Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Aurèle BOUSSARD

Le 15 octobre 2021

Apprentissage chez Physarum polycephalum : méthodes de quantification des comportements et conditions de mémorisation

---

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

Spécialité : **Ecologie, biodiversité et évolution**

Unité de recherche :
CRCA - Centre de Recherches sur la Cognition Animale

Thèse dirigée par
Audrey DUSSUTOUR

Jury

M. José Halloy, Rapporteur
Mme Christelle Jozet-Alves, Rapporteure
M. Marc Durand, Examinateur
Mme Noélie Davezac, Examinatrice
Mme Audrey DUSSUTOUR, Co-directrice de thèse
M. Alfonso Pérez-Escudero, Co-directeur de thèse

Table des matières

Remerciements 4
Résumé 7
Summary 9
Introduction - Intelligence et monde vivant 12
Intelligences multiples 12
Intelligences humaines 12
Intelligences non humaines 13
La cognition 15
La biologie à l'origine des comportements 15
Les structures qui précédaient l'apparition du système nerveux 17
Sur ce qui est nécessaire et suffisant à la vie 21
La cognition, nécessaire à la vie ? 24
La cognition des organismes aneuraux 26
Introduction - *Physarum polycephalum*, un modèle de cognition aneurale 28
Présentation de l'organisme 28
Cycle de vie et phylogénie 28
Un système auto-organisé 31
Importance du système circulatoire 33
Des comportements orientés vers un objectif 36
Des comportements influencés par d'autres organismes 38
Des capacités de mémoire et d'apprentissage 40
Quand la mémoire affecte la prise de décision 40
Quand l'apprentissage affecte la prise de décision 44
Objectifs 46
Chapitre 1: La composition du substrat dirige les comportements chez *P. polycephalum* 49
Résumé 49
Abstract 52
Introduction 53
Results 55
Homogeneous environment. 55
Spot experiments. 64
Discussion 71
Methods 74
Species. 74
Rearing conditions. 74
Experimental setup. 75
Image processing. 76
Image analysis in space and time. 77
Acknowledgements 80
Author contributions 80
Competing interests 81
Additional information 81
Chapitre 2: Insertion et préservation de la mémoire de l'habituation chez *P. polycephalum*, recherche d'un mécanisme commun. 83
Résumé 83

Abstract 85
Introduction 86
Material and methods 89
Species studied and rearing conditions 89
Mass habituation 89
i) Test for short-term habituation 90
ii) Test for repellent uptake 90
iii) Test for repellent extrusion 91
Long-term habituation 92
i) Test for long-term habituation: bridge crossing test 93
ii) Test for long-term habituation: exploration test 93
iii) Test for uptake of repellent 94
iv) Test for recovery 94
v) Test for repellent extrusion 95
Constrained absorption of repellent 95
Statistical analyses 95
Results 96
Mass habituation 96
i) Slime moulds habituate through mass habituation 96
ii) Slime moulds absorb the repellent during habituation 97
iii) Slime moulds extrude the repellent during recovery 97
Long-term habituation 98
i) Slime moulds retain the habituation through their dormant stage 98
ii) Slime moulds kept the repellent during the dormant stage 99
iii) Slime moulds do not recover during the sclerotization process 101
Constrained absorption of repellent 103
Discussion 104
Short-term habituation and repellent uptake 104
Long-term habituation and repellent storage 105
A simple mechanism 106
Beyond habituation to NaCl 107
Conclusion 108
Chapitre 3: Les rôles potentiels des oscillations dans les capacités et l'apprentissage chez les myxomycètes. 110
Résumé 110
Abstract 114
Introduction 115
Cognitive abilities of *Physarum polycephalum* 119
Physarum polycephalum: a unique model 119
Physarum polycephalum's learning abilities 121
Inferring learning from motion analysis 123
Oscillations in *Physarum polycephalum* 124
Short-period oscillations in *Physarum polycephalum*: the contraction cycle 126
Long-period oscillations in *Physarum polycephalum*: the cell cycle 130
From oscillations to learning 133
Synchronization, a prerequisite 134
Integration of environmental information 136
Maintaining excitability: resting-state activity and self-organized criticality 138

Adaptation and computation 141
Transdisciplinary integration of universal mechanisms and concepts 143
Chapitre 4: Cellects, un logiciel pour quantifier les comportements de cellules géantes. 146
Résumé 146
Abstract 149
Introduction 149
Software capabilities 152
Image analysis methodology 155
Validation 160
Discussion 163
Appendix 1 164
Foreword 164
Detailed workflow 166
i) Determination of optimal segmentation parameters 166
ii) Delineation of arenas 168
iii) Refining the color combinations with the last image 169
iv) Video segmentation 171
iv)a. Determination of first frame 171
iv)b. Video segmentation 171
v) Video post-processing 173
v)a. Basic post-processing 173
v)b. Cell leaving detection 174
v)c. Special error correction algorithms 174
Appendix 2 175
Software capabilities 175
Validation 176
Experimental procedure for the five conditions: 176
Appendix 2 - table 1: Cellects' settings to analyze the five conditions 176
Procedure and results of a second analysis: 177
Data availability 178
Article and author information 178
Author details 178
Funding 180
Acknowledgements 180
Copyright 180
Discussion 182
Apports de la thèse 182
L'habituation, une capacité plastique 185
Existence, mécanisme, et fonction de l'habituation 187
Des systèmes complexes imbriqués à l'origine des capacités cognitives 190
Cognition unicellulaire et cognition neurale 191
Conclusion 195

Remerciements

Je remercie l'encadrante principale de cette thèse, Audrey Dussutour. Elle m'a apporté la possibilité de progresser dans de nombreux domaines et je suis heureux d'avoir eu la chance d'être encadré par une personne avec laquelle il est aussi agréable de travailler. J'ai aussi eu la chance de rencontrer puis d'être co-encadré par Alfonso Pérez-Escudero, qui comme Audrey, a une grande capacité à tirer vers le haut les gens qu'il côtoie. Ces deux encadrants m'ont apporté des approches scientifiques inspirantes et complémentaires, je les remercie aussi pour leurs conseils et leurs qualités humaines.

Pour leurs conseils, je remercie également les membres de mon comité de thèse, Laure Verret et François-Xavier Dechaume-Moncharmont. D'ailleurs, je remercie ce dernier ainsi que Maryse Charbonnier, Eric Finot, Sabine Aji, Loïc Bollache, Bruno Faivre et d'autres pour avoir été des professeur.es dont j'ai trouvé l'approche pédagogique géniale.

Je remercie Christelle Jozet-Alves et José Halloy pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie aussi Marc Durand et Noélie Davezac pour leur participation en tant que jury de cette thèse.

Je remercie particulièrement tous les étudiants qui m'ont aidé au cours de cette thèse : Julie Delescluse, Pauline Vinet, Maxence Mougon, Edgar Dusacre, Audrey Bizet, Kim Bourbon, Charlotte Dupont, Paul-Antoine Badon, Elysa Antoine, Sébastien Autret et Antonin Chenel. Je les remercie pour leur investissement et leur rigueur dans un travail qui ne garantit que très rarement les résultats auxquels on s'attend.

Je tiens aussi à remercier tous les collègues de labo et de bureau qui m'ont aidé et avec qui j'ai passé d'excellents moments, parfois en dehors du lieu de travail.

Je remercie d'abord Ana Moran, pour tous les moments de complicité que l'on a eu dans les bureaux que l'on a partagés. Mention spéciale à Florent Le Moël qui m'a fait découvrir les joies de l'orienté objet en python. Merci à Matthias Durieux qui m'a inspiré sur la manière de bien vivre l'expérience de la thèse. Je remercie aussi Patrick Arrufat pour m'avoir appris quelques trucs en électronique et en programmation d'Arduino et pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. Merci à Léo Clément pour avoir partagé ton travail sur les transformées de Fourier. Merci à Mathieu Kunetz pour ta réaction suite au décès de ton ordinateur, décès qui est fortuitement survenu au moment où il faisait tourner mon code… Merci Mathilde Lacombrade pour tes livres et pour ta sérénité en matière de balcon brisé. Merci à Marion Prodéo et Léa Bihl pour leurs façons d'être au bureau, toujours avec une bonne dose de second degré, et un réel soutien.

Enfin, je remercie chaleureusement tous ceux avec qui j'ai eu les discussions les plus profondes ou intéressantes ou/et avec qui j'ai simplement passé les meilleurs moments de ma vie : Christelle et Coralie Boussard, Iris et Alexis Kolivanoff, Michael Radlo, Jean-Jacques Ponciano, Jérémy Devayres, Valentin Viennot, Cédric Verger, Éric Matagne, Kevin Carteret, Hugo Keirsse, Maud Brigand, Élodie Gouget, Élise Deschamps, Marie Schweighoffer, Thomas Greuez, Thomas Valon, Xavier Carrara, Alexis Wos, Romain Hudeley, Pauline Piquet, Marie et Camille Bussière, Benoît Fromont, Kevin Likhtart, Léo Nicolle, Hélène Burgy, Thibault Leroi, Isis Lecam, Camille Chéron, Hélène Cortot, Simon, Rémy Kerlouégan, Quentin Bodereau, Rémy Benredjem, Guillaume Ferrandes, Benoit Ferrandes, Estelle Ferrandes, Marion Burelle, Pélo, Jackie, Loïc Boussard, Marianne Ramel, Cécile Lacaze, Hanifa Bouziri, Andy Planche, César et Gabin Colombini, Martin Niaufre, Robin et Vivien Strudel, Rémi et Ludovic Giorno, Théo Le Garrec, Alexandre Van Der Marlière, Quentin Chassery, Roch D'aigremont, Robin Franz, Déborah Federico, Océane La Loggia, Louise Prévot, Élodie Le Quellec, Galice Kalonji, Thibault Casano, Céline Kaléido, Maximilien Cosme, Johanna Girodolle, Damien Gergonne, Laura Fargeot, Julia Dayon, Tiago Antonio Goncalves-Zeferino, Alexandre Réjault, Louise Bestea, Mélanie Debelgarric,

Antoine Wystrach, Adam Bernard, Claire Latapie, Axel Dresen, Fares Sayegh, Lise Lecroq. Je remercie aussi mes parents et toute ma famille.

Résumé

Lorsqu'ils ne peuvent pas être décrits par le langage, les concepts comme l'intelligence, la cognition ou l'apprentissage ne peuvent se manifester qu'à travers les comportements. L'éthologie est le domaine d'étude des comportements des animaux. Ce travail a la particularité d'utiliser cette approche pour étudier un organisme unicellulaire. Qu'un comportement soit effectué par un organisme unicellulaire ou un animal, on s'attend à ce qu'il soit régi par des processus biologiques. Cette dépendance des comportements -tels que nous les définissons- aux processus biologiques nous amène à poser la question des éléments nécessaires et suffisants à la vie. Les êtres vivants possèdent tous un ensemble de capacités leur permettant de répondre à des contraintes environnementales variables. Aussi universelles soient-elles, nous considérons que ces capacités sont cognitives et nous les étudions chez les organismes les plus simples. Nous explorons en particulier le fonctionnement d'un Myxomycète unicellulaire : *Physarum polycephalum*. Après avoir exposé ses principales caractéristiques morphologiques et physiologiques, nous présentons certaines de ces capacités que nous appelons cognitives. Cette thèse a pour objectif de mieux comprendre une capacité en particulier : l'habituation. Nous avons étudié son fonctionnement, découvert de nouvelles manières de la détecter et de nouvelles situations où l'observer. Dans le premier chapitre, nous illustrons la variabilité comportementale dont fait preuve cet organisme dans différents contextes chimiotactiques. Lorsqu'il est directement sur un substrat contenant du chlorure de sodium (NaCl) une substance aversive, *P. polycephalum* produit une réponse comportementale caractéristique : il se déplace lentement et tente de minimiser sa surface de contact avec le substrat. Dans le second chapitre nous avons étudié des situations dans lesquelles cette réponse comportementale caractéristique de l'aversion au NaCl diminue. C'est le cas lorsque *P. polycephalum* est exposé à un substrat aversif de façon répétée, et nous appelons ce phénomène : habituation. Après avoir mis au point un nouveau protocole provoquant ce phénomène, nous avons observé pour la première fois que

la mémoire de l'habituation était conservée lors d'une phase desséchée et immobile -dite de dormance. Enfin, nous avons découvert un lien entre le degré d'habituation des individus et leur contenu interne en sodium (le cation du couple NaCl auquel ils sont habitués). Cela nous a mené à chercher à manipuler ce contenu interne. La dernière expérience de ce chapitre démontre qu'il suffit de déposer de l'eau contenant du NaCl sur les cellules pour provoquer le comportement caractéristique de l'habituation. Le troisième chapitre porte sur l'une des caractéristiques les plus surprenantes de cette cellule : sa capacité à produire un flux intracytoplasmique oscillant. *P. polycephalum* présente plusieurs systèmes oscillatoires qui interagissent les uns avec les autres. Même si ces systèmes émergent de processus physico-chimiques propres à la cellule, ils sont impactés par l'environnement de celle-ci. D'une part, la modification des phénomènes oscillatoires par l'environnement peut être un moyen pour la cellule de mesurer celui-ci. D'autre part, les interactions entre systèmes oscillatoires peuvent être un moyen pour la cellule de traiter une information et d'y répondre de manière pertinente. Plus particulièrement, nous explorons la manière avec laquelle ces systèmes pourraient expliquer un phénomène d'apprentissage comme l'habituation. Dans le quatrième et dernier chapitre, nous rassemblons les méthodes objectives et répétables que nous avons utilisées pour étudier les comportements de *P. polycephalum* au sein d'un logiciel ouvert et simple d'utilisation. Ce logiciel est conçu pour fonctionner dans des conditions variées: de l'étude de la croissance de colonies de bactéries aux caractéristiques oscillatoires du flux intracytoplasmique de *P. polycephalum*.

Summary

When they cannot be described through language, concepts like intelligence, cognition or learning can only manifest through behavior. Ethology is the field of study of animal behavior. This work has the particularity of using this approach to study a unicellular organism. Whether a behavior is carried out by a single-celled organism or an animal, it is expected to be governed by biological processes. This dependence of behaviors - as we define them - on biological processes leads us to ask the question of the necessary and sufficient elements for life. Living beings all possess a set of capacities that allow them to respond to variable environmental constraints. As universal as they are, we consider that these capacities are cognitive and we study them in the simplest organisms. We explore the functioning of a unicellular Myxomycete: *Physarum polycephalum*. After having exposed its main morphological and physiological characteristics, we present some capacities that we call cognitive. This thesis aims at better understanding one particular capacity named habituation. We have studied how it works, discovered new ways to detect it and new situations in which to observe it. In the first chapter, we illustrate the behavioral variability exhibited by this organism in different chemotactic contexts. When directly on a substrate containing the aversive substance sodium chloride (NaCl), *P. polycephalum* produces a characteristic behavioral response: it moves slowly and attempts to minimize its surface area in contact with the substrate. In the second chapter, we studied situations in which this characteristic behavioral response of aversion to NaCl decreases. This is the case when P. polycephalum is repeatedly exposed to an aversive substrate, and we call this phenomenon: habituation. After developing a new protocol to induce this phenomenon, we observed for the first time that the memory of habituation was retained during a dry and immobile phase - a dormant phase. Finally, we discovered a link between the degree of habituation of individuals and their internal sodium content (the cation of the NaCl couple to which they are habituated). This led us to seek to manipulate this internal content. The last experiment in this chapter demonstrates that depositing water containing

NaCl directly on the cells is sufficient to induce the typical behavior of habituation. The third chapter focuses on one of the most surprising features of this cell: its ability to produce an oscillatory intracytoplasmic flow. *P. polycephalum* exhibits several oscillatory systems that interact with each other. Even if these systems emerge from physico-chemical processes specific to the cell, they are impacted by the environment of the cell. On the one hand, the modification of oscillatory phenomena by the environment can be a way for the cell to measure it. On the other hand, the interactions between oscillatory systems can be a way for the cell to process information and to respond to it in a relevant way. In particular, we explore how these systems could explain a learning phenomenon like habituation. In the fourth and final chapter, we bring together all objective and repeatable methods we have used to study the behaviors of *P. polycephalum* into an open and easy-to-use software. This software is designed to operate under a variety of conditions: from the study of the growth of bacterial colonies to the oscillatory characteristics of the intracytoplasmic flow of *P. polycephalum*.

Introduction

Introduction - Intelligence et monde vivant

Intelligences multiples

Intelligences humaines

Nous allons tenter d'approcher, avec le regard d'un éthologue se penchant sur un unicellulaire, la question de l'intelligence. Que l'on s'intéresse à l'intelligence de notre espèce ou de celles qui nous entourent, on remarque de grandes variations. On réduit souvent l'intelligence à la capacité à résoudre des problèmes logiques ou à apprendre mais cela ne résume pas toutes les situations.

Commençons par l'exemple le plus accessible à notre compréhension : celui des êtres humains. L'intelligence humaine peut avoir des formes très variées. Elle peut être liée au langage et se manifester via l'éloquence, l'empathie, la capacité à diriger, à manipuler ou à modérer. A ces formes d'intelligence liées au langage humain s'ajoutent aussi les intelligences liées à l'utilisation du corps et des sens : le savoir-faire, les prodiges des athlètes ou des artistes, leur capacité à s'inspirer de leur société pour en nourrir la culture. Cette liste d'exemples n'est pas exhaustive mais démontre que les formes d'intelligence sont plurielles. De plus, elles sont liées dans leur fonctionnement comme dans leur raison d'être (i.e. le comment et le pourquoi). Ces liens deviennent évident lorsque l'on regarde ce problème à plusieurs échelles. A l'échelle individuelle, les différentes formes d'intelligence partagent certains éléments constitutifs (des messagers chimiques, électriques, des structures cellulaires ou organiques communes...). A l'échelle inter-individuelle, l'organisation en société d'intelligences individuelles conduit à des formes d'intelligence collectives. Toute création ou savoir humain dépend de liens microscopiques à l'échelle individuelle et de liens macroscopiques à l'échelle interindividuelle.

Les éléments nécessaires à notre intelligence sont nombreux et existent à plusieurs échelles. C'est aussi le cas pour les organismes non humains même si notre compréhension de leur intelligence peut s'avérer complexe.

Intelligences non humaines

Chez l'humain, le concept d'intelligence peut avoir de nombreuses significations. L'existence du langage nous permet toutefois de définir précisément ce que l'autre veut dire dans une situation donnée. Même si l'autre n'utilise pas de mots, on peut définir ses comportements en observant ses actes ou son langage corporel. Cette capacité, très efficace pour les comportements humains, est de moins en moins fiable à mesure que l'on s'intéresse à des organismes éloignés de l'espèce humaine. De fait, nous avons tendance à mieux comprendre ceux de notre espèce, nous sommes naturellement anthropocentristes. Ce biais existe à l'échelle de l'espèce mais aussi à l'échelle du groupe et même de l'individu. Ainsi, si l'on définit l'égocentrisme comme une meilleure compréhension de soi-même que des autres, on peut définir l'ethnocentrisme comme une meilleure compréhension des individus de son groupe que des individus des autres groupes, et l'on peut définir l'anthropocentrisme comme une meilleure compréhension des individus de sa propre espèce que des individus appartenant à d'autres espèces. La réduction de ces biais commence par améliorer la façon avec laquelle on représente une intelligence différente de la nôtre.

Concevoir une autre intelligence nécessite d'abord de se mettre à la place de celle-ci dans son environnement, de concevoir son Umwelt (von Uexküll 1934). Comme les animaux non humains ont une grande proximité génétique avec nous, nous partageons de nombreux points communs. Leur taille, leur vitesse de déplacement et, pour certains, leur capacité à communiquer avec nous, sont autant de facteurs facilitant notre capacité à concevoir leur intelligence. Pourtant, l'expérience de certaines de leurs capacités sensorielles nous est inaccessible. C'est le cas, par exemple, de l'écholocation (Thomas et al. 2004) ou de la détection des champs électriques et magnétiques (Anderson et al. 2017). Ces capacités doivent procurer une perception du monde particulière aux animaux qui les utilisent. Pourtant, comprendre leurs intelligences nécessite une représentation de cette perception. Cela s'applique aussi aux organismes qui ne sont pas des animaux.

Ces organismes peuvent avoir une taille microscopique (e.g. les amibes) et une vitesse de déplacement ou de croissance très lente (e.g. les végétaux). Cela rend leurs actions invisibles et complexifie notre compréhension de leurs fonctionnements. Avant d'avoir démontré qu'il fallait que des insectes pondent pour que des larves se développent (Francesco Redi 1668), on pensait que ces animaux apparaissaient de manière spontanée. C'est aussi ce que l'on pensait à propos des micro-organismes avant que Louis Pasteur (1879) ne démontre que faire bouillir de la viande dans une flasque fermée empêche l'apparition des micro-organismes dans celle-ci. La génération spontanée est simple à comprendre mais n'apporte aucune explication. En science, il y a toujours un compromis entre l'apport explicatif d'une théorie et sa simplicité. Selon le principe de parcimonie ou Rasoir d'Ockham, plus une explication invoque de mécanismes (ou d'hypothèses) non documentés, moins elle devrait être adoptée. Ce fonctionnement impose la rigueur d'accumuler des preuves pour défendre une théorie plus complexe. Les expériences de Francesco Redi et Louis Pasteur ont mis en lumière des contraintes sur les capacités de micro-organismes qui étaient mal comprises jusque-là. Une fois ces capacités découvertes, nous pouvions commencer à mieux les comprendre en étudiant leur mécanisme et leur fonction. De plus, les êtres vivants sont si diversifiés dans leur structure qu'une même capacité peut avoir des mécanismes et des fonctions différentes, selon l'organisme auquel on s'intéresse. Prenons l'exemple de la nage chez deux organismes très éloignés: un Mammifère marin, le rorqual commun et un Cnidaire que l'on connaît sous une forme presque immobile mais dont les larves peuvent nager: le corail. Ces deux organismes ont la même capacité à nager et pourtant ils le font différemment et pour des raisons différentes. Alors que le rorqual utilise ses nageoires, la larve de corail nage à la façon d'une méduse. Enfin, le premier nage pour se nourrir en filtrant l'eau et le second nage pour disperser et trouver un endroit où se fixer et se développer. Ce raisonnement peut s'appliquer à toutes les capacités, si tant est que l'on s'intéresse à des organismes suffisamment phylogénétiquement éloignés. Dans cette thèse nous allons nous

intéresser à la découverte et à l'étude des mécanismes à l'origine de capacités intelligentes, ce domaine de recherche s'appelle la cognition.

La cognition

Dans cette partie, nous aborderons la question de la définition de la cognition. Il s'agira d'évaluer la validité de l'utilisation de ce terme pour des systèmes de plus en plus simples. Pour ce faire, nous allons commencer par définir et décrire le fonctionnement des comportements chez les organismes dotés d'un système nerveux. Nous allons les appeler neuraux, par opposition aux organismes aneuraux: qui n'ont pas de système nerveux.

La biologie à l'origine des comportements

Dans le langage courant, on peut utiliser le mot comportement dans deux situations. On peut l'utiliser pour qualifier les mouvements particuliers d'un animal comme les parades d'un paradisier, et on peut l'utiliser comme un mécanicien l'utiliserait pour décrire la réaction bruyante d'un moteur dans une condition extrême. Si l'on recherche la différence entre ces deux utilisations du mot "comportement", on se rend compte que dans un cas le moteur ne fait que réagir d'une manière stéréotypique à une condition tandis que dans l'autre cas, le paradisier génère de nombreux mouvements qui ne semblent pas prédéterminés par une situation aussi contrainte que celle du moteur. Pourtant, les comportements des animaux ont longtemps été considérés comme déterminés par les rouages d'une machine (Descartes au XVIIème siècle avec les animaux machines) et plus tard par un code génétique. Cette tendance s'explique par une volonté de faire de la biologie une science similaire à la physique, i.e. une science pour laquelle les équations maîtresses permettent de prédire avec une grande précision le devenir d'un système donné. Selon ce programme, nous pourrions utiliser le code génétique du paradisier pour prédire chaque mouvement, chaque son, chaque changement de couleur exécutés lors de sa parade. Seulement, le code génétique à lui seul ne permet aucune

prédiction à ce niveau de précision. De plus, tous les organismes vivants contiennent des systèmes issus du code génétique lui-même qui ont pour rôle de générer de l'aléatoire, i.e. de faire de la variation non déterminée (Raser et al. 2005). Même si la variation biologique était complètement déterminée : la complexité des éléments qui la génèrent suffirait à la rendre imprédictible. D'un point de vue mathématique, cela s'explique par le fait que les systèmes déterministes ont de plus en plus de chance de se comporter de manière chaotique à mesure qu'ils gagnent en complexité. Bien que déterministe, un système chaotique peut produire un résultat totalement différent sous l'effet d'une variation initialement infime. Ce phénomène est plus couramment connu sous le nom de l'effet papillon. D'un point de vue biologique, l'environnement entourant les molécules d'ADN, les cellules, les tissus et l'organisme dans son ensemble influent sur l'expression et la transmission du code génétique (Bonduriansky 2012). Un organisme vivant est donc un système trop complexe pour être parfaitement prédit par son code génétique. D'ailleurs, lorsque l'on étudie un comportement aussi complexe que le comportement de cour, le système d'expression du code génétique n'est pas au centre des explications. En fait, il est souvent utilisé comme un simple outil permettant de visualiser et d'étudier le système nerveux (Yu et al. 2010), qui lui aussi est générateur d'aléatoire (Faisal et al. 2008).

