fungal melanin beyond virulence. en. *Fungal Biology Reviews*, 31(2) :99-112, mars 2017. ISSN : 17494613. DOI : 10.1016/j.fbr.2016.12.003.
- [165] Michael K. Watters *et al.* A homeostatic set point for branching in *Neurospora crassa*. en. *Mycological Research*, 104(5) :557-563, mai 2000. ISSN : 09537562. DOI : 10.1017/S0953756299001598.
- [166] Steven D. Harris. Branching of fungal hyphae : regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. en. *Mycologia*, 100(6) :823-832, novembre 2008. ISSN : 0027-5514, 1557-2536. DOI : 10.3852/08-177.
- [167] Steven D. Harris. Hyphal branching in filamentous fungi. en. *Developmental Biology*, 451(1) :35-39, juillet 2019. ISSN : 00121606. DOI : 10.1016/j.ydbio.2019.02.012.
- [168] Yoan Coudert *et al.* Design Principles of Branching Morphogenesis in Filamentous Organisms. en. *Current Biology*, 29(21) :R1149-R1162, novembre 2019. ISSN : 09609822. DOI : 10.1016/j.cub.2019.09.021.
- [169] Michael K. Watters *et al.* Tests of a Cellular Model for Constant Branch Distribution in the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. en. *Appl Environ Microbiol*, 67(4) :1788-1792, avril 2001. ISSN : 0099-2240, 1098-5336. DOI : 10.1128/AEM.67.4.1788-1792.2001.
- [170] Meritxell Riquelme *et al.* Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. en. *Fungal Genetics and Biology*, 41(9) :842-851, septembre 2004. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2004.04.006.
- [171] A.P.J. Trinci. Kinetics of apical and lateral branching in *Aspergillus nidulans* and *Geotrichum lactis*. en. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1) :17-IN1, août 1970. ISSN : 00071536. DOI : 10.1016/S0007-1536(70)80091-2.
- [172] Monika S. Fischer *et al.* Communicate and Fuse : How Filamentous Fungi Establish and Maintain an Interconnected Mycelial Network. en. *Front. Microbiol.*, 10 :619, mars 2019. ISSN : 1664-302X. DOI : 10.3389/fmicb.2019.00619.
- [173] N Glass. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. en. *Trends in Microbiology*, 12(3) :135-141, mars 2004. ISSN : 0966842X. DOI : 10.1016/j.tim.2004.01.007.
- [174] Patrick C. Hickey *et al.* Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. en. *Fungal Genetics and Biology*, 37(1) :109-119, octobre 2002. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/S1087-1845(02)00035-X.
- [175] Cynthia L. Araujo-Palomares *et al.* The polarisome component SPA-2 localizes at the apex of *Neurospora crassa* and partially colocalizes with the Spitzenkörper. en. *Fungal Genetics and Biology*, 46(8) :551-563, août 2009. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2009.02.009.
- [176] Camile P Semighini *et al.* Regulation of Apical Dominance in *Aspergillus nidulans* Hyphae by Reactive Oxygen Species. en. *Genetics*, 179(4) :1919-1932, août 2008. ISSN : 1943-2631. DOI : 10.1534/genetics.108.089318.