Le fonctionnement en réseau du système nerveux et de l'expression génétique leur confère des similarités computationnelles (Sorek et al. 2013). Autrement dit, l'étude d'un seul de ces systèmes peut apporter des clefs de compréhensions sur certains fonctionnements de l'autre. D'une part, le système nerveux émerge et dépend de l'expression génétique des cellules qui le composent. D'autre part, l'activité du système nerveux peut aussi agir sur l'expression génétique. Ce type d'interaction est mieux connu sous le nom de règle de Hebb : "Neurons that fire together, wire together" (Hebb 1949). La façon avec laquelle deux neurones se lient (wire) ensemble, implique une modification de leur expression génétique sous l'effet de leur activité électrique (fire). L'étude des rôles respectifs de ces deux systèmes est passionnante mais très complexe quand ils interagissent ensemble.

Le système nerveux est apparu à partir de processus biologiques qui existaient avant celui-ci et qui existent encore en dehors du monde animal : chez des organismes qui ne possèdent “que” le système génétique. Si un seul système suffit à générer certains comportements, étudier ces organismes peut apporter des explications générales permettant ensuite de mieux comprendre ce qui peut émerger de l’effet combiné des deux systèmes. Dans cette optique, nous allons commencer par présenter les structures qui ont précédé le système nerveux.

Les structures qui précédaient l’apparition du système nerveux

Pour étudier l’apparition du système nerveux, il faut remonter à une période géologique datant de -541 à -485 millions d’années, le Cambrien. C’est à cette période que sont apparus les plans d’organisation majeurs des animaux, i.e. la façon générale avec laquelle est agencée l’anatomie des taxons majeurs des animaux. Le registre fossile de cette époque témoigne d’une diversification si intense que nous l’appelons : explosion cambrienne. L’apparition du système nerveux a supposément un rôle majeur dans cet événement de diversification biologique. En permettant une nouvelle forme de coordination entre les différentes parties du corps, ces dernières ont pu évoluer en membres et en organes spécialisés. Les différentes voies de spécialisation empruntées par les premiers animaux ont mené à la diversité des plans d’organisation que nous connaissons aujourd’hui.

Le système nerveux n’existe pas en dehors des animaux au sens large (nommés Métazoaires, voir Figure 2). Les Métazoaires comprennent cinq grandes lignées dont trois possèdent un système nerveux (Kristan 2016): les Cnidaires (comprend les méduses), les Cténophores (ressemblent à des méduses mais ne sont pas urticantes) et les Bilatériens (tous les animaux ayant une symétrie bilatérale, au moins au stade larvaire). Les lignées ne possédant pas de système nerveux sont les Placozoaires (petits animaux plats aux cellules peu diversifiées) et les Spongiaires (comprend les éponges). Les cténophores possèdent deux systèmes nerveux distincts et sont plus éloignés des lignées ayant un système nerveux que de celles qui n’en ont pas (Moroz et al. 2021). Il est donc probable que le système nerveux

soit apparu plusieurs fois au cours de l'évolution des Métazoaires. Au sein des lignées possédant un système nerveux, seulement deux groupes de parasites obligatoires l'ont perdu et existent encore : Dicyemida et Myxozoa (Moroz et al. 2021). Il semblerait que le coût évolutif et développemental lié au système nerveux ne surpasse ses bénéfices que dans ces très rares situations. D'ailleurs, l'avantage adaptatif du système nerveux semble être un facteur majeur de l'explosion cambrienne.

L'évolution du système nerveux a nécessité un ensemble de spécialisations cellulaires. L'ordre dans lequel ces spécialisations sont apparues est encore débattu et la façon avec laquelle les différentes formes de cerveaux ont évolué est méconnue. Nous pensons toutefois que les pré-neurones étaient des cellules spécialisées dans la communication (paracrine) via la diffusion de messagers chimiques avec d'autres cellules (Jékely 2021). Elles se seraient progressivement allongées, à la manière des axones ou des dendrites (les prolongements cellulaires de neurones), de manière à cibler précisément une libération massive de messagers chimiques (De Wiljes et al. 2017; Jékely 2021). Dans les neurones, cette libération est permise par le transport de vésicules le long des axones. Les vésicules sont des compartiments intracellulaires sphériques, séparés du cytoplasme par une membrane plasmique. Elles sont déplacées par des protéines (les dynéines) qui se déplacent sur de longs filaments protéiques (les microtubules). Les messagers chimiques contenus par les vésicules sont libérés de la cellule par un processus nommé exocytose. De plus, les cellules peuvent réguler la concentration de certains ions (Johnson et al. 1995), ce qui peut produire des oscillations (Hanson 2021) à l'origine de l'activité électrique des pré-neurones. Si une cellule est électriquement excitable (Wan et al. 2021) et est équipée de canaux voltage-dépendants (Kristan 2016): elle peut transmettre un message très rapide le long de son corps cellulaire. Enfin, le dernier des principaux mécanismes neuronaux est le déclenchement de l'exocytose des vésicules par un potentiel électrique (Göhde et al. 2021). Tous ces éléments réunis permettent le fonctionnement normal des neurones, le type cellulaire capable de transmettre une information électrique à travers un axone (une élongation de son corps cellulaire) jusqu'à une extrémité (e.g. la fente synaptique)

où un neurotransmetteur est massivement libéré par sécrétion vésiculaire vers les récepteurs d'une autre cellule.

Parmi ces éléments qui existaient probablement déjà chez l'ancêtre des Métazoaires, certains existent aussi chez des organismes aneuraux. A l'échelle moléculaire, les composants utilisés par les fonctions neuronales le sont aussi souvent par des cellules qui ne sont pas des neurones (Kristan 2016). Par exemple, le glutamate, un neurotransmetteur est à la fois utilisé par des cellules non neuronales chez des organismes neuraux et dans la communication paracrine chez les plantes (Brenner et al. 2006). De plus, on retrouve dans tout le vivant des molécules homologues (ayant la même structure mais pas exactement la même fonction) aux molécules spécifiques des neurones (Emes & Grant 2012). Par exemple, certaines bactéries possèdent des canaux potassiques voltage-dépendants leur permettant de propager une information électrique à travers le biofilm qu'elles constituent (Prindle et al. 2015). Non seulement, on retrouve des molécules homologues aux canaux spécifiques de la conduction neuronale (Moran et al. 2015; Liebeskind et al. 2011) mais aussi aux protéines synaptiques (Emes & Grant 2012), aux activités oscillatoires (Levin et al. 2021), ou aux protéines responsables de la neurosécrétion vésiculaire (Göhde et al. 2021). Ces homologues, sont particulièrement retrouvés chez les unicellulaires les plus proches de nous mais aussi chez des eucaryotes beaucoup plus éloignés comme les plantes (voir Figure 2). Non seulement on peut faire des liens structurels entre ces molécules (homologie) mais aussi entre la fonction des phénomènes qu'elles provoquent (analogie). Par exemple, Brenner et al. (2006) remarquent que la façon avec laquelle l'auxine, une phytohormone, est libérée dans le milieu extracellulaire ressemble à la façon avec laquelle les neurotransmetteurs sont libérés dans la fente synaptique. De plus, Hanson et al. (2021) observent que des oscillations électriques en basse fréquence existent dans tout le monde vivant, ils font d'ailleurs l'hypothèse qu'elles auraient un rôle dans le développement et dans la régénération. Le potentiel d'action, un phénomène électrique essentiel au fonctionnement de tout système nerveux, est observé chez les plantes depuis 1880 (Stahlberg 2006, et pour plus d'information sur l'évolution biologique de la conduction électrique, voir Mackie,

1970; Kristan 2016). Aujourd'hui, nous savons que la concentration en calcium régule, via l'utilisation de canaux calciques, les potentiels d'action chez les plantes (Baluska & Mancuso 2021) comme chez les champignons (Leys & Meech 2006). Les organismes vivants utilisent de nombreux moyens pour transmettre des informations mais aussi pour les traiter. La recherche de structures communes entre les organismes aneuraux et neuraux apporte des éléments sur l'histoire évolutive des systèmes nerveux mais il y a tout intérêt à ne pas se limiter à ces homologies. Dans les derniers cas évoqués, on observe des systèmes ayant des caractéristiques fonctionnelles communes mais pouvant être apparues via des histoires évolutives différentes. La présence ou l'absence de ces analogies permet de mieux discerner quel est l'apport fonctionnel d'un système nerveux. Mais même l'apport combiné des homologies et des analogies ne suffit pas à l'étude de la cognition telle que nous voulons la définir: il faut aussi rechercher des capacités que seuls les organismes aneuraux possèdent.

En effet, la richesse et la complexité des structures et des capacités dont sont capables certains organismes aneuraux remettent en question le cloisonnement du concept de cognition au sein des organismes neuraux. Il semble que le système nerveux ne soit pas un élément nécessaire à l'émergence de capacités cognitives. Dans ce contexte, la recherche de ce qui caractérise les organismes cognitifs devient intimement liée à la recherche de ce qui caractérise tous les organismes vivants.

Sur ce qui est nécessaire et suffisant à la vie

Il semble qu'il y ait une différence fondamentale entre le comportement d'une machine et celui d'un organisme vivant. Pour pouvoir la comprendre, il nous faut définir quels sont les éléments propres aux organismes vivants. Comme nous l'avons vu, ces organismes comprennent des moyens de générer de l'aléatoire. Le produit d'une mutation génétique, par exemple, peut modifier certaines interactions entre les molécules produites par un organisme. Considérons les interactions ayant lieu entre toutes ces molécules comme un réseau dans lequel chaque nœud est un composant (un gène ou une molécule) et chaque lien est une interaction. Comme

certains gènes, appelés facteurs de transcription, agissent sur l'expression d'autres gènes (voir Figure 1), l'expression génique se représente très bien sous la forme d'un réseau d'interaction (Levine et al. 2013). L'arrivée d'un nouvel allèle (i.e. une des versions possibles d'un gène), en facilitant ou en défavorisant une interaction avec un autre gène, peut changer la forme (appelée topologie) du réseau en ajoutant ou en supprimant des interactions. Cette représentation en réseau peut fonctionner avec n'importe quel groupe de composants interagissant entre eux à la manière d'un système dynamique. Les principaux acteurs de ces réseaux dans le monde vivant sont les enzymes et les ribozymes, respectivement des protéines et des ARNs (tous deux produits à partir des gènes contenus dans l'ADN) capables de catalyser des réactions chimiques. Ces catalyseurs agissent en mettant les réactifs dans une configuration spatiale facilitant une réaction chimique. Pratiquement, ils permettent à des réactions très lentes (qui pourraient nécessiter des siècles pour avoir lieu), d'avoir lieu en moins d'une seconde. Par exemple, le métabolisme fonctionne de cette manière.

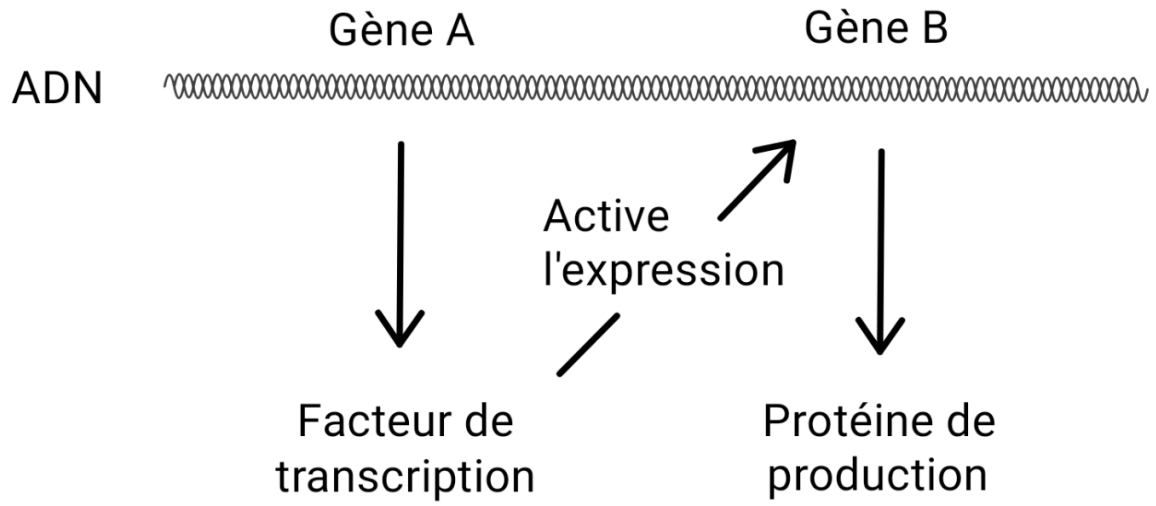


Figure 1. Représentation d'un réseau d'expression génique simplifié. L'expression du gène A active l'expression du gène B et la production d'une protéine (e.g. de la kératine, un canal ionique, une enzyme du métabolisme). Même chez des organismes simples, ces réseaux sont bien plus complexes. Ils contiennent davantage de composants interconnectés au sein d'un système (e.g. l'expression du génome) et entre les systèmes (e.g. la communication avec la membrane plasmique de la cellule). Les flèches dirigées vers le bas désignent les processus de transcription (copie de l'ADN en ARN), de modifications post-transcriptionnelles, de traduction (de l'ARN en protéine) et de modifications post-traductionnelles. La façon avec laquelle se déroulent ces étapes peut être influencée par d'autres composants dont les interactions forment un autre réseau. Autrement dit, chacune de ces flèches (vers le bas) est un réseau imbriqué à l'intérieur du réseau d'expression génique. En fonction du comportement de ce réseau, un seul gène peut donner lieu à des résultats (protéines ou phénotypes) différents : on parle de pléiotropie. A l'inverse, lorsqu'une protéine est le résultat de l'expression de plusieurs gènes, on parle d'épistasie. Lorsque le produit d'un gène agit sur sa propre production, il forme une boucle de rétrocontrôle qui, lorsqu'elle est négative (réduit sa propre production), peut être à l'origine d'une oscillation régulière. Cela arrive quand le produit du gène diminue sa propre production, se dégrade, est à nouveau produit, diminue sa production et ainsi de suite.

Même s'il est très complexe, un réseau comme celui présenté en Figure 1 n'est pas suffisant pour reproduire un être vivant. Sous l'effet de la diffusion, les molécules constitutives du réseau s'éloigneraient irrémédiablement et finiraient par ne plus interagir. L'effet de la diffusion peut être contré par une barrière permettant de réguler les échanges avec l'extérieur. Cet élément nécessaire a aussi la fascinante particularité d'être le moyen le plus élémentaire de discerner le soi du non-soi

(Jékely et al. 2021). Au niveau cellulaire par exemple, les protéines membranaires sont spécialisées en fonction de leur position sur la face interne ou externe de la membrane plasmique (la barrière minimale des cellules). Les protéines transmembranaires comme les canaux n'ont pas nécessairement les mêmes affinités avec l'intérieur ou avec l'extérieur, e.g. ils ne laissent pas passer les mêmes ions en fonction de la direction intérieur - extérieur. Cette spécialisation fournit le moyen de distinguer le soi du non soi, par exemple, en distinguant les mesures réalisées à l'intérieur de celles mesurées à l'extérieur. Ce discernement a lieu au niveau de la cellule, par exemple, lorsque la cellule régule la concentration interne d'une molécule à une concentration différente de celle de l'extérieur. Comme le réseau que nous avons présenté comprend des réactions chimiques, il est une structure dissipative (i.e. qui produit de la chaleur et consomme de l'énergie). Ces transferts de chaleur et d'énergie doivent avoir lieu à travers cette barrière dite semi-perméable et être régulés de manière à maintenir le réseau qu'elle contient.

Enfin, le réseau doit pouvoir produire des copies de lui-même. Autrement dit, ce réseau doit être capable de produire les composants lui permettant de se reproduire. L'ADN par exemple, est répliqué par des complexes protéiques (i.e. issues de l'expression génétique): les polymérases.

L'ensemble des éléments évoqués jusque-là constituent un système autopoïétique: un système devant être capable de générer de l'aléatoire, de se maintenir (entre autres, à l'aide d'une membrane semi-perméable) et de produire les composants lui permettant de se reproduire (Varela et al. 1974). En utilisant cette définition, Maturana & Varela (1980) avaient l'ambition d'énoncer tous les processus constituant un être vivant minimal sans avoir à invoquer les molécules du vivant telles que nous les connaissons (ADN, ARN, protéines…). Se faisant, ils ont pris soin de ne pas rejeter du monde vivant de potentielles espèces dont les informations et réactions biochimiques seraient régies par d'autres molécules. La présence potentielle d'autres formes de vie dans l'univers ne permet pas d'exclure cette possibilité. Dans cette optique universaliste, Bourgine & Stewart (2004) ont formalisé mathématiquement la notion d'autopoïèse sous la forme d'un système dynamique aléatoire.

Bourgine & Stewart (2004) et Bitbol & Luisi (2004) considéraient que l'autopoïèse était nécessaire mais pas suffisante pour définir la vie. Les êtres vivants ont aussi en commun la capacité à ajuster les interactions qu'ils ont avec leur environnement. Cela leur permet d'atteindre des objectifs en lien avec leur survie, leur croissance ou/et leur reproduction. Nous allons maintenant nous demander si cette capacité commune à tous les êtres vivants mérite d'être appelée "cognitive" ?

La cognition, nécessaire à la vie ?

Nous avons vu qu'un organisme vivant doit comporter un ensemble de mécanismes moléculaires (que l'on peut représenter sous la forme d'un réseau d'interaction) capable de produire les composants lui permettant de se maintenir et de se répliquer. Or, on ne s'attend pas à ce qu'un tel réseau puisse fonctionner dans toutes les situations. En effet, en dehors de conditions de laboratoire idéales, l'environnement varie dans l'espace comme dans le temps. En conséquence, les mécanismes permettant aux organismes vivants de produire des molécules biologiques, de la transformation d'énergie ou du transfert d'information ne peuvent pas fonctionner tout le temps de la même manière. Si c'était le cas, le moindre changement environnemental mènerait les organismes à la mort. Nous allons donc nous intéresser à l'importance des mécanismes régulateurs de ces mécanismes de production (Bechtel & Bich 2021) dans l'étude des comportements.

Lorsqu'un organisme réagit à un stimulus environnemental, cette réaction peut varier pour deux raisons : soit le changement provient uniquement de l'environnement, soit il provient de l'effet de l'organisme sur son environnement. Dans le premier cas, on parle d'éxafférence, la capacité à réagir à un stimulus externe ou à comparer un facteur interne avec un facteur externe. Dans le second cas, on parle de réafférence, la capacité à interpréter une variation environnementale due à sa propre action sur celui-ci (Jékely et al. 2021). L'exemple de réafférence unicellulaire le plus évocateur est la chimiotaxie bactérienne. Observé pour la première fois en 1881 par Engelmann, il a fallu presque un siècle pour en comprendre le mécanisme. Très brièvement, la chimiotaxie est la capacité à

reconnaître une substance chimique et à en trouver la source, à la manière d'un animal flairant sa proie. Pour ce qui est des bactéries, elles parviennent à suivre ou à fuir un gradient chimique en comparant l'effet de leurs mouvements sur la concentration externe en substance chimique (Adler 1966; Larsen et al. 1974). Si la concentration est plus forte à l'instant t + 1 qu'à l'instant t, alors la bactérie est dans la bonne direction et continue à suivre celle-ci. Comme les bactéries ajustent leur direction en fonction de l'effet de leurs propres comportements sur ce qu'elles détectent, elles sont capables de réafférence. Cette capacité est très répandue, voire universelle dans le vivant et pourtant, elle implique un ajustement comportemental, une forme simple d'intentionnalité. Cela fait partie de l'ensemble des phénomènes biologiques qui impliquent une régulation des mécanismes de production (comme la biosynthèse ou le mouvement d'un flagelle). Par exemple, les plantes ne vont généralement pas produire de chlorophylle si elles ne perçoivent pas de lumière et les bactéries sociales régulent les mouvements des flagelles de leurs voisines. Ce type de régulation des mécanismes de production semble ubiquitaire et est selon Koseka et al. (2017) ou Bechtel & Bich (2021) caractéristique d'une activité cognitive.

En utilisant cette définition de la cognition nous rejoignons le point de vue de Bourgine & Stewart (2004) ou Bitbol & Luisi (2004) selon lesquels la cognition est nécessaire à la vie. Si tout être vivant est capable d'autopoïèse et de cognition, nous pouvons comprendre les bases de la cognition en étudiant des organismes dont les comportements sont produits sans la complexité d'un système nerveux.

La cognition des organismes aneuraux

Certains scientifiques du début du XXème siècle interprétaient déjà la complexité des comportements des organismes simples comme de la cognition (Jennings 1906). Depuis quelques décennies, certains chercheurs qui étudient les comportements des organismes aneuraux parlent d'intelligence ou de cognition minimale (Godfrey-Smith 2016; Lyon et al. 2021) chez les bactéries (Castro Garcia 2011 ; van Duijn et al. 2006), chez les plantes (Trewavas, 2003 ; Calvo Garzón &

Keijzer, 2011), et encore chez les Myxomycètes (Castro Garcia, 2011; Vallverdù et al. 2018). Ce mouvement scientifique ne définit pas un type de cognition “inférieur” mais apporte une approche intégrative qui souligne plutôt ce qu’il y a de commun à tous les organismes (Lyon 2019).

Nous avons vu que le système nerveux était apparu à partir de structures et processus biologiques préexistants. De nombreuses caractéristiques -que l’on pensait propres aux neurones- sont partagées par des cellules qui n’en sont pas et sont même possédées par des organismes sans système nerveux. Puisqu’une cellule normale n’est pas si différente d’une cellule neuronale, pourquoi la présence de neurones devrait être une condition pour utiliser le terme de cognition ? En fait, il semble qu’il n’y ait pas non plus de nette délimitation entre les processus biologiques et certaines capacités que l’on nomme cognitives. En particulier lorsqu’il s’agit de capacités originellement définies chez des organismes neuraux qui ont ensuite été démontrées chez des organismes aneuraux. La vision binaire séparant les doués de cognition de ceux qui ne le sont pas, ne semble plus s'appuyer sur des connaissances biologiques mais davantage sur une forme d’anthropocentrisme (van Duijn et al. 2006). Autrement dit, une volonté d’accorder un statut spécial et supérieur à ceux qui possèdent un système nerveux (i.e. qui sont proches de l’humain). Une réponse à ce constat consiste à guider la recherche vers une interprétation de plus en plus biologique du concept de cognition (“the biogenic approach”, Lyon, 2006). Cette approche consiste à dire que les structures et processus biologiques basiques ou minimaux ont le potentiel de conférer des capacités cognitives et que nous devrions les étudier pour mieux comprendre les capacités cognitives plus complexes. Il s’agit par exemple de la capacité à détecter un stimulus, à traiter des informations, à mémoriser, à affecter une valeur positive ou négative à un stimulus (ou à une information), à prendre une décision, à anticiper, à apprendre, à généraliser ou à résoudre des problèmes (Trewavas 2003; Lyon 2015; Baluska & Levin 2016; Levin et al. 2021).

Dans cette démarche, nous allons présenter un modèle biologique de la cognition aneurale: un Myxomycète nommé *Physarum polycephalum*. Nous

commencerons par présenter les bases de la biologie de cet organisme afin de permettre au lecteur de comprendre ce en quoi des processus biologiques simples peuvent être à l'origine de capacités parfois surprenantes.

Introduction - *Physarum polycephalum*, un modèle de cognition aneurale

Présentation de l'organisme

Cycle de vie et phylogénie

L'étude des Myxomycètes a accompagné le développement de la biologie telle que nous la connaissons aujourd'hui. Le Myxomycète dont nous allons parler a été nommé *P. polycephalum* en 1822 par von Schweinitz. Le cycle de vie de ce type de Myxomycète comprend une phase particulièrement intéressante, dénommée "plasmode" par Cienkowski en 1863. C'est lors de cette phase de plasmode (dite, végétative) qu'il peut atteindre une grande taille (plusieurs m 2) tout en conservant sa capacité motrice (de quelques cm par heure) dans les milieux sombres et humides.

Quelques années plus tard, d'autres chercheurs allemands ont découvert que le plasmode contenait un grand nombre de noyaux (Strasburger, 1880) répartis dans un milieu commun délimité par une membrane plasmique. C'est d'ailleurs à cette époque que la communauté scientifique a reconnu que les cellules vivantes n'apparaissaient pas à partir du milieu externe ou de la matrice extracellulaire avoisinant les autres cellules mais qu'elles se multipliaient par division (Paweletz 2001). Ce phénomène, appelé mitose, est toujours précédé d'une duplication de l'ensemble du génome de la cellule. La plupart du temps, la mitose implique une division du noyau appelée caryocinèse suivie d'une division du cytoplasme (le milieu interne de la cellule) appelée cytocinèse. Dans le cas du plasmode, les noyaux se divisent mais pas le cytoplasme. C'est pourquoi il contient de nombreux noyaux. En biologie, les cellules ayant ce comportement et devenant ainsi plurinucléées sont nommées syncytia. Le plasmode, comme les cellules musculaires squelettiques des vertébrés, est un syncytium pouvant atteindre une grande taille et dont les mécanismes moteurs ont la même structure à l'échelle

moléculaire. Nous reviendrons sur cette similarité et détaillerons le fonctionnement de la motricité du plasmode dans les prochaines parties.

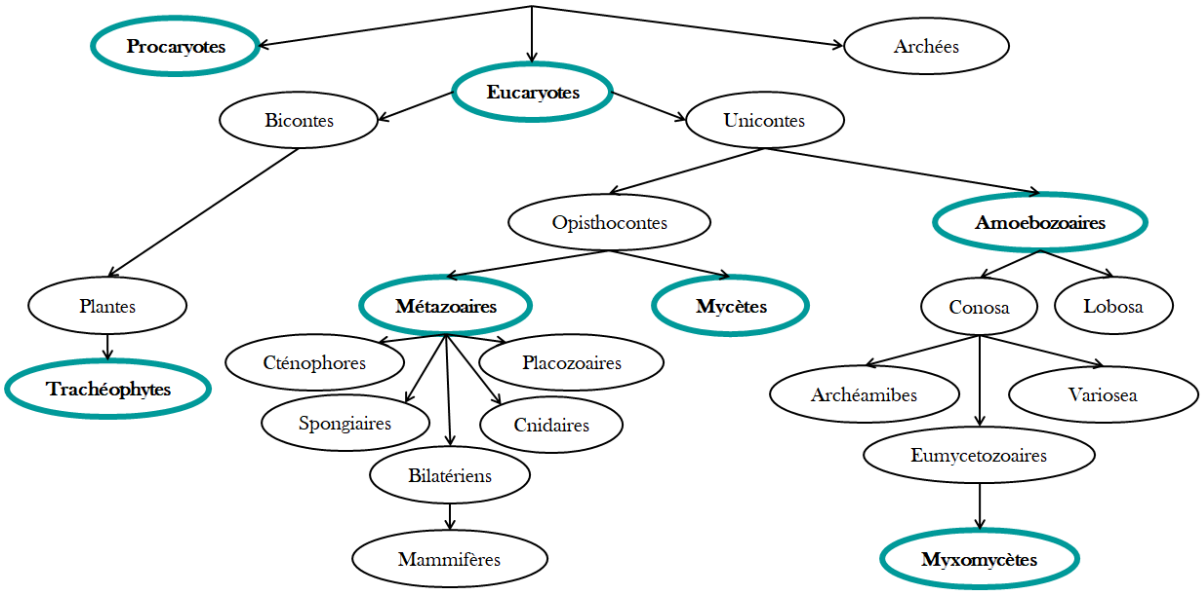


Figure 2. Arbre du vivant simplifié pour mettre en évidence le positionnement des Myxomycètes. (D'après Leontyev & Schnittler, 2017; pour davantage de détails sur la diversité phylogénétique au sein des Myxomycètes, voir Leontyev et al. 2019). Les trois grands domaines du vivant sont les Procaryotes (bactéries communes), les Eucaryotes (cellules à noyau et compartimentées), les Archées (autres bactéries plus proches des eucaryotes, connues pour avoir des capacités extrêmophiles). Les Unicontes et les Bicontes sont les deux grandes lignées eucaryotes. L'ancêtre commun des Unicontes (resp. Bicontes) possédait un (resp. deux) flagelle(s). L'ancêtre commun des Opisthocontes était propulsé et non tiré par un flagelle, les Opisthocontes contiennent les royaumes des Métazoaires (animaux) et des Mycètes (champignons). Les Amoebozoaires peuvent déployer un large pseudopode (extension cellulaire en forme de doigt). Les Plantes sont des organismes ayant des plastes photosynthétiques. La méiose des Métazoaires produit directement des gamètes. Les Mycètes produisent des sporanges pour libérer leurs spores. Comme ces derniers, les Myxomycètes produisent des sporanges mais font partie des Amoebozoaires et pas des Opisthocontes. L'arbre s'arrête au niveau de la classe avec les exemples des Mammifères et des Myxomycètes. Les noms en gras permettent d'illustrer des comparaisons utilisées dans le texte.

Physarum polycephalum est un Eucaryote Uniconte, comme les Métazoaires. À l'instar de toutes les espèces connues, nous pouvons quantifier et

comparer sa distance (ou proximité) génétique avec les autres espèces et cela nous permet de l'inclure au sein de l'arbre du vivant (dit phylogénétique) i.e. de l'évolution de la vie sur Terre. Cette méthode de comparaison de distance génétique est aujourd'hui considérée comme la plus fiable pour positionner une espèce au sein de l'arbre du vivant. L'application récente de cette méthode a apporté de grandes modifications à l'arbre phylogénétique. Le nom de la classe dont fait partie *P. polycephalum* illustre l'une de ces transitions. Elle se nomme Myxomycètes (Figure 2), ce qui signifie champignon (pour mycète) à mucus (pour Myxo).

Elle a été nommée ainsi parce que les Myxomycètes forment des structures reproductives très similaires à celles de certains champignons : des sporanges. Ce sont des structures sphériques dont le rôle est de libérer des spores dans l'atmosphère (Figure 3). A l'instar des spermatozoïdes, des ovules ou du pollen, chaque spore est créé par méiose et ne contient plus qu'une seule copie de tout le génome du Myxomycète : on dit qu'elle est haploïde. Dans le cas des animaux, il faut que les deux gamètes (spermatozoïdes et ovules) se rencontrent et fusionnent pour former un nouvel individu ayant deux copies d'ADN (i.e. diploïde). Dans le cas de la majorité du reste des eucaryotes, les phases haploïdes et diploïdes sont plus complexes dans le sens où elles ont plusieurs étapes. Chez certaines algues vertes, *Ulva lactuca* par exemple, le gamétophyte (stade pluricellulaire haploïde, producteur de gamètes) a le même aspect que le sporophyte (stade pluricellulaire diploïde, producteur de spores). Si l'on s'intéresse aux Myxomycètes plus particulièrement, l'humidité déclenche la germination du spore et en fonction de son environnement (humide ou complètement liquide), celui-ci forme une structure semblable à celle d'une amibe (nommée myxamoebae, Figure 3) ou à une cellule capable de nager à l'aide de flagelles (cellule flagellée, Figure 3). Le myxamoebae peut même entrer dans une phase enkystée (nommée microcyste, Figure 3) si l'environnement devient trop sec. Si le myxamoebae ou la cellule flagellée rencontre un autre individu de type sexuel différent, ils vont fusionner et former un plasmode diploïde. Le plasmode peut, si l'environnement devient trop sec et peu lumineux, rentrer dans une phase de dormance nommée sclérote.

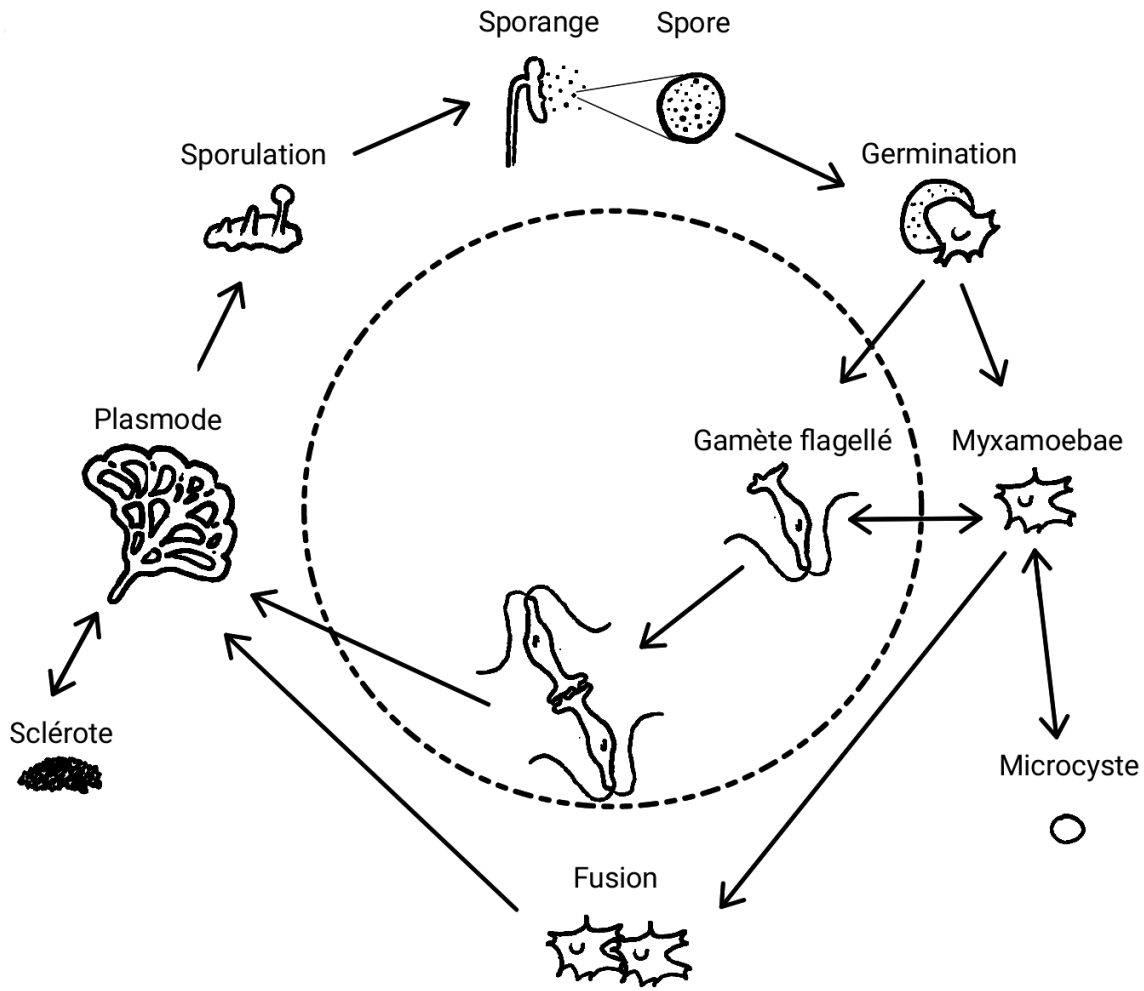


Figure 3. Exemple de cycle de vie d'un Myxomycète. Il est diploïde (contient deux copies de son ADN) lors des phases plasmode, sclérote et lors de la sporulation. Il est haploïde (contient une seule copie de son ADN) sous forme de spore, de gamète, de myxamoebae et de microcyste.

Un système auto-organisé

Nous avons présenté *P. polycephalum* comme un organisme ayant un cycle de vie complexe et un positionnement dans l'arbre phylogénétique au sein des Amoebozoaires (le groupe frère des Opisthocontes qui contiennent les Métazoaires/animaux et les Mycètes/champignons). Il est relativement proche des animaux et possède une structure similaire à celle des cellules musculaires

squelettiques des vertébrés. Ces deux types de cellules ont en commun d'être géantes, plurinucléées et d'avoir une activité contractile. Elles diffèrent toutefois dans la façon avec laquelle elles génèrent, véhiculent et intègrent les informations. Alors que la cellule musculaire, très spécialisée, se contracte entièrement sous une impulsion électrique déclenchée par l'extrémité de l'axone d'un motoneurone, via une libération d'acétylcholine. Le plasmode n'a pas d'origine unique à ses mouvements (Alim et al. 2017). Au contraire, il semble posséder un grand nombre de centres intégrateurs (noyaux) qui fonctionnent de concert. Nous verrons que le réseau d'interactions biochimiques créé par chacun de ses noyaux interagit avec son environnement local avec une certaine indépendance (Gerber et al. 2021). Il est même concevable qu'en plus de l'exafférence (la réaction à l'environnement), chacun de ces sous-systèmes soient capables de réafférence, i.e. de réagir aux effets de leur propre action (Bechtel & Bich 2021). De plus, certains noyaux se déplacent dans le cytoplasme du plasmode et d'autres non. On ne sait pas s'il y a une spécialisation des noyaux au regard de cette caractéristique mais on peut imaginer que chaque sous-système soit capable de quantifier son mouvement via les variations locales qu'il mesure en se déplaçant. Nous ne savons pas si les systèmes gravitant autour des noyaux du plasmode sont capables de réafférence mais le fait que les bactéries en soient capables ajoute du crédit à cette hypothèse.

On peut aussi faire la comparaison entre la population de noyaux composant un plasmode et une colonie bactérienne de l'espèce *Myxococcus xanthus*. Selon Dinet et al (2021), les comportements collectifs de ces bactéries témoignent d'un système auto-organisé, i.e. dans lequel des comportements collectifs complexes émergent des interactions locales entre les bactéries. Les signaux qu'elles émettent influencent leur propre mouvement en plus de celui de leurs voisines et favorisent ainsi ce comportement collectif. L'auto-organisation est définie par Camazine et al. (2020) comme un processus par lequel des composants, qui ne peuvent interagir que localement, sont à l'origine d'une configuration émergente à une échelle globale. Elle peut être jugée surprenante, au vu de la morphologie ou de ce dont est capable un seul de ses composants. Avec la forme et la position d'un seul grain de sable, nous aurions du mal à imaginer qu'un grand nombre d'entre eux puissent

naturellement former les ondulations et les dunes des déserts de sable. Cela en fait un exemple d'auto-organisation (Lancaster 1994). Chez les bactéries sociales ou le plasmode, on peut voir chacun des noyaux comme un centre organisateur indépendant, obéissant à des règles d'interactions avec les noyaux voisins. Chaque centre consiste en un réseau de gènes régulateurs influencés par des signaux locaux qui déterminent un comportement émergent à l'échelle de la population de noyaux ou de bactéries. De fait, le Myxomycète *P. polycephalum* est aussi considéré comme un système distribué et auto-organisé (sur de la fusion de plusieurs microplasmodes, voir Fessel et al. 2012; sur l'impact de la dynamique des fluides sur la morphologie cellulaire, voir Alim 2018; pour une revue sur l'auto-organisation chez cette espèce, voir Gao et al. 2018).

Importance du système circulatoire

Un autre système, aussi présent chez le plasmode, a un rôle vital pour tous les organismes de grande taille. Les animaux comme Dicyemida et Myxozoa (des groupes que nous avons évoqués parce que leurs ancêtres auraient perdu leur système nerveux) sont suffisamment petits pour que les gaz respiratoires et les nutriments atteignent toutes leurs cellules par diffusion. En revanche, les organismes de grande taille comme les arbres ou les vertébrés possèdent un système circulatoire leur permettant de transporter nutriments, gaz respiratoires et informations biochimiques. Nous allons parler du xylème et du phloème chez les arbres et du système sanguin chez les vertébrés.

Chez les Trachéophytes (les plantes possédant un système circulatoire), le xylème apporte l'eau et les minéraux des racines aux feuilles et le phloème apporte les photosynthétats (résultants de la photosynthèse) vers toutes les autres parties de la plante. Le xylème est constitué de cellules mortes et solidifiées par de la lignine (le principal composant du bois) et le phloème est constitué de cellules criblées (par lesquelles passe le fluide) et de cellules compagnes qui servent d'interfaces entre le fluide et les autres parties de la plante. Tous les vaisseaux du système circulatoire sanguin des Vertébrés ont au moins une paroi dont l'épaisseur est une cellule

endothéliale. Ici aussi, cette cellule sert d'interface avec le milieu environnant du vaisseau sanguin. *P. polycephalum* possède aussi un système circulatoire mais celui-ci est très différent de ceux que nous venons d'évoquer. Le système circulatoire du plasmode n'est pas recouvert de cellules faisant l'interface avec les autres parties internes, il est complètement intracellulaire. Le flux le traversant, s'écoulant à une vitesse de 1 à 3 mm par seconde, a été observé pour la première fois en 1940 par Kamiya et al. Il fait partie des flux intracellulaires les plus rapides jamais observés (Mogre et al. 2020). On découvrit plus tard que ce flux était provoqué par des interactions entre deux protéines fibreuses très connues en biologie animale : l'actine et la myosine (Wohlfarth-Botterman 1979). En effet, les interactions entre l'actine et la myosine sont responsables de la contraction musculaire chez les animaux, que ce soit dans le muscle squelettique permettant le mouvement des membres, comme dans le muscle lisse permettant, par exemple, la contraction des artères par péristaltisme. Le péristaltisme est un mécanisme par lequel la contraction du tube (ici, de l'artère) se transmet de proche en proche le long de celui-ci. En fait, ce mécanisme de péristaltisme est aussi responsable du flux observé dans le système circulatoire du plasmode (Alim 2013). Ce mode de propagation serait le fruit d'une boucle de rétroaction entre les oscillations chimiques responsables des contractions et l'effet des contractions sur les oscillations chimiques (Teplov 2017). Sur le plan structurel, les molécules de myosine et d'actine sont agencées en forme de tube. L'actine peut se polymériser sous la forme de grandes structures qui maintiennent la forme des cellules à la façon d'une charpente. C'est sous cette forme polymérisée qu'elle peut interagir avec la myosine et produire une contraction. La liaison de l'actine avec une autre protéine, la profiline, l'empêche de se polymériser (Oettmeier et al. 2018) et la maintient sous une forme plus petite qui diffuse librement dans le cytoplasme. Cette différence de forme est responsable de la différence de viscosité entre l'intérieur (aussi appelé endoplasme) et l'extérieur (aussi appelé ectoplasme) des tubes (Isenberg & Wohlfarth-Bottermann, 1976). Ces tubes constituent un réseau, permettant l'acheminement des gaz respiratoires, des nutriments et des informations

biochimiques dans toute la cellule quelle que soit sa taille (jusqu'à plusieurs mètres carrés).

Les molécules du cytosquelette (dont l'actine est un composant majeur) soutiennent la membrane plasmique et donnent sa forme à la cellule. En déformant leur agencement les unes par rapport aux autres, ces molécules fibreuses peuvent modifier la forme de la cellule. Quand cette déformation prend la forme d'un doigt, on dit que la cellule forme un pseudopode. De nombreux Amoebozoaires utilisent leur(s) pseudopode(s) pour se déplacer. Ils vont déployer un pseudopode en faisant glisser leur face inférieure sur le sol avant de s'y accrocher pour pouvoir tirer le reste du corps cellulaire dans cette direction. Le plasmode de *P. polycephalum* peut déployer un tel pseudopode mais cela ne suffit pas à le déplacer lorsqu'il atteint une grande taille. En fait, le plasmode utilise son système circulatoire pour se déplacer. Le réseau circulatoire va se former ou s'orienter de façon à pouvoir diriger de l'endoplasme dans une direction. De manière générale, le cytosquelette devrait s'organiser de façon à ce que la structure interne soit plus lâche pour que la cellule puisse gonfler du côté du front de migration. Comme nous l'avons vu, l'endoplasme se déplace à quelques millimètres par seconde (Kamiya et al. 1940) mais puisque ce système est oscillatoire, le flux associé change de direction toutes les 1 à 2 minutes (Smith & Saldana 1992). Pour qu'il y ait un déplacement, il faut donc que le flux soit un petit peu plus fort dans la direction du mouvement que dans la direction opposée (ce qui a été montré par Matsumoto et al. en 2008). Ainsi, à force de flux et de reflux (légèrement biaisé pour que le flux soit plus fort que le reflux), le plasmode se déplace à une vitesse allant de 0.5 à 5 cm par heure (Kessler 1982).

En 2017, Alim et al. ont proposé un mécanisme explicatif de réaction du plasmode lorsqu'il entre en contact avec une substance nutritive. Comme sa caractéristique de système auto-organisé le laisse deviner, Alim et al. (2017) suggèrent que cette réaction est locale. La détection d'une substance nutritive déclencherait la libération d'un messager augmentant localement l'amplitude des oscillations du système circulatoire. Une expérience, consistant à déposer une goutte contenant une substance nutritive à la périphérie d'un plasmode leur a permis d'observer cette augmentation d'amplitude et la propagation consécutive de celle-

ci dans une petite zone autour de la zone de dépôt (de la goutte). Le messager, en se déplaçant avec le fluide, augmenterait l'amplitude des contractions de proche en proche. Cette augmentation locale d'amplitude implique une augmentation du flux cytoplasmique à cet endroit et donc un meilleur transfert des molécules nutritives ainsi qu'un déplacement global de la cellule dans cette direction. Un modèle mathématique, construit à partir des équations de dynamique des fluides de Navier-Stokes, a conforté cette explication en reproduisant les oscillations observées à partir du mécanisme proposé.

La diversité des régimes de contraction (Fleig et al. 2020) et des diamètres des tubes du réseau circulatoire (Kramar & Alim 2021) donnent à *P. polycephalum* la capacité de produire des comportements complexes comme trouver le chemin le plus court dans un labyrinthe (Nakagaki et al. 2020), produire un réseau efficace, robuste et peu coûteux (Tero et al. 2010) et d'autres que nous allons explorer en détail dans la prochaine partie.

Des comportements orientés vers un objectif

Un mouvement qui n'est affecté par aucun stimulus correspond à une marche aléatoire et peut être décrit par un modèle aussi simple que celui de la diffusion d'une molécule chimique dans un fluide. Lorsqu'un stimulus affecte ce mouvement, on parle de kinèse si seule la vitesse (et non la direction) est affectée et de taxis ou de tropisme lorsque le stimulus affecte aussi la direction du mouvement. On observe par exemple de la chimiotaxie chez les bactéries (Adler 1966) et les plantes (Takahashi & Scott, 1993 ; Li & Zhang, 2008). De la phototaxie a été observée chez les bactéries (Sackett et al. 1997) et les champignons (Saranak & Foster 1997), du phototropisme chez les plantes (Shen-Miller & Gordon 1966) et de la photokinèse chez un unicellulaire cilié, *Stentor* (Iwatsuki, 1992). Le gravitropisme est bien connu chez les plantes mais il a aussi été découvert chez un organisme n'ayant que six types cellulaires : un Placozoaire (Mayorova et al. 2017). *P. polycephalum* est un modèle de choix pour étudier cette forme de prise de décision puisque l'on sait depuis plusieurs décennies qu'il est capable de phototaxie

(Häder & Schreckenbach 1984; Marwan 2001), de chimiotaxie (Ueda et al. 1975; Durham & Ridgway 1976), de thermotaxie (Wolf et al. 1997), et de gravitropisme (Block et al. 1986). Il est aussi capable d'une certaine forme de mécanoréception (Murugan et al. 2021). Dans toutes ces situations, le déplacement du plasmode est médié par un changement, en fréquence et en amplitude, des contractions de son système circulatoire (Durham & Ridgway 1976; Miyake et al. 1994; Matsumoto et al. 1986). Selon Ray et al. (2019), la présence d'un stimulus attractif implique des fréquences de contractions élevées, et selon Matsumoto et al. (1986), les stimuli aversifs semblent être à l'origine de fréquences basses. Ces modifications en fréquence expliquent en partie le comportement de chimiotaxie.

De plus, le plasmode peut détecter et exploiter plusieurs sources de nourritures en même temps. Pour ce faire, les différentes parties de l'organisme (exploitant chacune un patch de nourriture) sont connectées de la manière la plus courte par un tube de son système circulatoire (Nakagaki et al. 2004). La façon avec laquelle il résout le problème de trouver le plus court chemin est une bio-inspiration pour de nombreux physiciens (Tero et al. 2006; Watanabe et al. 2011, Zhang et al. 2016). De plus, *P. polycephalum* peut comparer simultanément la qualité de différentes diètes (ici le ratio entre les carbohydrates et les protéines) et aller exploiter la diète lui offrant la meilleure croissance (Dussutour et al. 2010). Des études ultérieures dans lesquelles le choix entre deux diètes était ambigu ont mis en lumière différentes stratégies de choix au sein de cette espèce. Alors que certains individus privilégient la vitesse dans la prise de décision, d'autres privilégient la précision et font donc moins d'erreurs dans la sélection de la meilleure diète (Dussutour et al 2019).

Des comportements influencés par d'autres organismes

Les organismes aneuraux peuvent ajuster leurs comportements en fonction d'un ou plusieurs stimuli physico-chimiques et nous allons voir de quelle manière ils interagissent avec d'autres êtres vivants. Lorsque deux individus de la même espèce émettent une molécule olfactive pour communiquer (volontairement ou non)

sur leur territoire, leur statut reproductif, la présence d'herbivores ou un chemin d'approvisionnement par exemple, on parle de phéromones. L'utilisation de phéromones a été démontrée chez une très grande variété d'organismes mais nous allons nous intéresser à cette capacité de communication chez des organismes aneuraux.

Nous allons voir que cette communication existe chez les eucaryotes comme les procaryotes avant de nous pencher sur les recherches récentes chez *P. polycephalum*. Chez les eucaryotes, un exemple particulièrement intéressant est l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum*. Cette espèce unicellulaire peut s'agréger pour former un être pluricellulaire. Ces cellules utilisent un messager chimique (l'AMPc) pour communiquer à grande distance, s'agréger, et former des structures permettant à certaines cellules de produire des spores et de se reproduire (De Palo et al. 2017). Ce comportement est considéré comme social puisque certains individus sacrifient leur potentiel reproducteur au profit des autres. Chez les procaryotes, certaines bactéries coloniales utilisent des composés chimiques leur permettant de communiquer et de s'organiser, on appelle ce phénomène la détection du quorum (Fuqua et al. 1994). De cela émerge des comportements collectifs comme l'agrégation, la digestion extracellulaire, la régulation de la densité de population et la défense chimique contre d'autres organismes (Diggle et al. 2007 ; Jacob et al. 2004 ; Kim et al. 2016).