- [177] Stephanie Herzog *et al.* Cell fusion in *Neurospora crassa*. en. *Current Opinion in Microbiology*, 28 :53-59, décembre 2015. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2015.08.002.
- [178] A.P.J. Trinci *et al.* Spiral growth of mycelial and reproductive hyphae. en. *Transactions of the British Mycological Society*, 73(2) :283-292, janvier 1979. ISSN : 00071536. DOI : 10.1016/S0007-1536(79)80113-8.
- [179] Oier Etxebeste *et al.* Neurons show the path : tip-to-nucleus communication in filamentous fungal development and pathogenesis. en. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(5) :610-624, septembre 2016. Gerhard Braus, éditeur. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1093/femsre/fuw021.
- [180] Nick D Read *et al.* Self-signalling and self-fusion in filamentous fungi. en. *Current Opinion in Microbiology*, 12(6) :608-615, décembre 2009. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2009.09.008.
- [181] Lynne Boddy *et al.* Fractal analysis in studies of mycelium in soil. en :28.
- [182] Graeme P. Boswell. Modelling mycelial networks in structured environments. en. *Mycological Research*, 112(9) :1015-1025, septembre 2008. ISSN : 09537562. DOI : 10.1016/j.mycres.2008.02.006.
- [183] G. Vidal-Diez de Ulzurrun *et al.* Modelling three-dimensional fungal growth in response to environmental stimuli. en. *Journal of Theoretical Biology*, 414 :35-49, février 2017. ISSN : 00225193. DOI : 10.1016/j.jtbi.2016.11.020.
- [184] D. Cross *et al.* Modelling the growth of *Trichoderma virens* with limited sampling of digital images. en. *J Appl Microbiol*, 97(3) :486-494, septembre 2004. ISSN : 1364-5072, 1365-2672. DOI : 10.1111/j.1365-2672.2004.02310.x.
- [185] A. C. Flores-Ortega *et al.* Structural analysis of bio-inspired spatial systems : network efficiency of fractal morphologies. en, mai 2022. arXiv :2205.07151 [cond-mat, physics :physics].
- [186] Graeme P. Boswell *et al.* The Development of Fungal Networks in Complex Environments. en. *Bull. Math. Biol.*, 69(2) :605-634, février 2007. ISSN : 0092-8240, 1522-9602. DOI : 10.1007/s11538-005-9056-6.
- [187] Juliana Hey Coradin *et al.* A three-dimensional discrete lattice-based system for modeling the growth of aerial hyphae of filamentous fungi on solid surfaces : A tool for investigating micro-scale phenomena in solid-state fermentation. en. *Biochemical Engineering Journal*, 54(3) :164-171, mai 2011. ISSN : 1369703X. DOI : 10.1016/j.bej.2011.02.012.
- [188] Nik J. Cunniffe *et al.* Scaling from mycelial growth to infection dynamics : a reaction diffusion approach. en. *Fungal Ecology*, 1(4) :133-142, novembre 2008. ISSN : 17545048. DOI : 10.1016/j.funeco.2008.10.007.
- [189] Christian Brischke *et al.* Modelling the outdoor performance of wood products – A review on existing approaches. en. *Construction and Building Materials*, 66 :384-397, septembre 2014. ISSN : 09500618. DOI : 10.1016/j.conbuildmat.2014.05.087.
- [190] F.A. Davidson. Modelling the Qualitative Response of Fungal Mycelia to Heterogeneous Environments. en. *Journal of Theoretical Biology*, 195(3) :281-292, décembre 1998. ISSN : 00225193. DOI : 10.1006/jtbi.1998.0739.
- [191] H. Yang *et al.* Mathematical model for apical growth, septation, and branching of mycelial microorganisms. en. *Biotechnol. Bioeng.*, 39(1) :49-58, janvier 1992. ISSN : 0006-3592, 1097-0290. DOI : 10.1002/bit.260390109.