Les comportements collectifs *P. polycephalum* ne sont pas aussi avancés que ceux des amibes sociales ou des bactéries coloniales. Pourtant, les messagers olfactifs laissés par un plasmode de *P. polycephalum* influencent le comportement des autres et cela peut mener deux individus à fusionner (Vogel et al. 2015). Contrairement aux plantes, aux champignons et aux bactéries, *P. polycephalum* ne possède pas de paroi en plus de sa membrane plasmique. Il sécrète continuellement un mucus qui se dépose sur les surfaces qu'il traverse. En plus d'être une protection, ce mucus lui permet d'identifier les endroits où il est déjà allé et d'éviter ainsi de retourner dans une zone dont il a déjà exploité les ressources (Reid et al. 2013). Ce mucus laisse une signature chimique caractéristique de l'individu qui l'a déposé. Nous allons présenter deux expériences portant sur les réactions que peuvent avoir

les plasmodes lorsqu'ils rencontrent le mucus d'un autre. Une première expérience a démontré que les individus de trois souches différentes étaient invariablement attirés par la signature chimique des autres (Vogel et al. 2015). Dans cette expérience, les plasmodes ont été soumis à des choix entre un substrat sur lequel un autre plasmode s'est nourri (que nous allons appeler substrat test) et des contrôles (neutres ou nutritifs). Vogel et al. (2015) ont démontré que les plasmodes préfèrent systématiquement le substrat test au substrat neutre. Les chercheurs expliquent ce résultat par la sécrétion de calcium par les plasmodes, un chimioattractant. Ce qui est surprenant est que ce stimulus soit préféré au substrat nutritif pour deux souches dans la majorité des cas. De plus, les 3 souches testées préfèrent ce stimulus lorsqu'il provient de la souche australienne en particulier, une souche qui sécrète davantage de Ca2+ que les autres. Il existe donc une certaine variabilité intraspécifique dans l'attraction interindividuelle chez *P. polycephalum*. Une seconde expérience a démontré que ce type d'attraction au sein d'une souche pouvait devenir une répulsion lorsque le substrat test avait été recouvert par un individu affamé pendant 24h (Briard et al. 2020). Lorsque les deux individus de la même souche sont en bonne santé, ils peuvent avoir un avantage à s'attirer pour fusionner et éventuellement se complémenter s'ils ont des carences nutritives ou échanger des informations (Vogel & Dussutour 2016). En revanche, si l'un des deux individus est affamé ou a été endommagé par un stimulus nocif -comme la caféine ou la lumière-, l'autre individu n'a peut-être pas avantage à fusionner. Dans ce cas, la signature chimique qui au départ avait un rôle positif pour les deux individus est devenue un signal négatif défavorisant l'émetteur en réduisant ses chances de fusion avec un individu sain (à un niveau inférieur à l'aléatoire, i.e. aux chances de fusion s'il n'y avait pas de signature chimique).

Des capacités de mémoire et d'apprentissage

A l'instar de l'intelligence ou de la cognition, les capacités de mémoire, d'adaptation et d'apprentissage ont des définitions propres aux domaines dans lesquels ils sont étudiés. Pourtant, la communauté scientifique gagnerait à utiliser

des définitions communes. D'une part, ces capacités peuvent être liées à des phénomènes multiples dans des domaines aussi variés que la biologie, l'intelligence artificielle et la psychologie. D'autre part, elles peuvent émerger à partir d'éléments constitutifs et de mécanismes très variables. Ces constats nous amènent à penser que des concepts aussi généraux ne devraient pas avoir de définition restrictives. Enfin, l'utilisation de définitions englobantes faciliterait beaucoup la communication entre les différents domaines scientifiques. Alors, nous définissons la mémoire comme la capacité à stocker des informations, l'adaptation comme la capacité à s'ajuster à des variations environnementales et l'apprentissage comme la capacité à ajuster ses activités par l'intégration d'informations stockées et d'informations perçues. Deux observations découlent de ces définitions. D'abord, ces définitions n'excluent pas le fait que des modèles biologiques différents réalisent une même capacité via des mécanismes différents. Ensuite, il est important de noter qu'aucune de ces définitions n'implique un état mental, les organismes dont nous allons parler n'ont aucun moyen de conscientiser leur mémoire ou leur apprentissage à la manière des êtres humains.

Quand la mémoire affecte la prise de décision

Chez la levure bourgeonnante (*Saccaromyces cerevisiae*), la présence d'un partenaire reproducteur s'accompagne d'une phéromone sexuelle favorisant la reproduction sexuée et défavorisant la reproduction asexuée. Même en l'absence de partenaire reproducteur, cette phéromone bloque la reproduction asexuée. Caudron & Barral (2013) ont découvert qu'une nouvelle mise en contact avec la phéromone permettait de lever ce blocage. Lorsqu'elle est en phase haploïde (ne contenant qu'une copie d'ADN), le cycle cellulaire de cette levure provoque une division régulière provoquant le bourgeonnement d'une nouvelle cellule à partir de la première. Il s'agit d'une reproduction asexuée, qui implique donc une duplication de l'ADN avant le bourgeonnement. Il existe deux types sexuels pour la phase haploïde de cette espèce et chacun émet une phéromone sexuelle caractéristique. Lorsqu'une cellule entre en contact avec une phéromone de l'autre sexe, un

mécanisme cellulaire bloque son cycle en G1 (la phase de cycle cellulaire juste avant la réplication de l'ADN) et empêche la réplication et la division d'avoir lieu. Ce blocage permet à la cellule d'être prête à fusionner avec une cellule haploïde de l'autre type sexuel. La cellule utilise le gradient de concentration de phéromone pour orienter une extension cellulaire dans sa direction. Si toutefois elle ne parvient pas à se reproduire après quelques heures, le mécanisme qui bloquait son cycle en G1 est levé, elle reprend donc son cycle cellulaire et recommence à se diviser. Le processus qui lève ce blocage perdure même si une phéromone sexuelle est rencontrée à nouveau, et ce pour de nombreux cycles cellulaires. Alors que les cellules filles peuvent bloquer leur phase G1 et se reproduire sexuellement, la cellule mère ne peut en faire autant qu'avec une concentration en phéromone très élevée. Le substrat de cette mémoire qui ne se transmet pas aux cellules filles serait la protéine responsable de l'arrêt du cycle en phase G1 : Whi3 (Caudron & Barral, 2013). Lorsque la cellule a détecté la phéromone mais n'a pas pu se reproduire, les protéines Whi3 s'agrègent, deviennent inactives et ne peuvent plus bloquer le cycle cellulaire. Cela a pour effet d'empêcher toute reproduction sexuelle pour la cellule mère mais pas pour les cellules filles, auxquelles les agrégats de protéines Whi3 n'ont pas été transmis. Ce type d'expérience montre que des mécanismes simples peuvent allouer une capacité de mémorisation à des organismes sans système nerveux.

Intéressons-nous à nouveau à la chimiotaxie, i.e. la capacité à détecter et à se diriger selon un gradient chimique. Il y a en fait deux manières de détecter un gradient chimique : une manière spatiale et une manière temporelle. Comme nous l'avons expliqué pour illustrer la notion de réafférence, les bactéries ajustent leur direction en comparant la concentration du stimulus chimique dans le temps. On dit qu'elles utilisent un gradient temporel pour suivre un gradient spatial (Macnab & Koshland, 1972). En fait, les bactéries n'ont pas une surface de contact assez grande pour pouvoir détecter directement le gradient spatial. Si l'on s'intéresse au mécanisme nécessaire à ces deux types de détection, on remarque que seule la détection temporelle implique une forme simple de mémorisation. Alors que la comparaison de deux points éloignés peut se faire quasi simultanément, la

comparaison d'une concentration entre un instant t et un instant t + 1 implique une mémorisation de la valeur à t.

La potentielle grande taille du plasmode de *P. polycephalum* lui permet, en théorie, de détecter directement un gradient spatial. Mais le plasmode est aussi capable d'utiliser l'espace d'une autre façon. Lorsqu'il explore l'environnement, le plasmode laisse une fine couche de mucus là où il est passé. En 2012, Reid et al. ont montré qu'il était capable d'utiliser la présence de ce mucus pour explorer plus efficacement son environnement et ce, en ne retournant pas là où il était déjà allé. L'expérience consistait à comparer deux situations dans lesquelles une barrière en forme de "U" empêchait le plasmode de détecter directement une source de nourriture. Dans la première, toute l'arène expérimentale avait déjà été explorée et recouverte de mucus par le plasmode et celui-ci ne pouvait pas différencier le mucus nouvellement déposé de l'ancien. Dans la seconde, l'arène était vierge et chacun des déplacements du plasmode déposait du mucus qu'il était capable de détecter et donc d'éviter. Lorsque l'arène contenait déjà du mucus, le plasmode tournait en rond et mettait du temps à trouver la nourriture. Dans l'autre situation, le plasmode pouvait différencier les endroits déjà visités des autres et trouvait la nourriture beaucoup plus rapidement. De la même manière que l'agencement des branches et des racines des arbres retrace l'histoire de leur développement passé et guide leur développement futur, le mucus du plasmode lui permet de trouver une source de nourriture plus rapidement. D'autre part, dans le sens où le dépôt de mucus est une modification de l'environnement, on peut dire que le mucus qui n'est plus en contact avec la cellule est une partie du phénotype étendu du plasmode. En fait, notre définition de la mémoire permet à n'importe quel phénotype étendu d'être vu comme une mémoire externe. Cette remarque justifie une distinction entre la mémoire interne et la mémoire externe, parallèlement à la distinction entre le phénotype et le phénotype étendu.

Maintenant que nous avons vu un exemple de mémoire externe, intéressons-nous à la mémoire interne. Celle-ci ne semble pas exclue des organismes aneuraux. Par exemple, en 2016, Kunita et al. ont démontré que *Tetrahymena sp,* un unicellulaire cilié, était capable de mémoriser la géométrie d'une arène de nage.

Chez *P. polycephalum*, les premières recherches à avoir mis en lumière une forme de mémoire interne ayant lieu sur un intervalle de temps plus long que la chimiotaxie ont été réalisées par Saigusa et al. (2008). Ces chercheurs ont soumis des plasmodes à des stimulations au froid, répétées à intervalle régulier. Cela avait pour effet de ralentir la locomotion du plasmode pendant ces stimulations. Leur première observation surprenante était le maintien de ces ralentissements de locomotion à intervalle régulier, même lorsque les stimulations au froid avaient cessé. Cette même équipe de recherche a obtenu des résultats similaires avec un cilié, *Blepharisma japonicum* et une plante, *Chara sp* (Kunita et al. 2013). Avec *P. polycephalum*, ils ont testé 7 périodes différentes (de 30 à 90 minutes avec un pas de 10) et ont observé au moins une réplique de ralentissement sans stimulation dans 40% des cas. Cela signifie que ces plasmodes avaient mémorisé la phase et la période de ces oscillations. La seconde observation surprenante a eu lieu après l'arrêt de ces répliques (environ 4h après l'arrêt des stimulations) : alors que la locomotion des plasmodes était redevenue normale, une seule stimulation a suffi à relancer jusqu'à 3 ralentissements périodiques. Cette observation implique que les informations de phase et de période du signal étaient conservées alors que le plasmode se comportait normalement. Ce n'est qu'après une nouvelle stimulation que ces informations mémorisées ont eu à nouveau un effet sur le comportement. Ici, les informations étaient conservées sans que comportement associé soit produit. Étonnamment, ce découplage entre la mémorisation et le comportement n'a été observé que lorsque les premières répétitions étaient espacées de 60 minutes. Cette contrainte dans la mémorisation de ces stimuli peut peut-être s'expliquer par une contrainte physiologique, liée à la nature des oscillateurs biologiques ayant encodé cette information. Selon notre définition, cette étude démontre une forme d'apprentissage, seulement, cette forme d'apprentissage est en fait très contrainte, parce qu'elle n'a lieu que dans des circonstances précises.

Quand l'apprentissage affecte la prise de décision

L'étude des capacités d'apprentissage des organismes aneuraux est en plein essor (Tang & Marshall 2018; Dussutour 2021). Cet essor aurait pu avoir lieu il y a

plus d'un siècle avec la description des comportements d'un Cilié nommé *Stentor roeseli* par Jennings (1906). Les guerres mondiales et l'échec de la réplication de ce résultat sur une autre espèce (*Stentor coeruleus*) en 1967 (Reynierse & Walsh) ont mené ces travaux dans l'oubli. Jusqu'à ce qu'en 2019, Dexter et al. (2019) répliquent les expériences de Jennings sur *Stentor roeseli* et obtiennent les résultats qui avaient été découverts 113 ans plus tôt. En plus des Ciliés, des études récentes questionnent d'éventuelles capacités d'apprentissage chez les Plantes (Gagliano et al. 2018), les Amibes (Ildefonso et al. 2019) et les Myxomycètes (Boisseau et al. 2016).

Une première (et peu utilisée) manière de comparer les types d'apprentissages entre eux est leur plasticité. On s'attend à ce que les organismes dotés de réseaux d'interaction complexes aient une plus grande plasticité dans leurs apprentissages. Autrement dit, ils auraient la capacité de réaliser un type d'apprentissage dans des situations plus variées. Une autre approche consiste à utiliser la catégorisation historique de l'apprentissage en apprentissages non associatifs et associatifs. La différence entre un apprentissage associatif et un apprentissage non associatif réside dans le nombre de stimuli impliqués : quand un apprentissage associatif implique un lien mémorisé entre deux stimuli, un apprentissage non associatif implique l'ajustement d'un comportement sur la base d'un seul stimulus. Ici, nous allons nous intéresser à une forme d'apprentissage non associative : l'habituation. D'après Thompson & Spencer (1966), l'habituation est la diminution d'une réponse comportementale suite à une stimulation répétée. Si cette diminution de réponse est la conséquence d'une fatigue sensorielle, motrice ou d'une adaptation sensorielle, on ne peut pas parler d'habituation. Pour faire la distinction entre l'habituation et la fatigue sensorielle ou motrice, Thompson & Spencer ont ajouté à leur définition le critère de la spécificité : l'habituation à un stimulus ne doit pas modifier la façon avec laquelle l'organisme ressent et réagit à une autre stimulation. Enfin, pour faire la distinction entre l'habituation et l'adaptation sensorielle, ils ont ajouté le critère de la récupération : un organisme habitué peut récupérer de son habituation, i.e. être capable, après un certain temps sans stimulation, de récupérer sa réaction initiale au stimulus. D'après Dussutour

(2021) et Dinet (2021), le terme microbiologique d'adaptation chimiotactique bactérienne correspond à de l'habituation. Elle correspond à la façon avec laquelle les bactéries régulent leur réponse chimiotactique lors d'une stimulation prolongée (Colin et Sourjik, 2017). En fait, cette capacité permettant aux organismes d'apprendre à ignorer un stimulus peut s'avérer utile dans n'importe quel environnement naturel. En effet, si des stimuli sont présents sur une période prolongée, continuer à y réagir de manière prononcée peut poser problème lors de l'arrivée d'un nouveau stimulus. Si celui-ci est vraiment dangereux ou avantageux, la présence continue des autres stimuli empêcherait l'organisme de répondre correctement à ce danger / avantage. La complexité des environnements naturels les plus simples est suffisante pour justifier l'intérêt évolutif de la capacité d'habituation.

L'habituation et les critères de spécificité et de récupération ont été montrés chez *P. polycephalum* en 2016 par Boisseau et al. Ces expériences consistaient à mettre des plasmodes en contact avec de la caféine et de la quinine pendant six jours en mesurant leur forme, leur taille et leur vitesse. Peu de temps après, la même équipe (Vogel & Dussutour 2016) a aussi montré que la mémoire de l'habituation pouvait être transférée d'un individu à un maximum de 7 individus naïfs. Ce transfert ne fonctionnait que si les plasmodes avaient le temps de fusionner et de relier leurs systèmes circulatoires, ce qui avait lieu après 3 heures.

Objectifs

Apprentissage chez *Physarum polycephalum* : méthodes de quantification des comportements et conditions de mémorisation

Les processus biologiques ont lieu à des échelles de temps très variables. Quand on porte un regard d'éthologue sur des organismes aneuraux, la première chose à faire est de ralentir le temps pour voir quelque chose. Chose que nous faisons en étudiant des vidéos en accéléré. Nous allons présenter la manière avec

laquelle nous étudions ces vidéos pour quantifier des comportements et une capacité d'apprentissage comme l'habituation. Cette thèse s'intéresse aux processus temporels dépendants et résultants de la capacité d'habituation chez *P. polycephalum*. D'une part, la temporalité de l'habituation telle que montrée précédemment est-elle caractéristique ou peut-elle être modifiée ? Boisseau et al. (2016) et Vogel et al. (2016) ont montré une habituation après plusieurs jours d'exposition, pouvant être récupérée après deux jours sans stimulation. Cette temporalité est-elle immuable ? D'autre part et comme tout processus biologique, l'habituation chez *P. polycephalum* est le résultat de mécanismes ayant une temporalité propre. Cette thèse a pour objectif principal de mieux comprendre cette capacité en étudiant son fonctionnement, en découvrant de nouvelles manières de la détecter et de nouvelles situations où l'observer. Comme tous ces comportements sont générés par un système oscillatoire (son réseau contractile) lui-même géré par des systèmes oscillatoires (concentration en ions et molécules métaboliques), quels rôles peuvent avoir ces systèmes sur une capacité d'apprentissage ? Pour avancer dans ces questionnements, cette a thèse a aussi été l'occasion de développer un programme d'analyse d'images permettant à des utilisateurs (qui n'ont pas besoin de savoir programmer) de quantifier automatiquement la dynamique de croissance, de forme et du comportement oscillatoire des plasmodes et de n'importe quel organisme évoluant sur une surface plate et immobile.

Dans le premier chapitre, nous allons présenter de nouvelles caractéristiques du comportement chimiotactique de *P. polycephalum*. En particulier le fait qu'il ajuste son comportement pour augmenter l'épaisseur de mucus entre sa membrane plasmique et un substrat aversif. Dans le second chapitre, nous allons explorer la temporalité de l'habituation en regardant à quelles échelles de temps celle-ci peut avoir lieu. Étonnamment, nous allons voir que la mémoire de l'habituation se conserve lors du passage par une phase de dormance et qu'un comportement typique de l'habituation peut être provoqué par une simple injection topique de la substance aversive. Dans le troisième chapitre, nous allons présenter les principaux systèmes oscillatoires de *P. polycephalum* et évoquer leurs potentielles implications dans une capacité d'apprentissage. Dans le quatrième chapitre, nous allons

présenter le programme d'analyse d'images permettant de quantifier automatiquement les comportements d'une cellule géante comme *P. polycephalum*.

Chapitres

Chapitre 1: La composition du substrat dirige les comportements chez *P. polycephalum*

Résumé

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à un comportement qui peut sembler complexe mais qui est capital pour la survie d'un être comme *P. polycephalum*. Lorsqu'il est sous forme de plasmode, c'est une cellule mobile qui peut recouvrir de grandes surfaces. Sa fine membrane régule les échanges chimiques avec la surface qu'elle recouvre mais ne peut pas totalement les bloquer. Dans un environnement trop sec, elle perdrait toute son eau. Dans la nature, elle parvient à éviter cela en détectant et en se déplaçant dans les endroits les plus humides. Cette capacité à détecter un stimulus chimique (comme l'humidité, la salinité, la présence de nourriture…) et à se déplacer en direction ou à l'encontre de celui-ci s'appelle la chimiotaxie. En plus d'ajuster la direction de son déplacement, cette cellule peut ajuster sa forme et sa vitesse en fonction du stimulus avec lequel elle est en contact. Dans cette étude, nous avons quantifié l'effet d'un stimulus attractif et d'un stimulus aversif sur la forme et la façon avec laquelle le plasmode se déplace dans deux conditions: dans un cas, le stimulus était réparti uniformément et dans l'autre, un ou deux stimulus(i) était(ent) placé(s) à distance du plasmode. Pour réaliser ces expériences, Audrey Dussutour a choisi le sel (NaCl) comme stimulus aversif et un sucre (le glucose) comme stimulus attractif. Tous les plasmodes utilisés pendant ces expériences ont été pris en photo toutes les 5 minutes pendant 35h afin de réaliser des vidéos de leurs mouvements en accéléré. Ensuite, Fernando Patino-Ramirez, à l'institut technologique de Géorgie, a analysé ces vidéos pour en extraire les variables suivantes : le temps avant un premier mouvement, la vitesse de croissance initiale, le temps avant que le plasmode quitte un endroit pour la première fois, la vitesse avec laquelle il recouvre une surface une seconde fois, la surface totale recouverte à la fin de l'expérience, et d'autres

variables permettant de décrire sa forme générale comme la circularité, l'excentricité, le solidité et le nombre de pseudopodes. Mon rôle consistait à utiliser des outils statistiques pour déterminer si ces variables étaient impactées par les conditions expérimentales.

Quand les stimuli étaient placés à distance du plasmode, nous n'avons pas détecté de différence entre les conditions contrôles (pas de stimulus) et tests (glucose ou glucose + NaCl). Dans ce cas, la chimiotaxie ne s'observe qu'à travers l'orientation du plasmode qui se dirige vers (glucose) ou évite (NaCl) le stimulus. En revanche, plusieurs des variables mesurées changent fortement lorsqu'un stimulus est réparti de manière uniforme. Que le plasmode soit sur un substrat nutritif (glucose) ou aversif (NaCl), le plasmode se déplace plus lentement que sur un substrat neutre (ne contenant que de l'agar et de la cellulose).

La présence de glucose n'a, a priori, pas de raison de ralentir le plasmode dans l'exploration de son environnement. Cependant, le glucose est une source de nourriture qui demande du temps pour être consommée. Lorsque l'environnement contient du glucose uniformément réparti, le plasmode doit faire un compromis entre ses réactions internes lui permettant de consommer de l'énergie chimique pour se déplacer (via son catabolisme) et ses réactions internes lui permettant de transformer le glucose en énergie chimique (via son anabolisme).

Lorsqu'il est sur un substrat aversif, le début de sa croissance est retardé et lorsque celle-ci a commencé, elle se fait de manière plus compacte, avec moins de pseudopodes et en favorisant les surfaces déjà explorées. Cet évitement de contact avec la surface aversive est typique du comportement d'aversion chez *P. polycephalum*. Cette aversion, bien que très étudiée, n'est pas encore parfaitement décrite. Dans cette étude, nous nous intéressons à une nouvelle caractéristique de cette aversion. Comme dit plus haut, *P. polycephalum* doit se contenter d'une fine membrane pour limiter ses échanges chimiques avec l'extérieur. A contrario, les plantes, les champignons et les bactéries se protègent avec une paroi en plus de leur membrane plasmique. En démontrant que le plasmode avait tendance à retourner sur des surfaces qu'il avait déjà recouvert, nous émettons l'hypothèse qu'il utilise

les couches de mucus qu'il dépose comme une protection. A chaque fois qu'il retourne sur une surface sur laquelle il a déjà déposé une couche de mucus, il augmente sa distance avec la surface aversive et limite les échanges avec celle-ci. De manière générale, son mucus lui sert de protection contre des facteurs biotiques et abiotiques, de bouclier hydrophile diminuant les pertes d'eau par évaporation, de lubrifiant facilitant le déplacement par glissement, et de facilitateur de la phagocytose (l'ingestion de nourriture par invagination de la membrane jusqu'à ce qu'elle forme une bulle interne peu à peu remplie d'enzymes digestives) et de régulateur des échanges ioniques. Les fonctions cellulaires basiques ne sont pas les seules à être facilitées par la présence de mucus. Chez *P. polycephalum*, le mucus est aussi utilisé comme une mémoire externe facilitant sa navigation dans un environnement complexe (Reid et al. 2012). La plasticité comportementale de *P. polycephalum* lui confère des capacités d'adaptation à des environnements variés et cela même à travers sa capacité à sécréter du mucus.

Substrate composition directs slime molds behavior

Fernando Patino-Ramirez [1*], Aurèle Boussard [2], Chloé Arson[1,3] & Audrey Dussutour[2,3*]

[1]School of Civil and Environmental Engineering, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA. [2]Research Centre on Animal Cognition (CRCA), Centre for Integrative Biology (CBI), Toulouse University, CNRS, UPS, Toulouse, France. [3] These authors contributed equally: Chloé Arson and Audrey Dussutour. *email: fp@gatech.edu; audrey. dussutour@univ-tlse3.fr

Abstract

Cells, including unicellulars, are highly sensitive to external constraints from their environment. Amoeboid cells change their cell shape during locomotion and in response to external stimuli. *Physarum polycephalum* is a large multinucleated amoeboid cell that extends and develops pseudopods. In this paper, changes in cell behavior and shape were measured during the exploration of homogenous and non-homogenous environments that presented neutral, and nutritive and/or adverse substances. In the first place, we developed a fully automated image analysis method to measure quantitatively changes in both migration and shape. Then we measured various metrics that describe the area covered, the exploration dynamics, the migration rate and the slime mold shape. Our results show that: (1) Not only the nature, but also the spatial distribution of chemical substances affects the exploration behavior of slime molds; (2) Nutritive and adverse substances both slow down the exploration and prevent the formation of pseudopods; and (3) Slime mold placed in an adverse environment preferentially occupies previously explored areas rather than unexplored areas using mucus secretion as a buffer. Our results also show that slime molds migrate at a rate governed by the substrate up until they get within a critical distance to chemical substances.

Introduction

Large-scale spatial patterns in biology are common and knowing how these patterns evolve and what are their functional role, enables us to understand the evolution of biocomplexity (see e.g. Ball 1999; Rietkerk & van de Koppel 2008; Theraulaz et al. 2003; Teague et al. 2016). Morphogenesis has been studied in length at the cell level (see e.g. Goodwin 1989; Chalut & Paluch 2016; Driscoll et al. 2012; Salbreux, et al. 2012); cells are highly sensitive to geometrical and mechanical constraints from their microenvironment and respond to these conditions by changing shape (see e.g. Charras & Sahai 2014; van Helvert et al. 2018); these transformations impact cell migration and growth (see e.g. Driscoll et al. 2012; Friedl & Wolf 2010; Gardel et al. 2010; Inagaki & Katsuno 2017). Cellular migration is a fundamental property of every cell and it is crucial for the development and morphogenesis of animal body plans and organ systems (see e.g. Aman & Piotrowski 2010; Reig et al. 2014; Yamada & Mayor 2016). Cell migration is either in a random direction or directed towards localized cues (Hind et al. 2016; Mseka et al. 2007; King & Insall 2009; Iglesias & Devreotes 2008). Mechanisms of cellular movement have been mostly studied in chemotactic cells, such as neutrophils (Hind et al. 2016), bacteria (Larsen et al 1974), Ciliata (Nakaoka & Iwatsuki 1992), fungi (Saranak & Foster 1997) and cellular slime molds (King & Insall 2009).

Due to its extremely fast migration rate and highly irregular shape, the acellular slime mold *P. Polycephalum* represents a prime example of differentiated growth and thus offers an attractive model for the analysis of morphogenesis dynamics underlying cellular migration and exploration (Nakagaki et al. 2000; Kuroda et al. 2015; Rodiek & Hauser 2015; Vogel et al. 2015; Vogel et al. 2018). *P polycephalum* is a giant single-celled organism that can grow to cover several square meters. Its morphology includes search fronts that are connected to a system of intersecting veins, in which oscillatory flows of the protoplasm “shuttle streaming” take place. This vein network allows (1) an efficient distribution of chemical signals, oxygen, nutrients over large distances and (2) cell migration at a

speed of few centimeters per hour (Aldrich 1982; Oettmeier et al. 2017). The driving force for this protoplasm streaming is a periodic, peristaltic contraction and relaxation of the veins due to the actin-myosin interaction, which is regulated by oscillations of intracellular chemicals such as calcium (Ueda 1993; Kuroda & Kuroda 1982; Ueda 1993. As it explores its environment, the slime mold extends temporary armlike projections named pseudopods. It also secretes continuously a thick extracellular slime (Farr et al. 1972). The glycoprotein nature of the extracellular slime coat endows *P. polycephalum* with unique protective and structural properties that favor survival of the migrating, naked slime mold (Sesaki & Ogihara 1997). As the slime mold is foraging, it avoids areas covered with this mucus, which marks previously explored areas (Reid et al. 2012; Reid & Beekman 2013).

In the presence of chemical substances in the environment, *P. Polycephalum* shows directional movements towards or away from the stimuli (i.e. chemotaxis). *Physarum* morphology, evolution and behaviors are strongly affected by the availability, location and concentration of nutrients. When the slime mold senses attractants (e.g. food cues) using specific receptors located on the membrane, the oscillation frequency in the pseudopod closest to the attractant increases, causing cytoplasm to flow towards the attractant (Ueda et al. 1980). On the contrary, when repellents such as salts are sensed, the oscillation frequency decreases and the slime mold moves away from the repellent (Ueda et al. 1980). Although slime molds lack the complex hardware of animals with brains, they live in environments that are as complex and they face the same decision-making challenges (Reid & Latty 2016). Hence, acellular slime molds have been the subject of a wide range of studies showing that they can solve complex biological and computational problems without any specialized nervous tissue Nakagaki et al. 2000; Reid et al. 2012; Reid & Beekman 2013; Saigusa et al. 2008; Tero et al. 2010; Latty et al. 2015; Reid et al. 2015; Boisseau et al. 2016; Dussutour et al. 2019; Adamatzky 2012).

In this paper the objectives are to characterize the morphology and dynamics of *Physarum* exploring various environments. First, we investigate how movement

is affected by homogeneous environmental conditions: adverse environment (using salt as a repellent (Terayama et al. 1977); nutritive environments (using glucose as a chemoattractant (Carlile 1970; Ueda et al. 1975) with 2 different concentrations) and a neutral environment (using plain agar). Second, we analyze the geometrical evolution of slime molds placed at a distance from a nutritive spot (glucose), with and without a repelling spot (salt) in between. We characterize slime molds' movement both temporally and spatially, to capture the full dynamics. To this aim, we develop a program that automatically analyzes sequences of images to track the areas covered and explored by the slime mold, the slime mold shape, the refinement and secondary growth cycles, as well as the distance to the nutritive spot.

Results

Homogeneous environment.

In order to study the influence of the environment on slime mold expansion rate, we analyzed the areas covered by slime mold, unexplored substrate and mucus over time, as shown in Fig. 1. In a neutral (control) and slightly nutritive environment (glucose at 100 mM), the slime molds started to spread from the very beginning of the experiment (Fig. 1; Table 1 and Fig. 5 in S1 Appendix, $P > 0.05$). By contrast, in a highly nutritive environment (200 mM glucose), slime molds started to explore later ($P < 0.001$ when compared to the control). Slime molds placed in an adverse environment (100 mM NaCl) were lagging the most and only started exploring after 3 hours ($P < 0.001$ when compared to the control). Once the slime molds started to explore, they all grew at the same rate (Fig. 1; Table 2, Fig. 6 in S1 Appendix, $P > 0.05$ when compared to the control) except the ones placed in a highly nutritive environment which were slowed down ($P < 0.001$ when compared to the control).

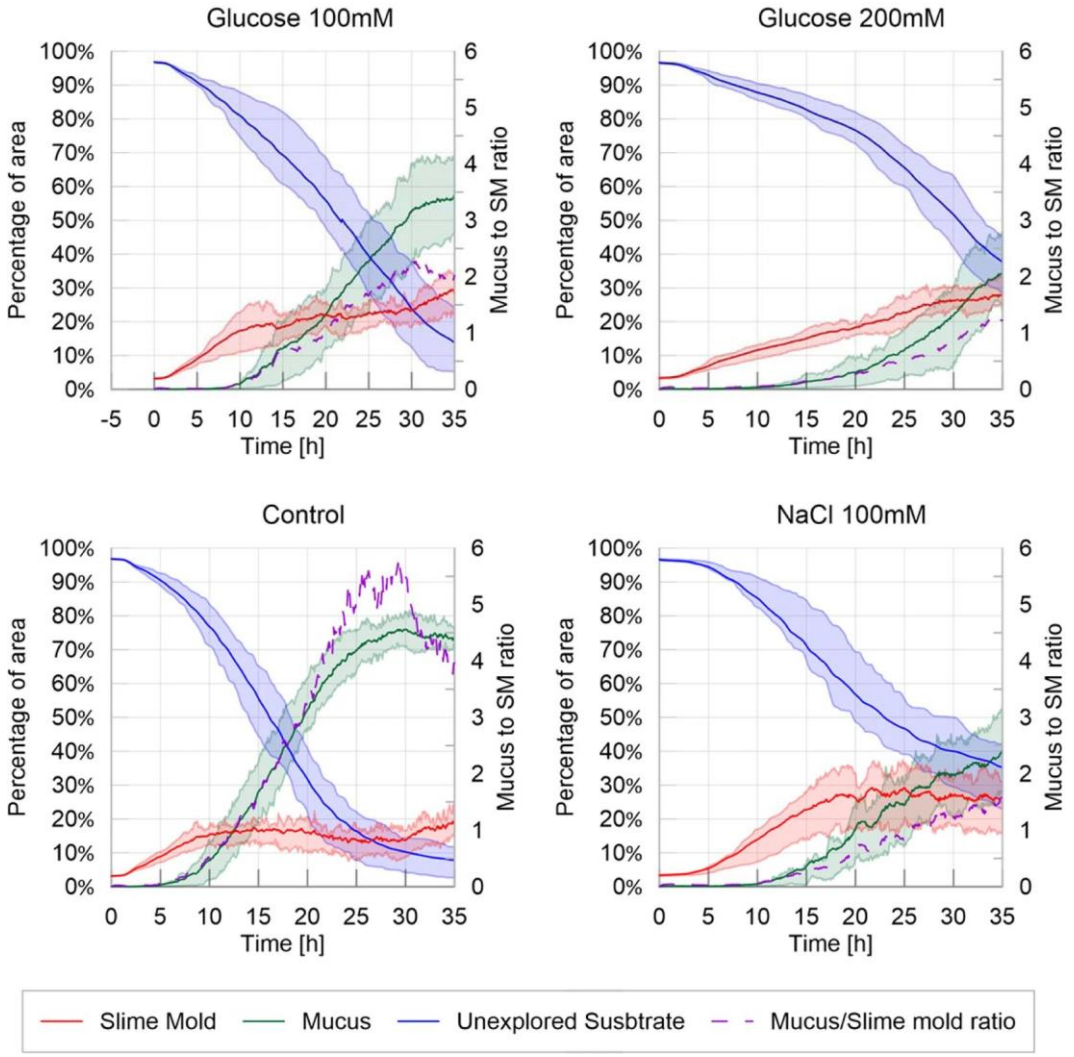


Figure 1. Fraction of area covered by slime mold, mucus and unexplored substrate – Homogeneous environment. The solid lines correspond to the average index calculated over the 20 replicates, while the shaded areas correspond to the first and third quartiles of the data, the dashed line corresponds to the ratio between the average mucus area over the average slime mold area over time.

At the end of the experiment (after 35 hours), the slime molds reached a similar surface area in a control environment and in an adverse environment (Table 3 and Fig. 7 in S1 Appendix, $P > 0.05$ when compared to the control). Interestingly, after reaching a plateau at 18 hours, the area covered by the slime molds in an

adverse environment oscillated with seemingly cyclic fluctuations (Fig. 1). In both a slightly and a highly nutritive environment, the slime molds reached a higher final surface area than the slime molds placed in a control environment ($P < 0.001$ in both comparisons) and covered approximately 30% of the arena at the end of the experiment. It is worth noting that in a highly nutritive environment, the area of the surface covered by the slime molds never reached a plateau after 35 hours, suggesting that the slime molds did not reach its maximum surface area (Fig. 1).

Refinement i.e. appearance of mucus, was observed after 5 hours in the control environment. In all other environments, mucus appeared later (Table 4 and Fig. 8 in S1 Appendix: $P < 0.001$ for all treatments when compared to the control). In a highly nutritive environment, mucus was only observed after 10 hours, which marked the strongest delay in the refinement process. Once the mucus started to be apparent, its surface area grew quicker in the control environment than in the other three treatments (Table 5 and Fig. 9 in S1 Appendix; $P < 0.001$ for all treatments when compared to the control). Thus the area of the surface covered by mucus at the end of the experiment was the largest in the control environment where it reached 75% of the arena against 55%, 40% and 35% for the slightly nutritive, the adverse and the highly nutritive environments respectively (Table 6 and Fig. 10 in S1 Appendix; $P < 0.001$ for all treatments when compared to the control).

Hence, slime molds placed in a control environment explored almost all the arena leaving only 5% of the arena unexplored while in the other treatments the area of the surface unexplored were significant: 15%, 35% and 38% for the slightly nutritive, the highly nutritive and the adverse environments respectively. Interestingly, although the growth rate dynamics differed between highly nutritive and adverse environments, the final unexplored surface areas were similar. In a highly nutritive environment the slime molds grew slowly and steadily while in an adverse environment slime molds grew rather quickly but after a long delay.

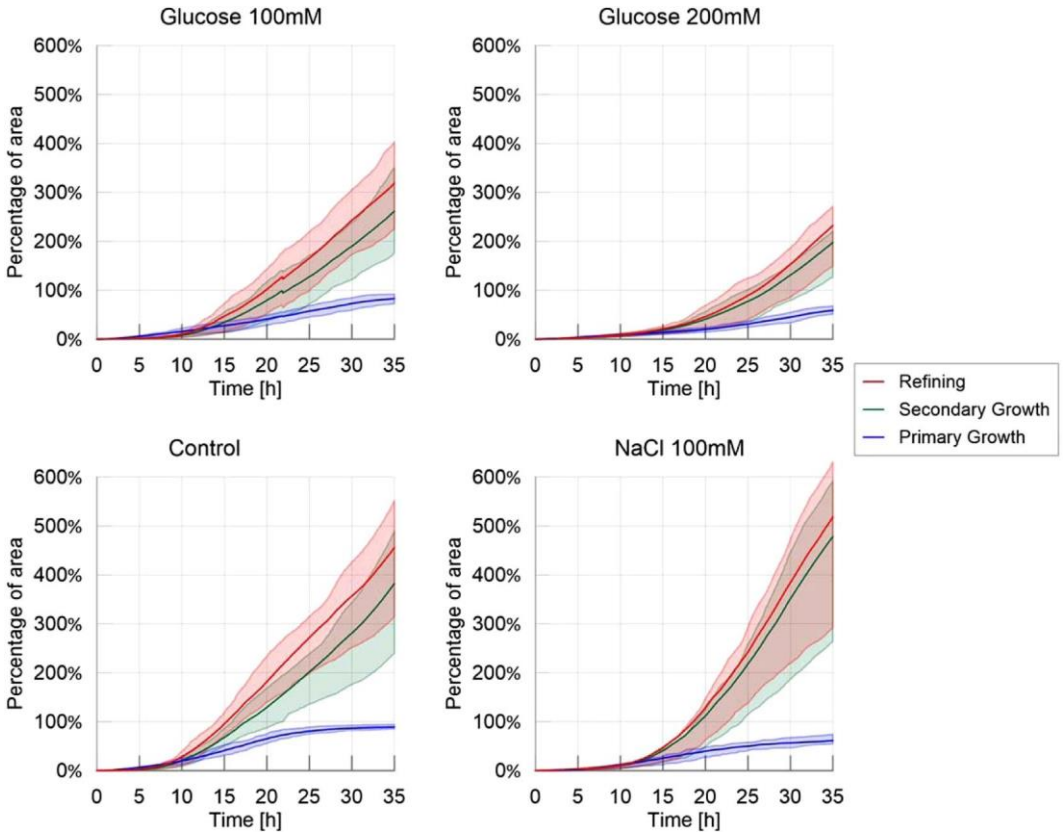


Figure 2. Cumulative areas covered by primary growth, refinement and secondary growth – Homogeneous experiments. The solid line corresponds to the average index calculated over the 20 replicates, while the shaded areas correspond to the first and third quartiles of the data.

Next, we analyzed the evolution of the cumulative areas covered by primary growth, refinement and secondary growth (Fig. 2). The cumulative area covered by secondary growth, which reveals the cyclic nature of the exploration process, was the highest in the adverse environment (480% coverage) followed by the control environment (380%), the slightly nutritive environment (250%) and the highly nutritive environment (180%). All comparisons lead to significant differences $P < 0.05$, except control vs. adverse environment (Table 7 and Fig. 11 in S1 Appendix). This observation confirms that exploration was slowed down by the presence of nutrients, and that the pulsatile behavior (i.e the exploration of previously explored area) was stimulated by repellents.

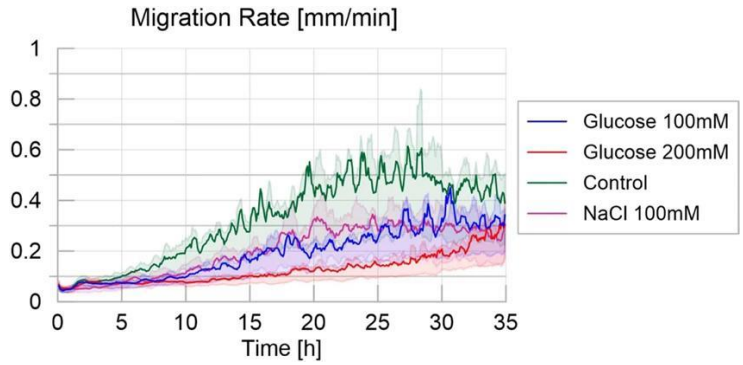


Figure 3. Migration rate over time for the four different treatments, defined as the maximum distance between the contours of the slime mold between two consecutive images divided by their time interval (5 minutes apart), measured in millimeters per minute. The solid line corresponds to the average calculated over 20 replicates per treatment, while the shaded areas correspond to the first and third quartiles of the data.

In accordance with the previous results, Fig. 3 (average migration rate for the treatments) shows a higher migration rate for the control treatment than for the other treatments (Table 8 and Fig. 12 in S1 Appendix: $P < 0.001$ for each pairwise comparison). While slime molds exploring the highly nutritive environment were slower than slime molds exploring the slightly nutritive or the adverse environment ($P < 0.001$ each), these two showed no significant differences ($P > 0.05$).

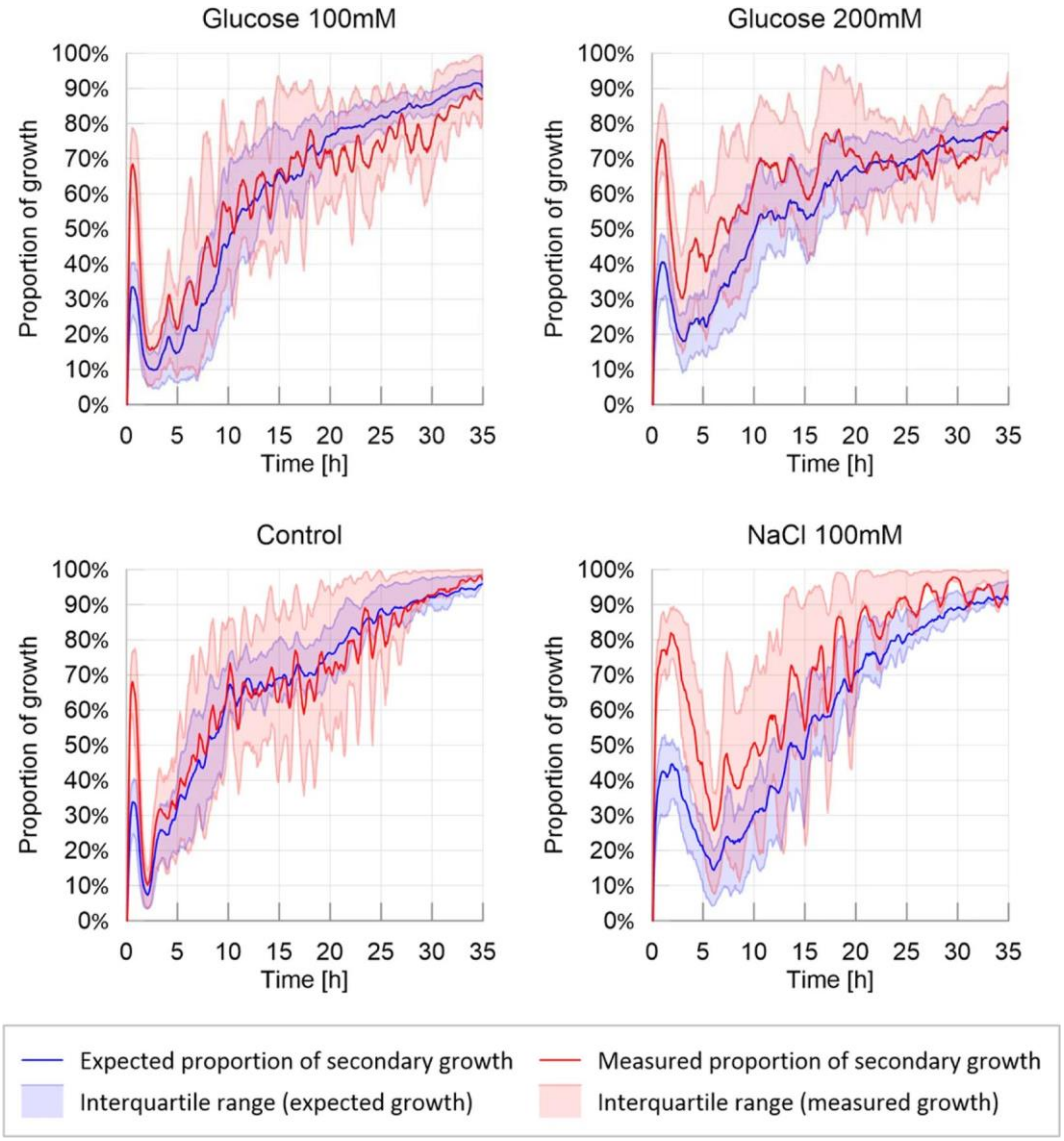


Figure 4. Ratio of secondary growth: observed and expected proportion of secondary growth. The solid line corresponds to the average calculated over 20 replicates per treatment, while the shaded areas correspond to the first and third quartiles of the data.

The slime molds exploring the adverse environment showed the highest probability to explore a previously explored substrate than the other treatments as shown in Fig. 4 and Supplementary Materials (Tendency for secondary growth: Table 9 and Fig. 13 in S1 Appendix: $P < 0.001$ for each pairwise comparison).

When exploring a highly nutritive environment, slime molds also displayed a significant positive tendency for secondary growth ($P < 0.001$ for each pairwise comparison) but significantly less strong than on the adverse environment ($P < 0.001$). For the other treatments, the measured proportion of secondary growth was not different from the expected proportion of secondary growth, indicating that slime molds did not avoid previously explored substrates and explored randomly (Fig. 13 in S1 Appendix). The peaks observed within the first 5 hours of the experiment correspond to an isotropic extension immediately followed by a refinement process that occurred before the slime mold started to continuously explore its environment. This behavior is often observed when a slime mold is introduced in a new environment and is referred as "contemplative" (Ueda et al. 2011) i.e. the slime mold migrates, retracts and moves again. The peak was larger in an adverse environment.

We then analyzed the evolution of the shape of the slime molds contour. Note that the experimental set ups in which slime molds were placed exhibited radial symmetry. Hence, no preferential expansion direction was expected. We thus focused on contour shape, not orientation.

As expected, circularity was initially one in all tests (circular slime mold spot), and increased over time as the contour shape departed from a circle (Fig. 2 in S1 Appendix). In the control and nutritive environments, circularity remained between 1.05 and 1.10, whereas it fluctuated between 1.05 and 1.30 in the adverse environment. This observation suggests that, in an adverse environment, slime molds explored the petri dish by spreading and thinning over larger areas than in the other environments, which led to shape changes and a decrease of slime mold circularity. However, fluctuations among the 20 replicates were too high to identify any trend in the evolution of slime mold circularity.

The eccentricity index was initially close to zero (circular cell) and increased up to almost 0.8 over time, with important fluctuations in all the treatments (Fig. 3 in S1 Appendix). Eccentricity is an indicator of the number of pseudopodia. But a non-eccentric convex hull can enclose non-circular contours of

slime mold, since pseudopodia can develop in a symmetric fashion. That is why no major difference was noted between the treatments. This result highlights the absence of preferred expansion direction in symmetric, homogeneous environments.

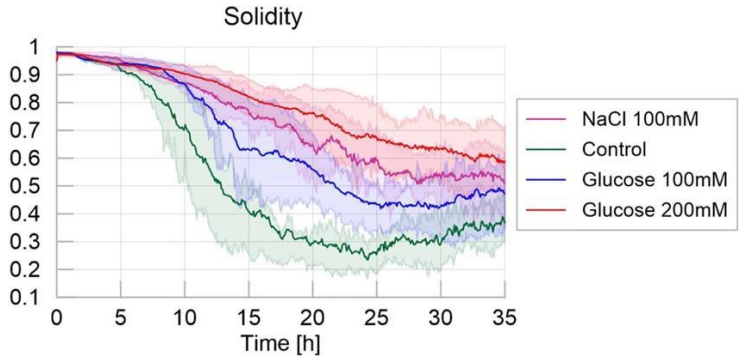


Figure 5. Solidity Homogeneous experiments. The solid line corresponds to the average index calculated over the 20 replicates, while the shaded areas correspond to the first and third quartiles of the data.

Solidity decreased with the emergence of pseudopodia, since slime mold branching disrupted the initially convex shape of the slime mold (Fig. 5). In the control environment, in which the exploration rate was the highest, the decrease of solidity of the slime mold area was the highest (and the fastest) decreasing from 1 to 0.3 and then becoming relatively stable, with fluctuations of +/−0.05 (Table 10 and Fig. 14 in S1 Appendix; $P < 0.01$ for all paired comparisons except adverse environment vs. slightly nutritive environment, where $P > 0.05$). Slower exploration resulted in a slower and steadier loss of solidity as observed in the nutritive and adverse environments. The highly nutritive environment yielded the highest solidity at the end of the

experiment (0.6), which confirmed that the presence of glucose slowed down exploration.

We next focused on the number of clusters, corresponding to the number of pseudopodia (Fig. 6). Initially the slime molds stretched as a single cluster. Once mucus started to be apparent, slime molds usually divided up into several clusters, and started the active exploration phase. In highly nutritive and adverse environments, the number of clusters over time was lower than in the other two treatments (new pseudopod number: Table 11 and Fig. 15 in S1 Appendix, and $P < 0.01$ for all paired comparisons except for adverse environment vs. highly nutritive environment). This observation confirmed that the presence of concentrated nutrients slowed down the exploration, and that the presence of repellents triggered a highly pulsatile behavior with small exploration fronts, which were sometimes not detected as separate clusters.

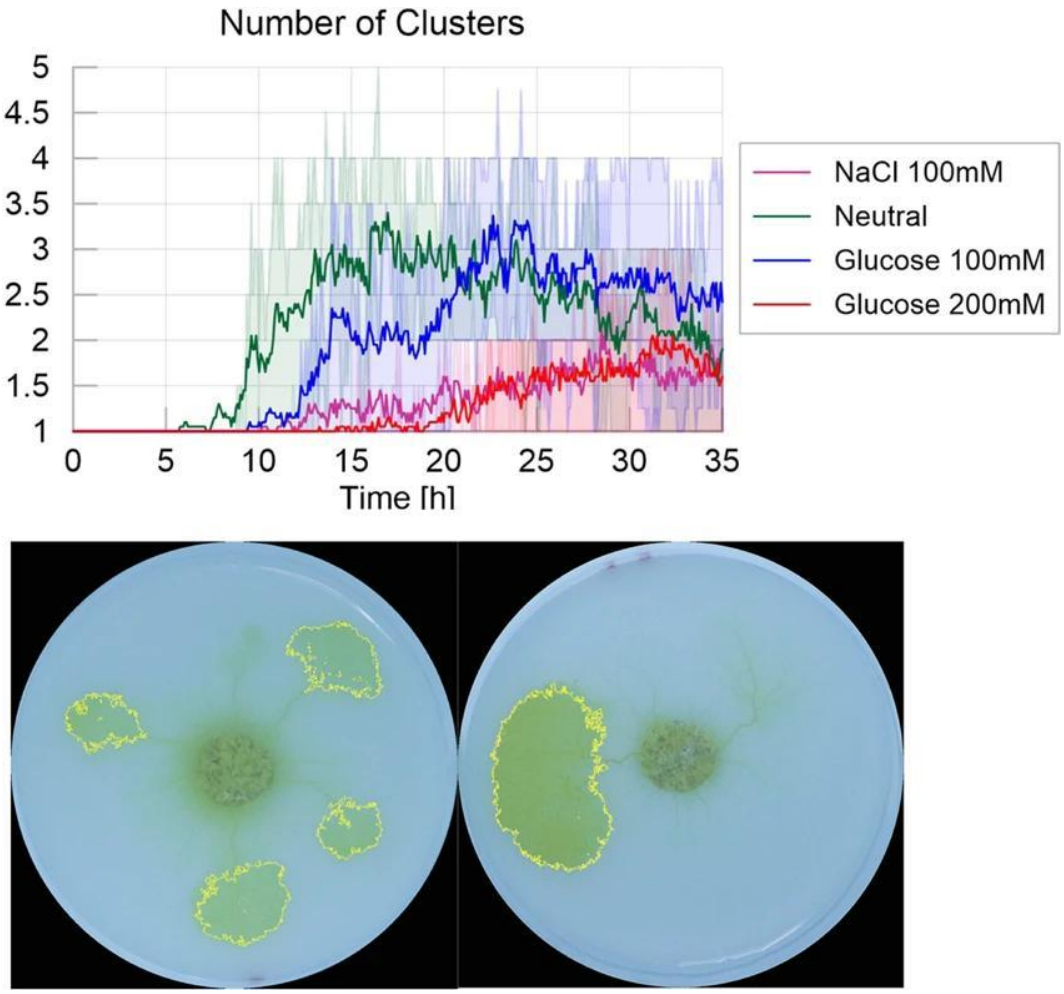


Figure 6. Number of clusters Homogeneous experiments. The solid line corresponds to the average index calculated over the 20 replicates, while the shaded areas correspond to the first and third quartiles of the data. Pictures show examples of clusters for the Control environment (left) and 200 mM Glucose environment (right).