Bibliographie

- [192] Audrius Meskkauskas *et al.* Concerted regulation of all hyphal tips generates fungal fruit body structures : experiments with computer visualizations produced by a new mathematical model of hyphal growth. en. *Mycological Research*, 108(4) :341-353, avril 2004. ISSN : 09537562. DOI : 10.1017/S0953756204009670.
- [193] Iestyn Carver *et al.* A Lattice-Free Model Of Translocation-Induced Outgrowth In Fungal Mycelia. en, 2008.
- [194] Steven Hopkins *et al.* Mycelial response to spatiotemporal nutrient heterogeneity : A velocity-jump mathematical model. en. *Fungal Ecology*, 5(2) :124-136, avril 2012. ISSN : 17545048. DOI : 10.1016/j.funeco.2011.06.006.
- [195] Graeme P. Boswell *et al.* Linking hyphal growth to colony dynamics : Spatially explicit models of mycelia. en. *Fungal Ecology*, 1(4) :143-154, novembre 2008. ISSN : 17545048. DOI : 10.1016/j.funeco.2008.10.003.
- [196] Iain G. Johnston *et al.* Symmetry and simplicity spontaneously emerge from the algorithmic nature of evolution. en. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 119(11) :e2113883119, mars 2022. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.2113883119.
- [197] Paula J Cranfill *et al.* Quantitative assessment of fluorescent proteins. en. *Nat Methods*, 13(7) :557-562, juillet 2016. ISSN : 1548-7091, 1548-7105. DOI : 10.1038/nmeth.3891.
- [198] Patrick C Hickey *et al.* Live-cell Imaging of Filamentous Fungi Using Vital Fluorescent Dyes and Confocal Microscopy. en. In *Methods in Microbiology*. Tome 34, pages 63-87. Elsevier, 2004. ISBN : 978-0-12-521534-3. DOI : 10.1016/S0580-9517(04)34003-1.
- [199] Patrick C. Hickey *et al.* Imaging living cells of *Aspergillus in vitro*. en. *Med Mycol*, 47(s1) :S110-S119, janvier 2009. ISSN : 1369-3786, 1460-2709. DOI : 10.1080/13693780802546541.
- [200] Diego Luis Delgado-Álvarez *et al.* Septum Development in *Neurospora crassa* : The Septal Actomyosin Tangle. en. *PLoS ONE*, 9(5) :e96744, mai 2014. Steven Harris, éditeur. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0096744.
- [201] Daniela Justa-Schuch *et al.* Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. en. *Molecular Microbiology*, 76(1) :220-235, avril 2010. ISSN : 0950382X, 13652958. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2010.07093.x.
- [202] Laurent Pieuchot *et al.* Cellular Subcompartments through Cytoplasmic Streaming. en. *Developmental Cell*, 34(4) :410-420, août 2015. ISSN : 15345807. DOI : 10.1016/j.devcel.2015.07.017.
- [203] M Woronin. Zur Entwicklungsgeschichte des *Ascobolus pulcherrimus* Cr. und *Pezizen*. Abh. Senkenb. Naturforsch. 5 : 333-344. *German.*[*Google Scholar*], 1864.
- [204] Marisela Garduño-Rosales *et al.* F-actin dynamics following mechanical injury of *Trichoderma atroviride* and *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 2022.
- [205] Michael Plamann. Cytoplasmic Streaming in *Neurospora* : Disperse the Plug To Increase the Flow ? en. *PLoS Genet*, 5(6) :e1000526, juin 2009. Susan K. Dutcher, éditeur. ISSN : 1553-7404. DOI : 10.1371/journal.pgen.1000526.
- [206] Robert-Jan Bleichrodt *et al.* Selective transport between heterogeneous hyphal compartments via the plasma membrane lining septal walls of *Aspergillus niger*. en. *Fungal Genetics and Biology*, 82 :193-200, septembre 2015. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2015.06.010.