Spot experiments.

In the spot experiments, we studied the influence of discrete distributions of nutrients and repellents on exploration dynamics. When looking at the evolution of slime mold, mucus and unexplored substrate over time (Fig. 7), we only observed marginal differences among the treatments, which all exhibited similar patterns of

exploration, e.g. similar percentage of non-explored area and similar mucus accumulation. The presence of an adverse spot only delayed the appearance of the first pseudopod (first movement: Table 12 and Fig. 15 in S1 Appendix, $P < 0.05$) but not the first appearance of mucus (first appearance of mucus: Table 15 in S1 Appendix, not significant). The only noticeable differences lie in the surface area reached at the end of the experiment: slime molds that were offered a highly nutritive spot grew larger (final surface area: Table 14 and Fig. 17 in S1 Appendix; $P < 0.01$). By contrast, the area of the surface covered by mucus was lower (mucus final surface: Table 17 and Fig. 18 in S1 Appendix; $P < 0.01$) than slime molds that were offered a slightly nutritive spot. In comparison with the experiments conducted in homogeneous environments, we did not observe any expansion/refinement cycles in the spot experiments, meaning that slime mold spread steadily towards the food source despite the presence of an obstacle on the way.

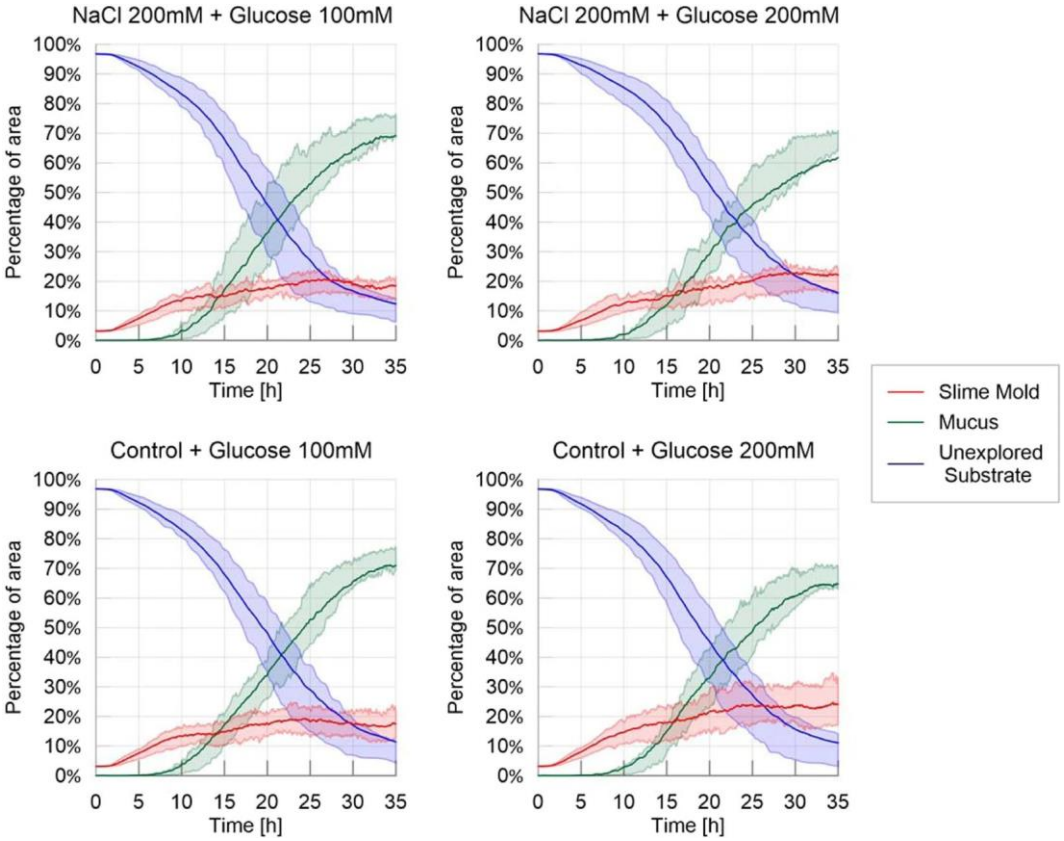


Figure 7. Fraction of area covered by each entity (slime mold, mucus, unexplored substrate) – Spot experiments. The solid line corresponds to the average index calculated over the 20 replicates, while the shaded areas correspond to the first and third quartiles of the data.

The exploration behavior in the spot experiments was similar to that observed in the control environment in homogeneous experiments as observed in Fig. 8, which includes the average percentage of unexplored area for the homogeneous and spot experiments shown in Figs 1 and 7 respectively. This suggests that the spatial exploration of slime mold depended mostly on the substrate and not on the geometric distribution of the nutritive and adverse stimuli.

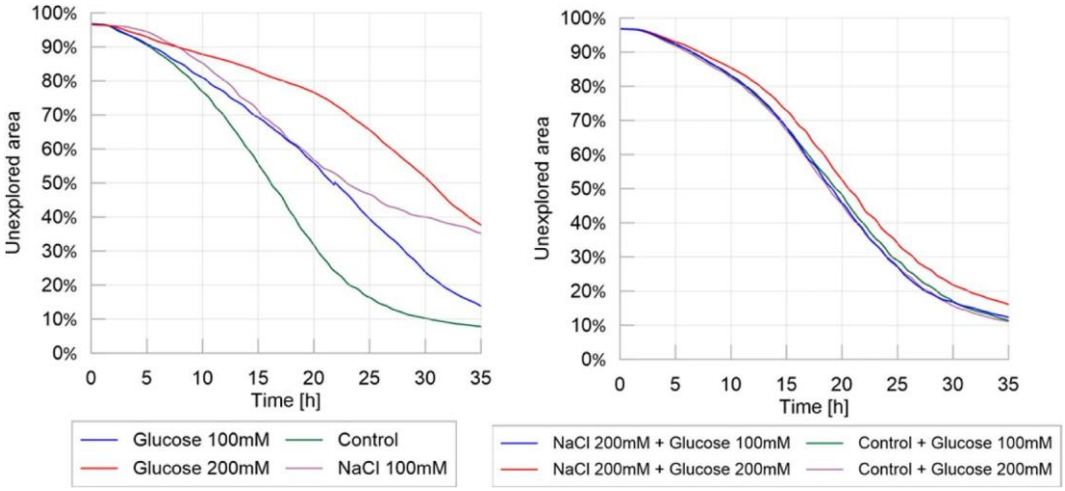


Figure 8. Exploration behavior: homogeneous experiments (left) vs. spot experiments (right). Percentage of unexplored area over time. Mean values of over 20 replicates for each different treatment.

The cumulative areas covered by secondary growth for the spot experiments (Fig. 9) were also similar for all treatments (Table 18 in S1 Appendix, $P > 0.05$), suggesting again, that isolated spots with nutritive or adverse stimuli did not alter the overall exploration of slime molds when growing on the same, control, substrate.

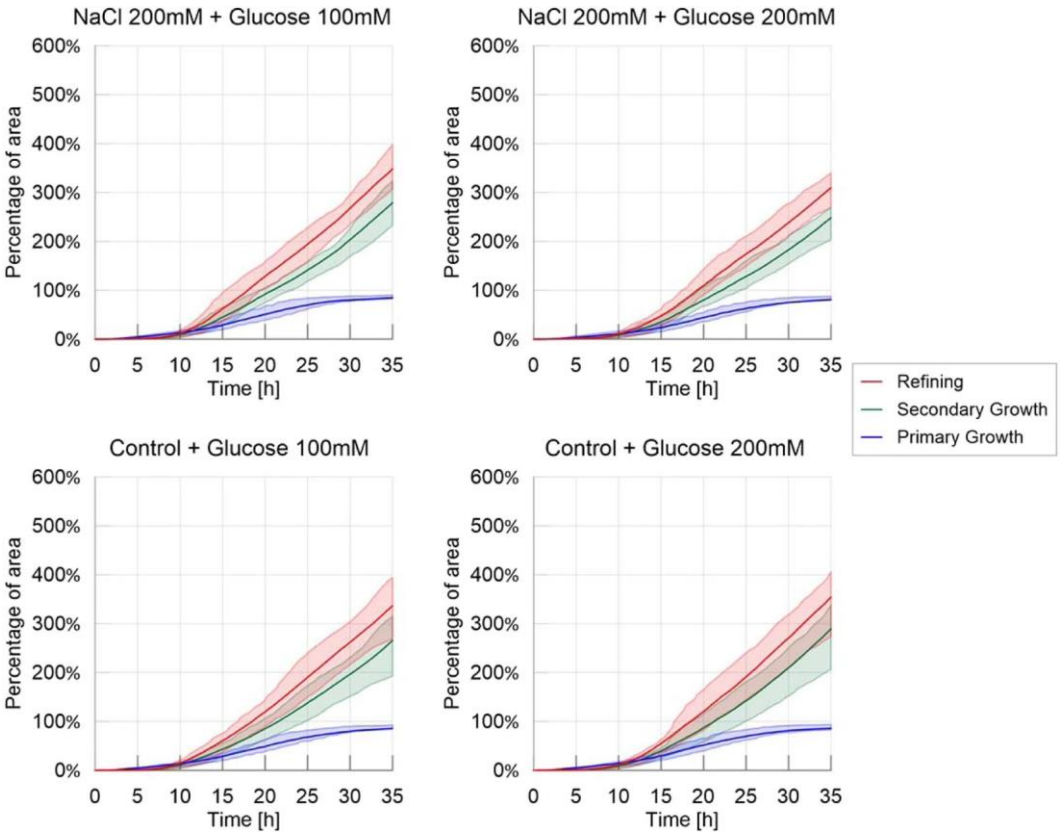


Figure 9. Cumulative areas covered by primary growth, refinement and secondary growth – Spot experiments. The solid line corresponds to the average index calculated over the 20 replicates, while the shaded areas correspond to the first and third quartiles of the data.

The trends of migration rate, as shown in Fig. 10, show that slime molds were not affected by the difference between treatments, showing only a slight effect of the concentration of the food spot ($P < 0.05$), as shown on Table 19 in S1 Appendix. This effect showed that the migration rate was slightly superior when slime molds were offered a higher than a lower nutritive spot.

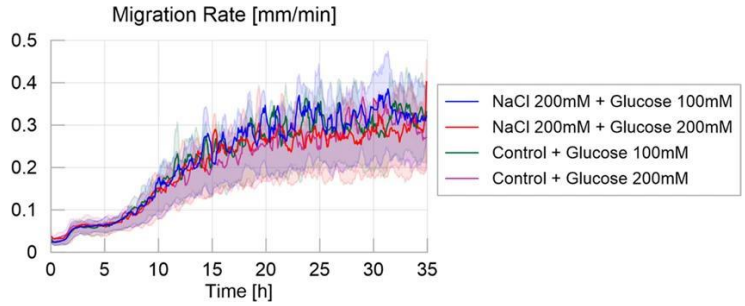


Figure 10. Migration rate over time for the four different treatments, defined as the maximum distance between the contours of the slime mold between two consecutive images, divided by their time interval (5 minutes apart), measured in millimeters per minute. The solid line corresponds to the average calculated over 20 replicates per treatment, while the shaded areas correspond to the first and third quartiles of the data.

Similarly, looking at the predilection of slime molds to grow towards mucus (secondary growth), as shown in Fig. 11, no significant differences were observed between treatments (Table 19 in S1 Appendix), which suggests that the growth type is not influenced by the existence or concentration of discrete attracting/repelling spots.

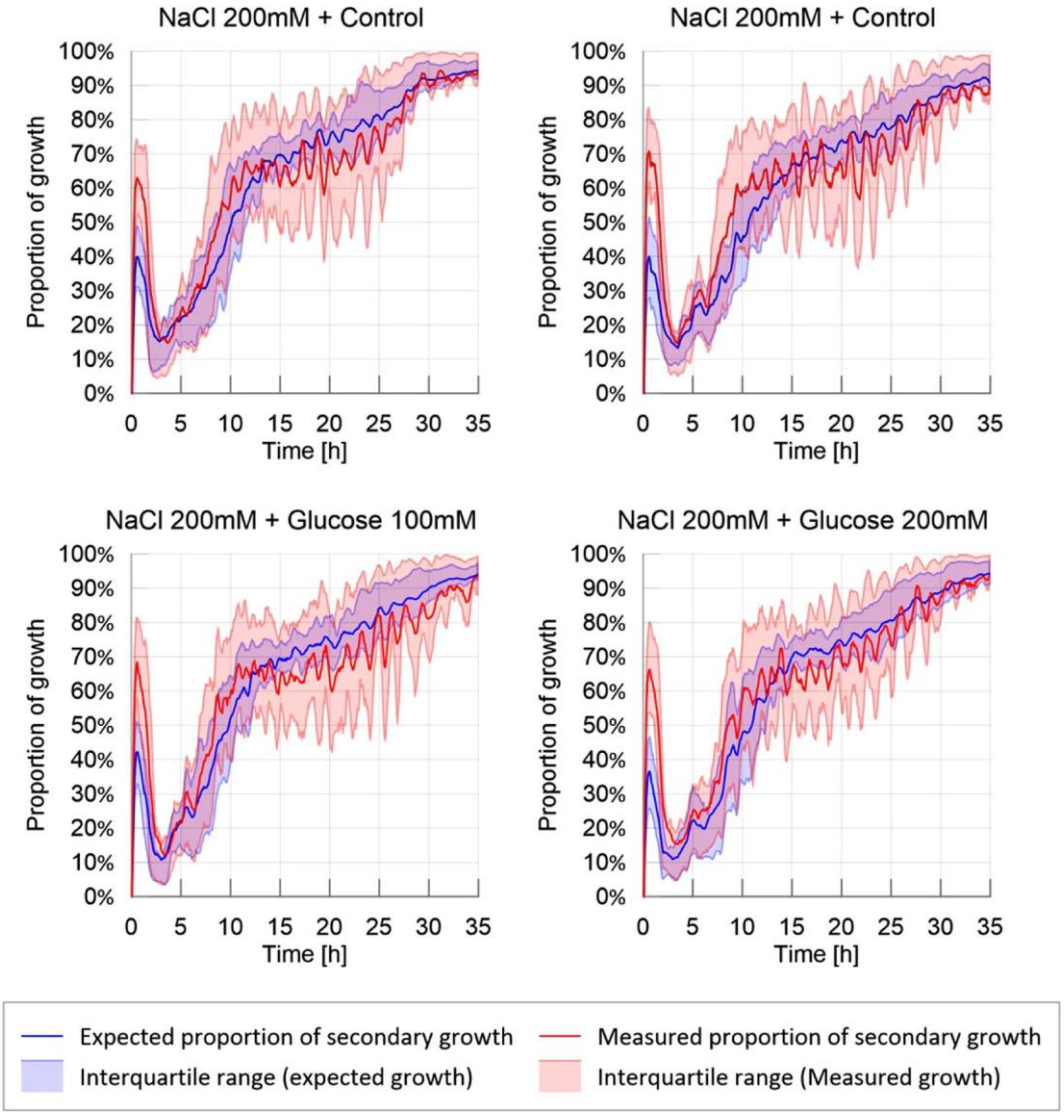


Figure 11. Probability of secondary growth: observed and expected proportion of secondary growth. The solid line corresponds to the average calculated over 20 replicates per treatment, while the shaded areas correspond to the first and third quartiles of the data.

The results obtained for the four different shape indexes (Fig. 4 in S1 Appendix) for the spot experiments support the hypothesis that discrete spots of nutrients or repellents did not affect the overall expansion dynamics and exploration cycles. This interpretation is confirmed by the average number of pseudopods, which was found to be correlated to the formation of mucus during the exploration phase: in all the spot experiments, the number of clusters increases from 1 to 2.5

within around 12 hours, to reach a plateau afterwards. In other words, less exploration cycles were observed in non-homogenous environments, yielding less pseudopodia.

The evolution of the shortest distance from the slime mold cell to the glucose spot is shown in Fig. 12, which can be viewed as a "survival" plot, displaying the proportion of the replicate (P) in which slime mold has not reached the nutritive spot at a given time. Both increasing the concentration of nutrient in the spot (from slightly nutritive to highly nutritive) and adding an aversive spot increased the time to reach the food patch by decreasing the probability to reach it (time to food patch: Table 22 and Fig. 18 in S1 Appendix, nutritive: $P < 0.01$; aversive: $P < 0.05$).

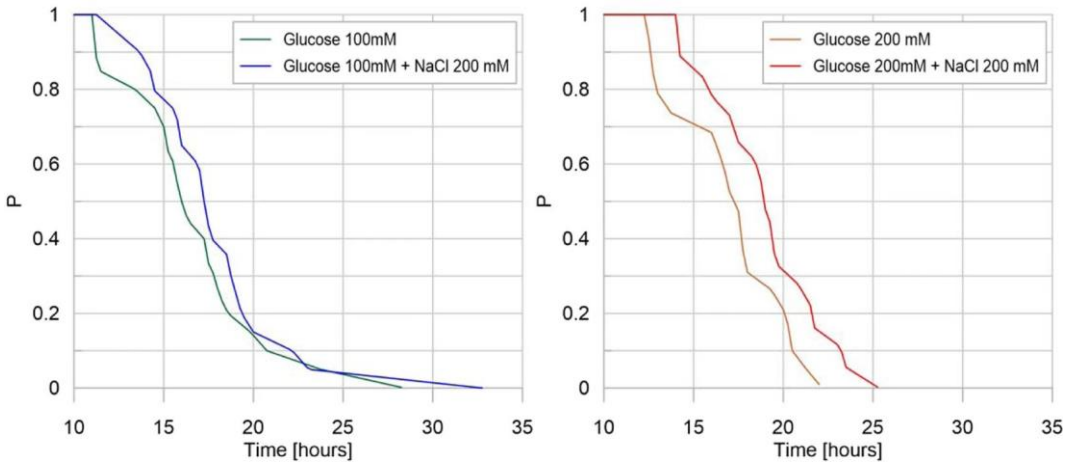


Figure 12. Survival plot: glucose concentration effect. For each treatment, on the vertical axis, the value P corresponds to the fraction of replicates that have not reached the glucose spot at a given time. For a representative number of replicates, P is the probability that glucose has not been reached by slime mold at a given time, for a specific treatment. On the horizontal axis, each value of time corresponds to the average time it takes for a certain fraction of slime mold (P) to reach the glucose spot.

Discussion

Exploration in slime molds involves two different processes: area extension and movement (Vogel et al. 2015). Slime molds' locomotion and morphogenesis depend on the response of the organism to the environmental conditions such as light, hygrometry, pH, or the presence of chemicals (Aldrich 1982; Jones 2010). In the present paper, we show that distributions of nutritive and aversive cues affected drastically the exploration pattern of slime molds.

The typical exploration behavior of a slime mold (in control conditions) started by a stretching period where the slime molds grew uniformly in all directions for 10 hours. Then, the contour of slime mold lost circularity when the first pseudopodia appeared, which also corresponds to the first occurrence of mucus. This phenomenon is typical of the directed digitated growth, or branching phase, described by numerous authors (Vogel et al. 2015; Halvorsrud & Wagner 1998; Nakagaki et al. 2000; Latty & Beekman 2009; Vogel & Dussutour 2016). Slime molds developed multiple pseudopodia and did not exhibit any preferential exploration orientation. At the end of the experiment, almost all the arena was explored by the slime mold. Thus the exploration was characterized by three phases: (i) Primary growth only, in the quasi-absence of mucus (5–10 hours); (ii) Combination of primary and secondary growth; (iii) Secondary growth only, when the slime mold stops exploring new substrate areas.

Regarding the result obtained for the homogeneous distribution of nutritive cues, we noted first, an environment containing a uniform distribution of nutrients slowed down the exploration of slime mold, mainly by delaying secondary growth and increasing the period of the pulsatile exploration/refinement movements. The area not explored by the slime molds was 3 times larger (respectively 7 times larger) than in the environment deprived of nutrient (control case) for a slightly nutritive (respectively highly nutritive) environment. The exploration rate was almost linear for highly nutritive environments, while for other treatments, the area covered by the slime molds reached a plateau after a period of stretching, which indicates secondary growth and slime mold displacement. This means that slime molds that

explored nutritive environments never exhibited a Phase (iii) in their exploration pattern.

Second, on substrates with higher nutrient concentrations, the slime molds grew in a more compact fashion, i.e. slime molds presented the highest solidity index and the lowest number of pseudopodia (clusters). Additionally, the appearance of mucus, which indicates that the slime mold was withdrawing, occurred much later in nutritive environments. As glucose is only aversive when only above 300 mM (Latty & Beekman 2009), our results suggest that nutritive media depressed migration due to feeding behavior. This allows the organism to remain at a site until nutrients are exhausted (Knowles & Carlile 1978; Daniel & Baldwin 1964; Dussutour et al. 2010). In previous studies, it was shown that the surface area of substrate covered increases when slime mold responds to nutrient dilution (Dussutour et al. 2010; Takamatsu et al. 2009). Here, we confirmed these observations and noted that slime mold tended to migrate and grow faster on substrates with the lowest concentration of nutrients, thus maximizing nutrient intake and optimizing the trade-off between nutrient foraging and nutrient intake.

Similarly, for a homogeneous distribution of aversive cues we noted the aversion of slime mold to salt manifested itself through longer contemplative behavior, delayed primary growth and a higher probability to crawl on previously explored surface. In addition, the slime molds grew more compactly and with less pseudopods. This suggests that slime molds were actively avoiding contact with the aversive surface (Boisseau et al. 2016; Ueda et al. 2011; Adamatzky 2010). In the absence of cell walls, slime mold has no other protection from the environment than mucus. Indeed, in bacteria for instance, mucus is used as a protective barrier for the cells against harsh external conditions (Nwodo et al. 2012). In slime molds, the extracellular mucus excreted by the slime molds can have different roles: hydrophilic shield to prevent water loss (McCormick et al. 1970), a lubricating surface over which the slime molds can easily crawl (Simon & Henney 1970), a defensive coat to protect against invasion by foreign materials and organisms (McCormick et al. 1970; Asgari & Henney 1977), an aid to phagocytosis (Haskins

& Hinchee 1974), a surface that promotes ion-exchange (McCormick et al. 1970) and has externalized spatial memory that helps navigation in unknown environments (Rodiek & Hauser 2015; Reid et al. 2012; Reid et al. 2013). Here, we can add a new function for the mucus i.e. a buffer to move in adverse environment. In other words, we demonstrate for the first time that the mucus may be used as a safe haven to avoid prolonged and repeated contacts with hazardous substances encountered in the environment.

Finally, for non-homogeneous distribution of aversive and non-aversive cues, e.g. spot experiments, pulsatile movements were limited and slime molds responded in the same way regardless of the concentration of glucose used as attractant and regardless of the presence of a salt spot on the way to the glucose spot. Slime molds grew in a more compact fashion, i.e. slime molds presented the highest solidity index and the lowest number of pseudopodia (clusters). Additionally, the evolution of the areas covered by slime mold and mucus over time indicates that the response of slime molds to heterogeneous environments was similar to that in the control case. This result suggests that in the spot experiments, the exploration behavior of slime mold is mostly controlled by the substrate. Our observation confirms that salt reception can be affected by the presence of sugars (Terayama et al. 1977). The authors in Terayama et al. (1977) showed that the "apparent" enthalpy change accompanying salt perception decreases with increase of sugar concentration.

The proposed image analysis program allows extracting information on expansion rates, geometric changes and probability of occupancy. Ongoing developments aim to acquire high quality images of slime mold exploration tests and to expand the code's capabilities for extracting topological information on the networks formed by slime molds. Slime molds have been shown to be capable of distributed sensing, parallel information processing, and decentralized optimization (Reid & Latty 2016; Jones 2010; Adamatzky 2010). It is also viewed by some researchers as an inspiration for bio-computing devices (Adamatzky 2016; Schumann & Adamatzky 2011; Adamatzky 2007; Adamatzky & Jones 2008;

Adamatzky et al. 2011; Umedachi et al. 2010). Our image analysis methods will help such research avenues by improving data collection.

Trajectories of individuals within a flock could also be described to understand whether or not members of the flock can inform and influence the travel direction of other individuals. Such a finding would allow understanding how group decisions are made among gregarious species (Couzin 2009). The cluster identification and shape recognition program could be used to differentiate modes of gene expression or to recognize objects (Olshausen et al. 1993). Object identification is an important pillar to explain associative memory or to track species interactions in an ecosystem. The tools and approach presented here are thus applicable to any problem of network dynamics or pattern recognition (Tamayo et al. 1999).