- [207] Alexander Lichius *et al.* Application of Membrane and Cell Wall Selective Fluorescent Dyes for Live-Cell Imaging of Filamentous Fungi. en. *JoVE*, (153) :60613, novembre 2019. ISSN : 1940-087X. DOI : 10.3791/60613.
- [208] Tom D Wolkow *et al.* Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. en :10.
- [209] Xin Xiang. Nuclear movement in fungi. en. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 82 :3-16, octobre 2018. ISSN : 10849521. DOI : 10.1016/j.semcd.2017.10.024.
- [210] Reinhard Fischer. Nuclear movement in filamentous fungi. en. *FEMS Microbiol Rev*, 23(1) :39-68, janvier 1999. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00391.x.
- [211] Rüdiger Suelmann *et al.* Nuclear traffic in fungal hyphae : *in vivo* study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. en. *Molecular Microbiology*, 25(4) :757-769, août 1997. ISSN : 0950-382X, 1365-2958. DOI : 10.1046/j.1365-2958.1997.5131873.x.
- [212] Patrick C Hickey *et al.* Nuclear flow in a filamentous fungus. en :4, 2012.
- [213] Silvia L. Ramos-García *et al.* Cytoplasmic Bulk Flow Propels Nuclei in Mature Hyphae of *Neurospora crassa*. en. *Eukaryot Cell*, 8(12) :1880-1890, décembre 2009. ISSN : 1535-9778, 1535-9786. DOI : 10.1128/EC.00062-09.
- [214] Michael Freitag *et al.* GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. en. *Fungal Genetics and Biology*, 41(10) :897-910, octobre 2004. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2004.06.008.
- [215] Romain Gibeaux *et al.* Mechanism of nuclear movements in a multinucleated cell. en. *MBoC*, 28(5) :645-660, mars 2017. Alex Mogilner, éditeur. ISSN : 1059-1524, 1939-4586. DOI : 10.1091/mbc.e16-11-0806.
- [216] Sylvain Brun *et al.* Courtship Ritual of Male and Female Nuclei during Fertilization in *Neurospora crassa*. en. *Microbiol Spectr*, 9(2) :e00335-21, octobre 2021. Gustavo H. Goldman, éditeur. ISSN : 2165-0497. DOI : 10.1128/Spectrum.00335-21.
- [217] Tao Geng *et al.* Compartmentalized microchannel array for high-throughput analysis of single cell polarized growth and dynamics. en. *Sci Rep*, 5(1) :16111, décembre 2015. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/srep16111.
- [218] Jens Dynesén *et al.* Branching is coordinated with mitosis in growing hyphae of *Aspergillus nidulans*. en. *Fungal Genetics and Biology*, 40(1) :15-24, octobre 2003. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/S1087-1845(03)00053-7.
- [219] Aleksandra Virag *et al.* The Spitzenkörper : a molecular perspective. en. *Mycological Research*, 110(1) :4-13, janvier 2006. ISSN : 09537562. DOI : 10.1016/j.mycres.2005.09.005.
- [220] S. Bolte *et al.* FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. en. *J Microsc*, 214(2) :159-173, mai 2004. ISSN : 0022-2720, 1365-2818. DOI : 10.1111/j.0022-2720.2004.01348.x.
- [221] Alessandra Moscatelli *et al.* Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold. en. *Journal of Cell Science*, 120(21) :3804-3819, novembre 2007. ISSN : 1477-9137, 0021-9533. DOI : 10.1242/jcs.012138.
- [222] S. Fischer-Parton *et al.* Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. en. *J Microsc*, 198(3) :246-259, juin 2000. ISSN : 0022-2720, 1365-2818. DOI : 10.1046/j.1365-2818.2000.00708.x.

Bibliographie

- [223] Meritxell Riquelme *et al.* Spitzenkörper Localization and Intracellular Traffic of Green Fluorescent Protein-Labeled CHS-3 and CHS-6 Chitin Synthases in Living Hyphae of *Neurospora crassa*. en. *Eukaryot Cell*, 6(10) :1853-1864, octobre 2007. ISSN : 1535-9778, 1535-9786. DOI : 10.1128/EC.00088-07.
- [224] Diego L. Delgado-Álvarez *et al.* Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. en. *Fungal Genetics and Biology*, 47(7) :573-586, juillet 2010. ISSN : 10871845. DOI : 10.1016/j.fgb.2010.03.004.
- [225] Rémi Catellier *et al.* A mean-field approach to self-interacting networks, convergence and regularity. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*, 31(13) :2597-2641, 2021. DOI : 10.1142/S0218202521500573. eprint : <https://doi.org/10.1142/S0218202521500573>.
- [226] Milica Tomasevic *et al.* Ergodic behaviour of a multi-type growth-fragmentation process modelling the mycelial network of a filamentous fungus. *ESAIM : Probability and Statistics*, 26 :397-435, décembre 2022. DOI : 10.1051/ps/2022013.

Résumé

Caractérisation multi-échelle de la dynamique de croissance d'un réseau fongique : étude du champignon filamenteux *Podospora anserina*