Methods

Species.

Physarum polycephalum, also known as the true slime mold, belongs to the Amoebozoa, the sister group to fungi and animals (Stephenson & Schnittler 2017). Slime molds are found on organic substrates where they feed on microorganisms such as bacteria or fungi (Stephenson & Schnittler 2017). The vegetative morph of *P. polycephalum*, the plasmodium, is a vast multinucleate cell that can grow to cover up to a few square meters and crawl at speeds from 0.1 to few centimeters per hour (Aldrich 1982; Oettmeier et al. 2017). When hygrometry and food availability decrease, the plasmodium turns into an encysted resting stage made of desiccated spherules called sclerotium (Aldrich 1982).

Rearing conditions.

Experiments were initiated with a total of 10 sclerotia per strain (Southern Biological, Victoria, Australia). We cultivated slime molds on a 1% agar medium with rolled oat flakes, slime molds were fed every day and the medium was replaced

daily. Slime molds were 2 weeks old when the experiment started. All experiments were carried out in the dark at 25 °C temperature and 70% humidity, and ran for 35 h. Pictures were taken with a Canon 70D digital camera.

Experimental setup.

Initially we monitored the exploration movement evoked in slime molds in a homogeneous environment. Each slime mold was placed in the center of a circular arena (14.5 cm in diameter) with a layer of agar (1% in water) mixed with non-nutritive cellulose (5%). Adding cellulose to the agar mix proved to be useful to obtain a homogeneous pigmentation and to enhance the color contrast between the substrate and slime mold, therefore improving the identification process. A circular hole (2.5 cm in diameter) was punched and replaced with a circular slime mold of the same size sitting on oat. In the first and second treatments (nutritive environments) we added glucose (100 mM or 200 mM) to the medium. In the third treatment (adverse environment), we added a known repellent (NaCl 100 mM55) to the medium. Lastly, in the fourth treatment, the medium remained unchanged (neutral environment i.e. control treatment).

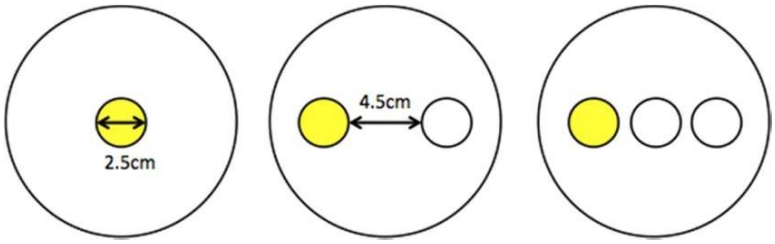


Figure 13. Experimental set-ups for homogenous environment and spot experiment.

Subsequently, to investigate how chemotaxis modified the exploration behavior, we introduced discrete spots of attractants/repellents within a neutral substrate made of plain agar. In these so-called “spot experiments”, we followed a procedure similar to that for the homogeneous environments. The arena consisted

of a 14.5 cm diameter petri dish filled with plain 1% agar mixed with non-nutritive cellulose (5%). Once the agar had set, we punched two or three holes in a line configuration (diameter of each hole 2.5 cm). A circular slime mold (2.5 cm in diameter) was placed diametrically opposite to a glucose (attractant) spot of same size, placed 4.5 cm away. In some of the treatments, a salt (NaCl 200 mM, repellent) spot was added between the slime mold and the attractant spot. A total of 4 different treatments were tested: the first and the second with a single spot of glucose at concentrations of 100 mM and 200 mM respectively, the third and fourth keeping the glucose spots with the same concentrations and adding a NaCl 200 mM spot. Previous experiments show no disruption of slime mold behavior due to punching alone (Dussutour et al. 2019).

All slime molds were fed just before the experiment so we assumed that they were in the same physiological state. The experiment consisted of a total of 8 different treatments. We replicated the experiment 20 times for each treatment and monitored each arena for 35 hours taking time-lapse photography every 5 minutes. Figure 13 shows the experimental set-up for homogeneous environments (left) and discrete distributions of attractants/repellents (right).

Image processing.

Time-lapse images were taken every 5 minutes for a total of 420 pictures for each replicate. First, the outside of the petri dish was masked by manually identifying the circular contour; then, the images were converted into the ab* color space (which is the CLAB space without the L* lighting component) since this color space yielded better segmentation results. Then, the clustering algorithm k-means (Kanungo et al. 2002; Dhanachandra et al. 2015) was used to classify every pixel into one of two categories or clusters: slime mold or not-slime mold. This last category was further refined based on pixel history, becoming either unexplored surface or mucus. Mucus is the substance left by slime after refinement, which acts as an external memory on explored areas (Reid et al. 2012; Reid et al. 2013).

The change of class from unexplored substrate to slime mold, defined as primary growth, means that slime mold reached a point it had never explored. Similarly, secondary growth is the change from mucus to slime mold, meaning that the cell is revisiting a location. Lastly, if the slime mold recedes, e.g. a pixel goes from slime mold to non-slime mold, it becomes mucus, and is defined as refinement. Note that once a pixel is identified as mucus, it can never be classified as unexplored substrate in the following time frames. Two videos are provided as Supplementary Material, S2 and S3 show one replicate as original images and trinarized images respectively.

Image analysis in space and time.

We computed indexes to characterize slime mold geometry dynamics and averaged them over the 20 replicates to obtain statistically representative measures. In order to quantify the differences on distinct substrates, we first calculated the fraction of the petri dish area covered by slime mold, mucus and unexplored substrate over time. The total area, the lighting conditions and the test duration were the same for all treatments, both in the homogeneous and spot experiments. Note that glucose only provides energy to slime mold, which is not gaining significant mass during the experiments58. In other words, slime mold is changing its area by mostly by stretching and contracting, therefore changing its area density.

We then computed the cumulative area of primary growth, refinement, and secondary growth over the full period of the experiments comparing two consecutive images at the time. The cumulative area covered by primary growth is indicative of the total area of exploration, therefore it is always smaller or equal to the total area of the dish. The cumulative area covered by secondary growth indicates whether slime mold expansion is monotonic (dominated by primary growth) which results in a smaller magnitude, or cyclic (secondary growth dominated, with pulsatile movements) which results in a larger magnitude. The cumulative area covered by refinement indicates slime mold density changes.

Within a given time interval, if the area covered by primary plus secondary growth equals that covered by refinement, then slime mold keeps the same density, whereas if it is superior, the slime mold stretches (e.g. density decreases). If secondary growth is negligible and if the area covered by primary growth equals the area covered by refinement, then slime mold displaces mass.

We calculated the extent of growth for each pair of consecutive images as the distance from each pixel where growth occurred (both primary and secondary) to the closest pixel classified as slime mold in the previous image. We calculated the migration rate as the ratio between the maximum extent of growth and the time interval between images (5 min). Then we delineated the region explored by slime mold within the interval as the contour of the slime mold with an offset distance corresponding to the migration rate (see the Supplementary Material Fig. 1 in S1 Appendix for more details).

We estimated the fraction of secondary growth relative to the total number of pixels in the region of expansion. We then calculated the fraction of "expected secondary growth", which would have occurred if secondary growth had happened randomly. If the measured secondary growth fraction is higher (respectively, lower) than the expected one, this means that slime mold has a bias towards mucus (respectively, unexplored substrate).

Additionally, we computed four shape parameters indicative of the contour of slime mold: circularity, eccentricity, solidity and number of clusters. Circularity (C) is defined as:

$$C = P^2/4\pi A$$

where P and A are the perimeter and area of the shape of slime mold at a given time. Eccentricity (E) is calculated as the ratio between the distance between the foci and the major axis length, as follows:

$$E = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}$$

In which a and b are the lengths of the major and minor axes, respectively. Solidity (S) is the ratio between the area of the slime mold contour and the area of its convex hull. Lastly, we measured the number of clusters by performing an erosion operation along the contour of slime mold, after which only the clusters of high concentration of slime mold remain, which provided the number of pseudopodia or clusters of slime mold.

For the spot experiments, we also determined the distance from the slime mold to the glucose spot at every time, as the minimum distance between the contour of slime mold and the glucose spot. The evolution of the distance to glucose over time was analyzed in a way similar to a survival analysis.

Statistics. The full description of the statistics is provided as part of the Supplementary Information; Appendix S1 includes the statistical procedure and results; while Appendix S4 is an R markdown allowing analysis reproduction. When dependent variables lasted until the occurrence of a certain event, we conducted survival analyses using the R package coxme (Therneau et al. 2015). For the remaining dependent variables, we did linear analyses using the R packages lme4 (Bates et al. 2007) and lmerTest (Kuznetsova et al. 2015). We tested as fixed factors the four treatments in the homogeneous experiment and both the attracting and the repelling spots and their interaction. The date of the experiment was considered as a random factor. Finally, we performed a nested model comparison using the R package MuMIn (Barton & Barton 2015) by ordering models according to their Akaike criterion and represented the selected model by plotting each estimator, their 95%CI and p-values.

Author summary. *Physarum polycephalum*, also called slime mold, is a giant single-celled organism that can grow to cover several square meters, forming

search fronts that are connected to a system of intersecting veins. An original experimental protocol allowed tracking the shape of slime mold placed in homogeneous substrates containing an attractant (glucose) or a repellent (salt), or in homogeneous substrates that contained an attractive spot (glucose), an eccentric slime mold and a repulsive spot (salt) in between. For the first time, the rate of exploration of unexplored areas (primary growth) and the rate of extension in previously explored areas (secondary growth) were rigorously measured, by means of a sophisticated image analysis program. This paper shows that the chemical composition of the substrate has more influence on the morphology and growth dynamics of slime mold than that of concentrated spots of chemicals. It was also found that on a repulsive substrate, slime mold exhibits a bias towards secondary growth, which suggests that the mucus produced during slime mold migration acts as a protective shell in adverse environments.

Acknowledgements

This work was supported by the U.S National Science Foundation, under grant CMMI#1552368: “CAREER: Multiphysics Damage and Healing of Rocks for Performance Enhancement of Geo-Storage Systems A Bottom-Up Research and Education Approach.” A.D. and A.B. were supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (Reference Number: ANR-17-CE02-0019-01 - SMARTCELL).

Author contributions

Author Fernando Patino-Ramirez (F.P.) carried out the image analysis, wrote the corresponding sections about methods and results, created the figures in the manuscript and was responsible for the image analysis section on S1 and the videos S2 and S3. A.B. developed the statistical analysis, including the corresponding sections in Supplementary Materials S1 and S4. Authors Aurèle Boussard (A.B.) and Audrey Dussutour (A.D.) carried out the experiments in the

laboratory and the corresponding image acquisition. Chloé Arson (C.A.) drafted the manuscript and contributed in the planning, analysis and interpretation of the experiments and the data together with A.D., F.P. and A.B. All the authors have approved the submitted version of this manuscript and have agreed both to be accountable for the author's own contributions.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-50872-z.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.P. or A.D.

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 license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license 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 license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Chapitre 2: Insertion et préservation de la mémoire de l'habituation chez *P. polycephalum*, recherche d'un mécanisme commun.

Résumé

L'apprentissage est une capacité indiscutable chez de nombreux animaux. Elle leur permet d'intégrer, de stocker et d'utiliser des informations cruciales pour résoudre les problèmes posés par des environnements complexes. Si les animaux parviennent à résoudre ces problèmes par l'apprentissage, quelles stratégies emploient les organismes considérés comme plus simples ? S'ils ne parvenaient pas à croître, survivre et se reproduire dans ces mêmes environnements complexes, ils auraient disparu sous l'effet de la sélection naturelle. D'une part, en fonction de l'échelle spatio-temporelle à laquelle se déroule leur vie, ces organismes ne sont pas en interactions avec les mêmes types d'organismes et la vitesse avec laquelle leur environnement change n'est pas la même. On explique, par exemple, le succès des bactéries dans la quasi-totalité des environnements terrestres par leurs capacités à se reproduire en formant de nombreux mutants très rapidement. D'autre part, il n'y a pas de raison rationnelle de penser que les organismes non-animaux (ou, plus spécifiquement, qui n'ont pas de système nerveux) soient dénués de capacités d'apprentissage. L'habituation est une forme d'apprentissage simple qui consiste à réagir de moins en moins au contact d'un stimulus aversif mais inoffensif. Cette capacité permet aux organismes qui la possèdent d'ignorer un stimulus sans importance pour pouvoir réagir correctement à d'autres stimuli, potentiellement plus pertinents. Des études ont montré que *P. polycephalum* pouvait s'habituer à la quinine, à la caféine et au sel (NaCl). L'habituation est, par définition, un phénomène réversible et cet organisme est capable de perdre l'habituation à ces substances après avoir cessé d'être en contact avec celle-ci. Le cycle de vie de *P. polycephalum* comprend une phase de dormance, nommée sclérote, lors de laquelle il reste inactif et peut résister à des conditions difficiles pendant plusieurs années.

Dans la nature, si *P. polycephalum* évoluait dans un environnement salé avant de rentrer en dormance, cet environnement serait probablement toujours aussi salé à son réveil. Nous avons donc cherché à déterminer si un individu habitué pouvait conserver la mémoire de cette habituation pendant cette phase de dormance. Pour cela, nous avons habitué des plasmodes au sel (NaCl) avant de provoquer une transition vers cette phase de dormance. Les résultats de cette étude montrent que les individus qui entraient en dormance en étant habitués au sel, l'étaient toujours à leur réveil. De plus, nos mesures ont montré que les individus habitués (en dormance ou non) contenaient plus de sodium (Na) dans leur milieu interne que les individus contrôles. Il y aurait donc un lien entre le contenu interne en sodium des cellules et l'habituation. Étonnamment, nous sommes même parvenus à provoquer l'habituation en forçant *P. polycephalum* à absorber du sel. Nous avons déposé une goutte d'eau salée directement sur des individus n'ayant subi aucun traitement et avons attendu 2h, le temps que cette goutte soit entièrement absorbée par la cellule. Nous avons découvert que faire cela suffisait à habituer les *P. polycephalum* au NaCl. En d'autres mots, forcer les individus à internaliser le NaCl suffisait à leur faire avoir un comportement typique de l'habituation. Nos résultats suggèrent que le stockage de la mémoire à long terme ne nécessiterait pas forcément de modification de l'expression génique, comme c'est le cas chez les animaux. En fait, le mécanisme permettant à *P. polycephalum* de conserver la mémoire de l'habituation à long terme pourrait reposer sur un mécanisme plus simple, impliquant l'internalisation de la substance à laquelle les individus deviennent habitués.

Memory inception and preservation in slime moulds: the quest for a common mechanism

A. Boussard, J. Delescluse, A. Pérez-Escudero and A. Dussutour

Research Centre on Animal Cognition (CRCA), Centre for Integrative Biology (CBI), Toulouse University, CNRS, UPS, Toulouse 31062, France

Subject Areas: behaviour, cognition, microbiology

Keywords: learning, memory, habituation, *Physarum polycephalum*, slime moulds

Abstract

Learning and memory are indisputably key features of animal success. Using information about past experiences is critical for optimal decision-making in a fluctuating environment. Those abilities are usually believed to be limited to organisms with a nervous system, precluding their existence in non-neural organisms. However, recent studies showed that the slime mould *Physarum polycephalum*, despite being unicellular, displays habituation, a simple form of learning. In this paper, we studied the possible substrate of both short and long-term habituation in slime moulds. We habituated slime moulds to sodium, a known repellent, using a 6 day training and turned them into a dormant state named sclerotia. Those slime moulds were then revived and tested for habituation. We showed that information acquired during the training was preserved through the dormant stage as slime moulds still showed habituation after a one-month dormancy period. Chemical analyses indicated a continuous uptake of sodium during the

process of habituation and showed that sodium was retained throughout the dormant stage. Lastly, we showed that memory inception via constrained absorption of sodium for 2 h elicited habituation. Our results suggest that slime moulds absorbed the repellent and used it as a 'circulating memory'.

This article is part of the theme issue 'Liquid brains, solid brains: How distributed cognitive architectures process information'.

Introduction

All biological systems face similar challenges due to the nature of their living state. To survive they must adjust their internal structure and/or their behaviour in response to a fluctuating environment. The topic of the present issue 'Solid brains, liquid brains' questions the structure supporting these abilities. Whether it is a true brain or a brain-like structure (e.g. root-brains (Baluska et al. 2009; Calvo Garzon & Keijzer 2011; Trewavas 2017), nanobrains (Lyon 2015), swarm brain (Garnier et al. 2006; Bonabeau et al. 1999), immune brain (DasGupta 1993; Farmer et al. 1986)), these systems allow organisms to cope with environmental changes more quickly than genetic evolution would. Every organism needs to acquire information about both the environmental and its internal state and use that information to adapt its behaviour. Abilities such as sensing, learning, memory, decision making, etc. are often considered cognitive abilities and believed to be restricted to neural organisms. Yet, a growing number of researchers are now questioning this restriction and defending the idea that cognitive abilities might extend to non-neural organisms (e.g. Lyon 2006; Baluska & Levin 2016; Ginsburg & Jablonka 2009; van Duijn 2017; Vallverdu et al. 2018). Godfrey-Smith (2002, p. 238) argues for a continuity between animal cognition and mechanisms for behavioural control observed in non-neural organisms. He defines cognition as 'a collection of capacities which, in combination, allow organisms to achieve certain kinds of coordination between their actions and the world'. Yet, can we reach in 'liquid brains' the nature of computations and cognitive complexity that can be achieved by 'solid brains'?

A 'solid brain' is capable of storing rich memories and learning complex associations; do we find such capacities in 'liquid brains'? Learning is often considered the holy grail of cognitive abilities. Functionally, learning allows organisms to adjust their behaviours to the local environment through individual experience. Learning has often been defined in a way that automatically rules out non-neural organisms, for example learning has been defined as 'the acquisition of neuronal representations of new information' (Dukas 2009, p. 7). However, some authors agreed that in theory non-neural organisms might be equipped to manifest simple forms of learning (Ginsburg & Jablonka 2009; McGregor et al. 2012). Indeed, non-neural organisms possess sensory systems capable of detecting various cues in the environment and information processing systems able to encode past exposures and direct differential behaviour (McGregor et al. 2012). In addition, although non-neural organisms lack the complex hardware of a true brain, they live in environments that are no less complex and face the same decision-making challenges: they must acquire resources, adapt to changing conditions and choose suitable microclimates to inhabit. Thus, in order to truly understand the most fundamental mechanisms necessary and sufficient for learning, it is essential to study early organisms such as unicellulars that implement learning in a non-neural substrate.

There are several reliable reports documenting learning and memory in single celled organisms such as ciliates (Osborn et al. 1973; Hamilton et al. 1974; Hennessey et al. 1979: Wood 1988; Kunita et al. 2016) and more recently slime moulds (Boisseau et al. 2016; Vogel & Dussutour 2016). The acellular slime mould *Physarum polycephalum* is an ideal biological model to investigate the mechanisms supporting learning in non-neural organisms. First, P. polycephalum is a macroscopic unicellular organism easy to manipulate and to observe, while retaining similar characteristics to other neuron-less, microscopic creatures. Second, genetically identical individuals can be obtained by cutting a single cell into multiple viable cells. Third, and most importantly, it demonstrates key aspects of complex decision-making. Slime moulds can find their way through a maze

(Nakagaki et al. 2000), construct efficient transport networks (Tero et al. 2010), interact and cooperate with congeners (Vogel et al. 2015), anticipate periodic events (Saigusa et al. 2008), navigate complex environment (Reid et al. 2012) and optimize nutrient-intake (Dussutour et al. 2010). However, despite their intriguing cognitive abilities little is known about slime moulds' learning abilities. Yet, two recent studies showed that slime moulds are capable of habituation, a simple form of learning (Boisseau et al. 2016; Vogel & Dussutour 2016).

Habituation is defined as a progressive decrease in the magnitude of a behavioural response to an iterative stimulus (Thompson 2009; Rankin et al. 2009). Habituation differs from sensory adaptation, sensory or motor fatigue in that the response recovers to its original state when the stimulus is withheld. Habituation might for example enable an organism to ignore unpleasant stimuli in its environment while still allowing the organism to respond to novel and potentially harmful stimuli that would fall in the same sensory modality (Rankin et al. 2009). Using locomotion as the behavioural output and diverse chemical repellents as stimuli (quinine, caffeine and salt), recent studies (Boisseau et al. 2016; Vogel & Dussutour 2016) demonstrated that *P. polycephalum* learned to ignore a repellent when it was encountered repeatedly (habituation), but could respond again when the repellent was withheld for a certain time (recovery). By using diverse chemicals, it was shown that habituated slime moulds were still able to produce an aversive response toward a new stimulus (stimulus specificity), ruling out sensory and motor fatigue (Boisseau et al. 2016). It was also revealed that slime moulds habituated to a repellent could transfer this adaptive response by cell fusion to individuals that had never encountered the repellent (Vogel & Dussutour 2016). This transfer of an adaptive response required cytoplasm mixing between both slime moulds, suggesting that the substrate of habituation circulated within the cytoplasm.

In this paper, our aim was twofold, first identify a possible mechanism underlying habituation in slime moulds and second demonstrate that this mechanism allows information to be preserved for a very long time.

Material and methods

Species studied and rearing conditions

Physarum polycephalum, also called the acellular slime mould, belongs to the Myxomycetes. Its vegetative morph, the plasmodium, a vast multinucleate cell, can grow to cover up to a few square meters and crawl at speeds from 0.1 to a few centimeters per hour (Aldrich 1982; Oettmeier et al. 2017) (figure 1a). In natura, slime moulds are found on organic substrates like tree bark or forest soil where they feed on microorganisms such as bacteria or fungi (Rojas et al. 2017). In the presence of chemical substances in the environment, *P. polycephalum* shows directional movements toward or away from the stimulus (i.e. chemotaxis) (Aldrich 1982). When humidity and food availability decrease, the plasmodium turns into an encysted resting stage made of desiccated spherules ranging from 24 to 40 mm: the sclerotium (Aldrich 1982). During the sclerotization process (figure 1b), slime moulds lose 50% of their total protein content together with 40% of their DNA and 65% of their RNA (Aldrich 1982). Plasmodial cultures can be easily reinitiated from sclerotia after up to 3 years but viability decreases dramatically after 1 year (Gehenio 1944).

We used a strain of *P. polycephalum* provided by Southern

Biological, Victoria, Australia. Large plasmodia were cultured in large Petri dishes (Ø 145 mm) on a 1% agar gel containing 10% of blended oat flakes (Quaker Oats Company). Rearing and experiments took place in the dark at 268C and 70% humidity in temperature-controlled chambers. Experiments were recorded using digital cameras (EOS 70D, Canon).

Mass habituation

We designed a new and more efficient protocol to habituate slime moulds inspired from (Boisseau et al. 2016; Vogel & Dussutour 2016) in which slime moulds encounter a repellent while feeding. Twenty plasmodia (Ø ¼ 145 mm) were cut in half and each part was assigned to one of two training treatments: control (C) or habituation (H). During the training, habituated plasmodia (N ¼ 20) were fed on salt oat gel (10% blended oats in a 1% agar solution to which NaCl was added at

50 mM concentration) in large Petri dishes (Ø ¼ 145 mm) for 6 days (training period) while control plasmodia (N ¼ 20) were fed on a plain oat gel (10% blended oats in a 1% agar solution). Once the training period ended, plasmodia were tested for short-term habituation.

i) Test for short-term habituation

We tested the habituated plasmodia for short-term habituation using a bridge crossing experiment as in (Boisseau et al. 2016) (figure 1c). On day 1, before starting the habituation training, we verified that control and habituated plasmodia showed a clear aversive behaviour toward the NaCl. We cut 10 circular samples (Ø ¼ 18 mm) from 20 control plasmodia and 20 habituated plasmodia. Five of those 10 samples were offered a bridge (1% agar gel, H ¼ 2 mm, L ¼ 13 mm, W ¼ 15 mm) containing NaCl (100 mM) (Bridge S) leading to a patch of oat gel (H ¼ 2 mm, Ø ¼ 18 mm) while the remaining five had to cross a bridge without NaCl (Bridge A). Thus we had four conditions CA, CS, HA and HS (N ¼ 100 for each condition). On day 6, once the habituation training was completed, we repeated this procedure to test the plasmodia for habituation. We recorded the time to reach the food patch for each plasmodial sample. High values of time to reach the food indicate aversion (Vogel & Dussutour 2016).

ii) Test for repellent uptake

Past studies have shown that slime moulds can pick up and retain sodium within the cytoplasm (Miller et al. 1968; Denbo & Miller 1976). Thus, we tested if plasmodia accumulated a certain amount of repellent (NaCl) throughout the habituation process. Once we had conducted the short-term habituation test, the remaining parts of the plasmodia were used for sodium analyses. The plasmodia were dried in an oven at 708C for 48 h before being ground into a powder and weighed to the nearest 0.0001 g (dry weight). We measured the sodium content of

each sample with a ROSSTM sodium ion selective electrode (ISE) (N ¼ 20 for each treatment).

iii) Test for repellent extrusion

As demonstrated in (Vogel & Dussutour 2016), the aversive response toward salt recovers to its original state if the plasmodium stops encountering the repellent for 2 – 3 days (recovery phase). This suggests that the repellent absorbed throughout the habituation phase might be extruded during the recovery phase. To test this hypothesis, we trained 24 plasmodia using the mass habituation protocol described above while 24 plasmodia were used as controls. After 6 days, once the training period ended, all plasmodia were transferred on standard oat gel (without NaCl) for 3 days. We measured the sodium content of each plasmodium at three different time points: day 6 (habituation), day 8 and day 9 (recovery). Here, each plasmodium was weighed immediately to perform sodium assay based on wet weight.