La forme végétative des champignons filamenteux est constituée par un réseau branchant d'hyphes en croissance, le mycélium. Cette structure dynamique permet la croissance optimale de l'organisme et sa reproduction. Le réseau mycélien est particulièrement efficace pour l'exploration et l'exploitation de son environnement. Dans cette étude, la dynamique de croissance en deux dimensions du champignon filamenteux *Podospora anserina* a été caractérisée par une approche multi-échelle. À partir d'un dispositif de microscopie en champ clair développé au laboratoire, nous obtenons une collection d'images du mycélium, régulièrement réparties sur les 20 premières heures de croissance à partir de la germination d'une ascospore. Les images couvrent l'intégralité de la surface du mycélium (jusqu'à 1 cm), tout en conservant une résolution permettant de distinguer individuellement les hyphes (5 µm). L'analyse du réseau mycélien dans sa globalité s'appuie sur l'extraction de grandeurs dynamiques caractéristiques du développement et de la complexité du réseau : longueur du mycélium, nombre d'apex et de nœuds (connexions entre les hyphes), ou encore surfaces délimitées par les hyphes. Ainsi, les profils de croissance de mycéliums résultant de conditions de croissance variées (contraintes nutritives, lumineuses ou de température) ont été précisément quantifiés. D'autre part, une analyse à l'échelle de l'hyphe (environ 5 µm) a permis de caractériser les vitesses de croissance des apex, la répartition des branchements le long de l'hyphe, et les interactions entre deux branches proches au sein du mycélium. Une distinction claire entre hyphes latérales et apicales a pu ainsi être établie. De plus, en nous appuyant sur une simulation du réseau mycélien de *P. anserina* sous la forme d'un arbre binaire, et calibrée à partir des données expérimentales, nous montrons comment le mycélium optimise extension et densification. Tout d'abord, la distribution observée des angles de branchement apicaux correspond à la maximisation de l'extension radiale et orthoradiale du thalle, tout en minimisant les chevauchements. Dans un deuxième temps, nous montrons que les hyphes latérales maximisent l'exploitation du substrat par croissance radiale de la densité en retard de phase avec le front d'exploration. Enfin, des structures intracellulaires ont été observées par une approche de microscopie en fluorescence. En particulier, la dynamique des noyaux, du Spitzenkörper, et la répartition des septa chez *P. anserina* ont été analysées.

Mots-clés : *Podospora anserina*, mycélium, hyphe, apex, anastomose, réseau fongique, réseau branchant, réseau en croissance, graphe, optimisation sous contraintes

Abstract

Multiscale characterization of the growth dynamics of a fungal network: study of the filamentous fungus *Podospora anserina*

The vegetative form of filamentous fungi is constituted by a branching network of growing hyphae, the mycelium. This dynamical structure allows for the optimal growth and reproduction of the organism. The mycelial network is particularly efficient for the exploration and exploitation of its environment. In this study, the two-dimensional growth dynamics of the filamentous fungus *Podospora anserina* was characterized using a multiscale approach. From a bright field microscopy device developed in the laboratory, we obtain a collection of images of the mycelium, evenly distributed over the first 20 hours of growth from the germination of an ascospore. The images cover the entire surface of the mycelium (up to 1 cm), while keeping a resolution allowing us to distinguish individual hyphae (5 µm). The analysis of the mycelial network as a whole was based on the extraction of dynamical quantities which are characteristic of the development and the complexity of the network: length of the mycelium, number of apexes and nodes (connections between hyphae), or surfaces delimited by hyphae. The growth profiles of mycelia resulting from various growth conditions (nutrient, light or temperature constraints) were precisely quantified. On the other hand, an analysis at the hypha scale (about 5 µm) enabled us to characterize the growth rates of the apexes, the distribution of branches along the hypha, and the interactions between two close branches within the mycelium. A clear distinction between lateral and apical hyphae could be established. Furthermore, based on a simulation of the mycelial network of *P. anserina* in the form of a binary tree, and calibrated from experimental data, we showed how the mycelium optimizes extension and densification. First, the observed distribution of apical branching angles corresponds to the maximization of radial and orthoradial extension of the thallus, while minimizing overlaps. Second, we showed that lateral hyphae maximize substrate exploitation by radial density growth lagging behind the exploration front. Finally, intracellular structures were observed by a fluorescence microscopy approach. In particular, the dynamics of the nuclei, the Spitzenkörper, and the distribution of septa in *P. anserina* were analyzed.

Keywords: *Podospora anserina*, mycelium, hypha, apex, anastomosis, fungal network, branching network, growing network, graph, constrained optimization

Liste des éléments sous droits

Liste de tous les éléments retirés de la version complète de la thèse faute d'en détenir les droits :

- Article « Characterization of spatio-temporal dynamics of the constrained network of the filamentous fungus *Podospora anserina* using a geomatics-based approach », pages 81-98.
- Article « Prediction and experimental evidence of different growth phases of the *Podospora anserina* hyphal network », pages 183-198.