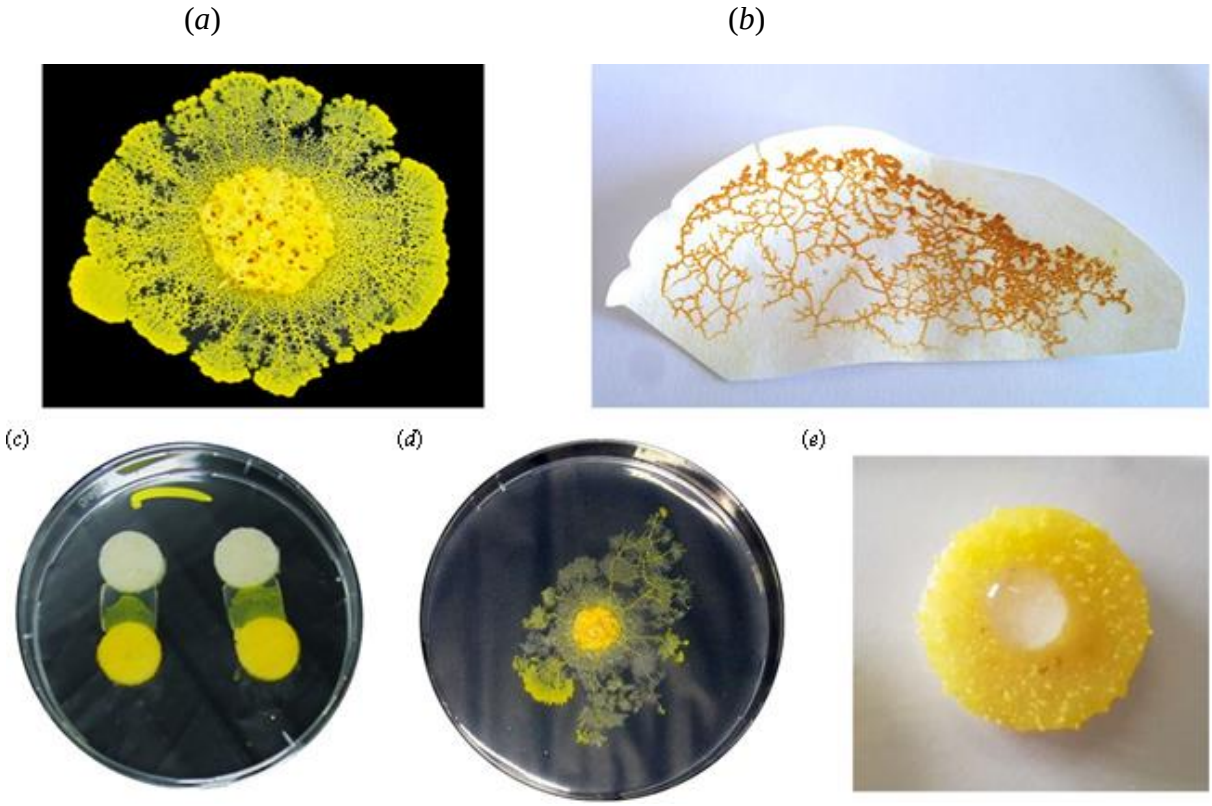


Figure 1. *Physarum polycephalum* and experimental set-ups. *P. polycephalum* photographs showing (a) the plasmodial stage with extending pseudopods and tubule network and (b) the dormant stage (sclerotial). (c) Bridge crossing test: habituated and control plasmodia were required to cross an agar gel bridge with or without salt to reach a food source (oat gel). (d) Exploration test: habituated and control sclerotia were required to explore an arena with or without salt. (e) Inception experiment: plasmodia were constrained to absorb salt (habituated) or distilled water (control). (Online version in colour.)

Long-term habituation

Slime moulds have the potential to temporarily interrupt their life cycle by entering a state of dormancy (sclerotium). Taking advantage of this life cycle particularity we tested if slime moulds could recall a habituation acquired before entering the dormant stage. We first trained eight large plasmodia to habituate to salt following the mass habituation protocol described above and reared eight other plasmodia as controls. Then, we initiated the transition from plasmodia to sclerotia. To do so, we cut 12 circular samples from each plasmodium (Ø ¼ 23 mm) and

placed each sample on a moist filter paper (Ø ¼ 145 mm) for one week to dry. Control plasmodia were dried on filter papers moistened with water (N ¼ 96 sclerotia) while habituated plasmodia were dried on filter papers moistened with a solution of NaCl 75 mM (N ¼ 96 sclerotia). The sclerotia were then stored for a month before being tested for 'long-term habituation'.

i) Test for long-term habituation: bridge crossing test

The bridge crossing test was similar to the one described above except for dimensions (bridge: L ¼ 10 mm, W ¼ 5 mm; patch of oat gel: Ø ¼ 8 mm). On the day of testing, control sclerotia (N ¼ 13) and habituated sclerotia (N ¼ 12) chosen randomly were soaked in water and cut into several square samples (mean + 95% confidence interval (CI95), 16.14 + 0.75 mg, N ¼ 400). Each sample was assigned to one of four conditions (CA, CS, HA and HS, N ¼ 100 for each condition). Only four samples out of 400 failed to turn into viable plasmodia (N ¼ 2 CA and N ¼ 2 CS). Here, we recorded both the time to contact the bridge and the time to reach the food for each plasmodium. Plasmodia that never reached the food within the duration of the experiment were assigned the maximum value of 24h.

ii) Test for long-term habituation: exploration test

This new test inspired from (Vogel et al. 2015) aims at automatically assessing habituation in the absence of an attractant i.e. the food patch (figure 1d). On the day of testing, control sclerotia (N ¼ 11) and habituated sclerotia (N ¼ 13), chosen randomly, were soaked in water and cut into several square samples (mean + CI95, 13.98 + 0.42 mg, N ¼ 460). Each sclerotium sample was introduced into the center of a circular arena (Ø 55 mm) containing a layer of agar gel (1% agar) to which we added NaCl (100 mM, Arena S) or did not (Arena A). Thus we had again four conditions (CA, CS, HA and HS, N ¼ 115 for each condition). Out of the 460 samples tested, only five failed to turn into plasmodia (1 HS and 4 CS). To measure the exploration rate of each plasmodium, we used custom software adapted from the tracking method used in (Vogel et al. 2015). Our analysis consisted in

monitoring the evolution of the intensity of each pixel within the arena as plasmodial movements translated into variations in pixel intensity. This method allowed us to assess precisely the surface covered by the plasmodium over time. We defined two variables that describe slime mould behaviour while exploring the arena. First the time needed to explore a surface of 10 mm2 in the arena, which corresponds to the appearance of the first pseudopod (Boisseau et al. 2016). Second, since slime moulds always display exponential growth during the first hours of their exploration (Vogel et al. 2015), we estimated the exponential rate of exploration starting from the first pseudopod appearance. High values of time to form the first pseudopod as well as low values of expansion rate indicate that slime moulds were avoiding contact with the arena surface.

iii) Test for uptake of repellent

We tested if plasmodia accumulated a certain amount of repellent throughout the sclerotization process. Soaked (N ¼ 21 habituated and N ¼ 21 controls) and dry sclerotia (N ¼ 20 habituated and N ¼ 20 controls) that had not been used for habituation tests were used for sodium assays.

iv) Test for recovery

During sclerotization, plasmodia were allowed to dry while the repellent was still in the environment i.e. we used filter papers moistened with salt water. Here, we tested if plasmodia could recover from the habituation if we removed the repellent during the transition from plasmodia to sclerotia. We trained six large plasmodia to habituate to salt (HW) using the mass habituation protocol while six plasmodia were used as controls (C). Unlike before, circular samples (Ø ¼ 23 mm) of habituated plasmodia (N ¼ 72) were placed on filter papers moistened only with water as the controls (N ¼ 72). Once the sclerotization was over, sclerotia were stored for a month before being tested for recovery using the exploration test. On the day of testing, control sclerotia (N ¼ 11) and habituated sclerotia (N ¼ 15) were

soaked in water and cut into several square samples (mean + CI95, 13.76 + 0.37 mg, N ¼ 400). Each sample was assigned to one of four conditions (CA, CS, HA and HS, N ¼ 100 for each condition). Only two samples out of 400 failed to turn into viable plasmodia (N ¼ 2 HS).

v) Test for repellent extrusion

Before entering the sclerotium stage, the plasmodium moved on the paper and left behind a thick mat of non-living, translucent, extracellular slime (Reid et al. 2012) easily discernable on the paper. Hence, once each plasmodium entered the sclerotium stage, we estimated the sodium content of the explored filter papers (HW N ¼ 39, C N ¼ 53). Regarding the sclerotia, we assessed the sodium content in dry samples (unmodified sclerotia) (HW N ¼ 19, C N ¼ 29) and in wet samples (soaked sclerotia) (HW N ¼ 36, C N ¼ 31).

Constrained absorption of repellent

In this last experiment, we investigated if habituation could be induced by directly increasing sodium concentration within the plasmodia using topic injections of NaCl. We cut eight large plasmodia reared on oat gel into 20 circular samples (Ø 15 mm). On each sample, we placed either a 50 ml droplet of distilled water (control treatment) or a 50 ml droplet of a 100 mM NaCl solution (habituation treatment) (figure 1e). After two hours, the droplets were totally absorbed by the plasmodia and we tested them for habituation with the exploration test described above (CA, CS, HA and HS, N ¼ 40 for each condition). All plasmodia survived the constrained absorption of salt and distilled water.

Statistical analyses

To present our results in the clearest and simplest way, we synthesized each recorded variable with an aversion index as in (Vogel & Dussutour 2016):

$$\mathrm{HI} = \left| \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \frac{\mathrm{HS}_i - \overline{\mathrm{HA}}}{\mathrm{s.d.}(\overline{\mathrm{HA}})} \right| \quad \text{or} \quad \mathrm{CI} = \left| \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \frac{\mathrm{CS}_i - \overline{\mathrm{CA}}}{\mathrm{s.d.}(\overline{\mathrm{CA}})} \right|.$$

Using those indexes, we normalized each dependent variable value corresponding to the treatments HS and CS by the mean and the standard deviation of their respective controls HA and CA. Values clearly above 0 indicate an aversion towards the repellent, whereas values close to zero indicate habituation to the repellent i.e. slime moulds react the same way to agar and salt.

All statistical analyses were conducted using R version 3.3.1. To compare HI and CI, we took into account the non-independence of slime moulds originating from the same sclerotium and/or plasmodium by running mixed models. We also added day, experiment number and sclerotium weight as random factors when needed. Statistical analyses were performed both on index values and on raw values (see electronic supplementary material for raw values). Both analyses gave consistent outcomes.

Results

Mass habituation

i) Slime moulds habituate through mass habituation

In the first experiment, we verified that slime moulds have the ability to habituate to a repellent using a 'mass habituation' protocol. On day 1, habituated and control plasmodia, facing the repellent for the first time, showed a clear aversive behaviour, crossing the bridge slowly. This translated into high aversion indexes (figure 2a). On day 6, habituated and control plasmodia were tested for habituation and were required to cross an agar gel bridge containing the repellent. Control plasmodia showed a strong aversive behaviour and a high aversion index (figure 2a). In contrast, habituated plasmodia, encountering the repellent for the sixth time, showed no aversive behaviour and an aversion index close to zero (glmm, treatment: Wald x^2¼ 8.80, p ¼ 0.003; treatment × day: Wald x^2¼ 253.11, p, 0.001).

ii) Slime moulds absorb the repellent during habituation

Sodium assays indicated that habituated plasmodia contained far more sodium than control plasmodia (glmm, treatment: Wald x^2¼ 5049.63, p, 0.001; figure 2b). Interestingly the amount of sodium taken up by habituated plasmodia was negatively correlated with their aversion index i.e. the higher the concentration of sodium within the plasmodia the less the aversive response ($F_{1,98}$ ¼ 33.93, p, 0.001, figure 2c).

iii) Slime moulds extrude the repellent during recovery

As expected, during the recovery phase the sodium concentration within the habituated plasmodia decreased greatly but never reached the level of the control plasmodia (glmm, treatment: Wald x^2 ¼ 716.12, p, 0.001; treatment × day: Wald x^2 ¼ 344.99, p, 0.001). This indicates that habituated plasmodia extruded most of the sodium absorbed throughout the habituation training (figure 2d).

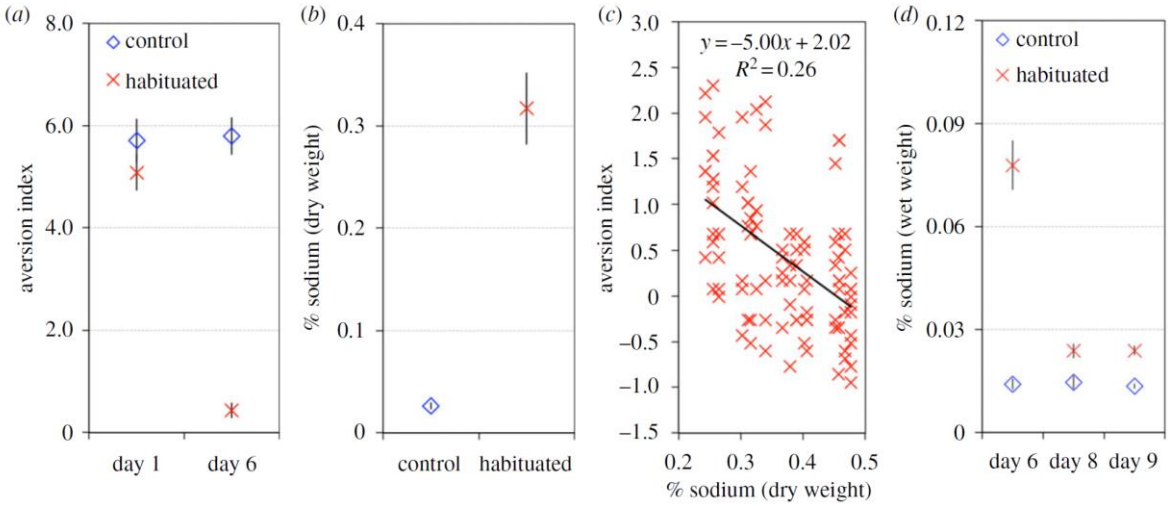


Figure 2. Mass habituation and repellent uptake. (a) Mass habituation: slime moulds learn to ignore a repellent. Habituated plasmodia were reared on a salt oat gel every day for 6 days while control plasmodia were fed on a standard oat gel. Habituated and control plasmodia were required to cross an agar gel bridge with (N=200) or without salt (N=200) to reach a food source on day 1 and on day 6 of the habituation. The aversion index is based on the time to reach the food. An aversion index close to 0 indicates habituation while values clearly above 0 indicate an aversion to the repellent. (b) Percentage of sodium measured on the last day of habituation for the control (N ¼ 20) and the habituated plasmodia (N ¼ 20). % sodium indicates: Na (mg)/plasmodia dry weight (mg)× 100. (c) Habituation performances as a function of plasmodial sodium percentages. (d) Percentages of sodium measured after habituation and during recovery. Habituated (N ¼ 25) and control plasmodia (N ¼ 25) were fed standard oat gel during recovery. % sodium indicates: Na (mg)/plasmodia wet weight (mg) × 100. Error bars indicate CI95.

Long-term habituation

i) Slime moulds retain the habituation through their dormant stage

Almost all plasmodia offered a plain agar gel bridge crossed the bridge and reached the food patch within 24 h (95/98 and 98/100 for CA and HA respectively). In contrast, only half of the control plasmodia (54/98 for CS) were able to cross the salt bridge whereas habituated plasmodia did not experience any difficulty (94/100 crossed the salt bridge for HS). This indicates already that habituated plasmodia were less troubled by the repellent than control plasmodia. Moreover, as shown in figure 3a, habituated plasmodia, encountering the repellent again after the dormant phase, showed a much lower aversion index than control plasmodia facing the

repellent for the first time (glmm, time to contact the bridge: Wald x^2 ¼ 7.76, p ¼ 0.005; time to contact the food: Wald x^2 ¼ 33.39, p, 0.001). We confirmed these results using the exploration test. Habituated plasmodia emerging from a dormant stage in a salt arena were quicker to explore and expanded faster than control plasmodia (figure 3b; glmm, first pseudopod: Wald x^2 ¼ 14.71, p ¼ 0.005; expansion rate: Wald x^2 ¼ 42.19, p, 0.001). These results indicate that habituation persisted throughout the dormant stage.

ii) Slime moulds kept the repellent during the dormant stage

Habituated sclerotia contained more sodium than control sclerotia (glmm, treatment: Wald x^2 ¼ 8.25, p ¼ 0.004 and Wald x^2 ¼ 41.92, p, 0.001 for wet and dry sclerotia respectively; figure 3c), indicating that habituated plasmodia kept a certain amount of sodium throughout the sclerotization process.

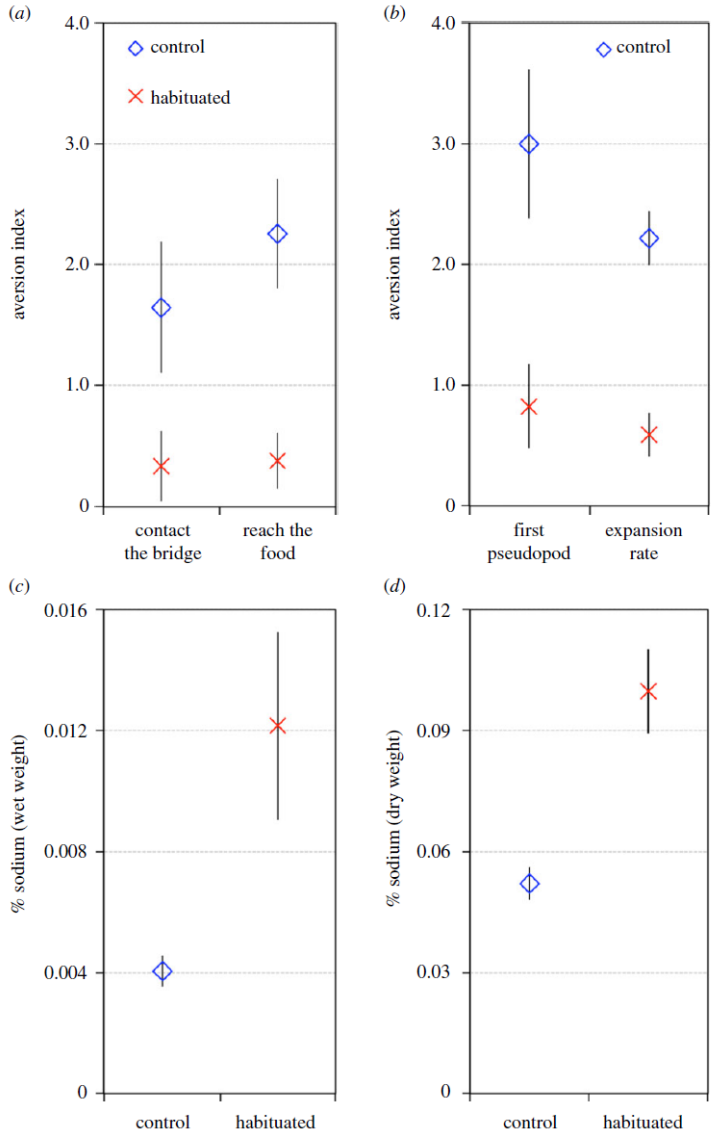


Figure 3. Long-term habituation and repellent uptake. Plasmodia were trained following a mass habituation protocol and turned into sclerotia. (a) Bridge crossing test for long-term habituation. Plasmodia reinitiated from habituated and control sclerotia were required to cross an agar gel bridge with (N 200) or without salt (N 200) to reach a food source. The aversion indexes are based on the time to contact the bridge and the time to reach the food. Aversion indexes close to 0 indicate habituation while values clearly above 0 indicate an aversion to the repellent. (b) Exploration test for long-term habituation. Plasmodia reinitiated from habituated and control sclerotia were required to explore an arena with (N ¼ 230) or without salt (N ¼ 230). The aversion indexes are based on the time to form the first pseudopod and the expansion rate. (c) Percentages of sodium measured in habituated (N ¼ 21) and control soaked sclerotia (N ¼ 21). % sodium indicates: Na (mg)/sclerotia wet weight (mg) × 100. (d) Percentages of sodium measured in habituated (N ¼ 20) and control dry sclerotia (N ¼ 20). % sodium indicates: Na (mg)/sclerotia dry weight (mg) × 100.

iii) Slime moulds do not recover during the sclerotization process

Habituated plasmodia that entered the dormant stage in an environment without repellent (HW) still showed habituated behaviour when they were revived and introduced into a salt arena (figure 4a; glmm, first pseudopod: Wald x^2 ¼ 5.50, p ¼ 0.019; expansion rate: Wald x^2 ¼ 23.96, p, 0.001). During the sclerotization process, habituated plasmodia (HW) extruded part of the repellent absorbed during the habituation, as the filter papers explored by habituated plasmodia contained more sodium than the ones explored by controls (glmm, treatment: Wald x^2¼ 130.91, p, 0.001; figure 4b). However, habituated sclerotia (HW) formed in an environment deprived of salt still contained more sodium than control sclerotia (glmm, treatment: Wald x^2 ¼ 11.01, p, 0.001 and Wald x^2 ¼ 21.54, p, 0.001 for wet and dry samples respectively; figure 4c,d), indicating that they retained part of the sodium accumulated throughout habituation.

The sodium content was slightly lower in sclerotia formed in an environment deprived of salt (HW) than in sclerotia generated in a salt environment (H) (glmm, treatment: Wald x^2 ¼ 1.92, p ¼ 0.164 and Wald x^2 ¼ 6.47, p ¼ 0.011 for wet and dry weight respectively; figure 3c, d and figure 4c,d). These results indicate that habituated slime moulds did not recover their initial state during the transition from plasmodia to sclerotia, even when this process occurred in a non-aversive environment.

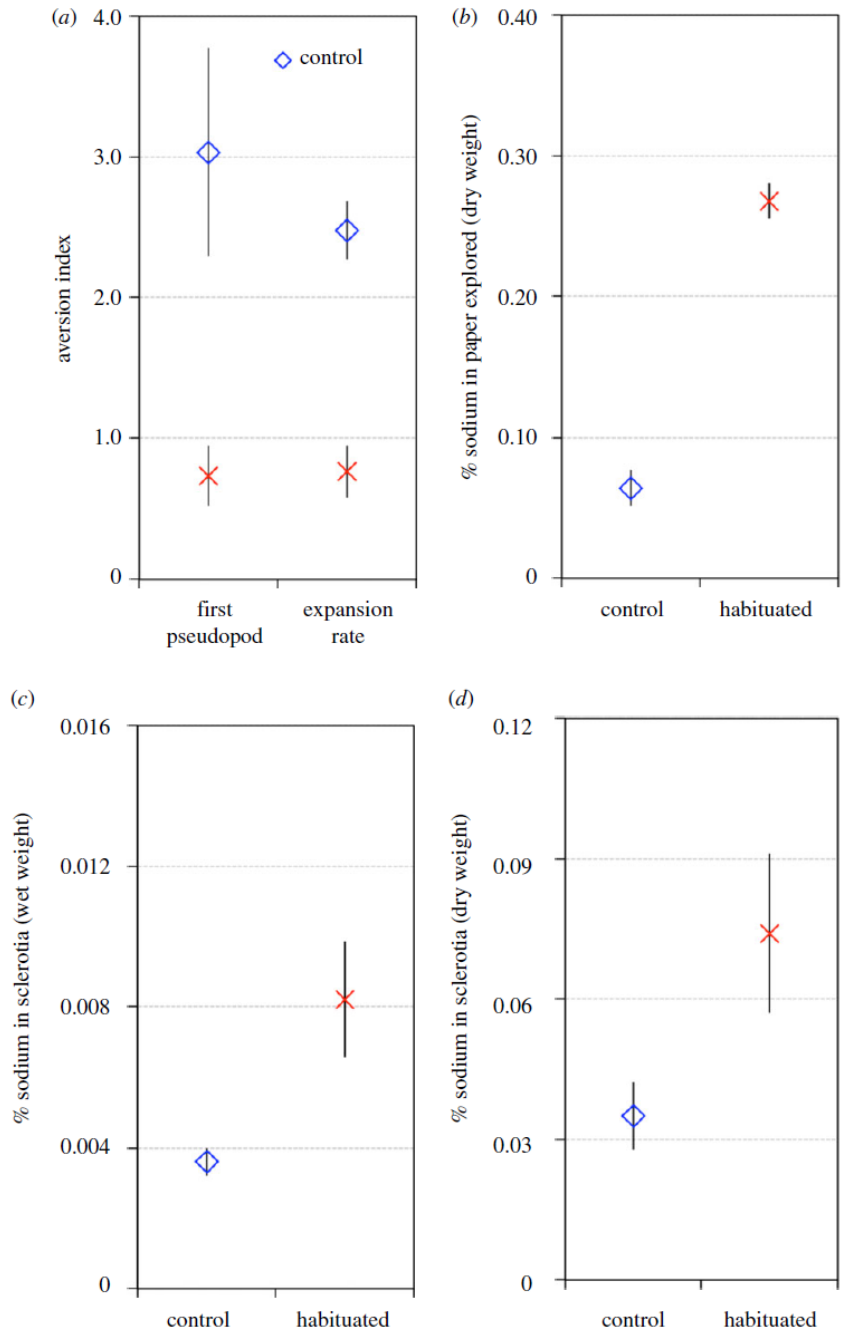


Figure 4. Recovery and repellent extrusion. Plasmodia were trained following a mass habituation protocol and turned into sclerotia in an environment without salt. (a) Exploration test for recovery. Plasmodia reinitiated from habituated and control sclerotia were required to explore an arena with (N ¼ 200) or without salt (N ¼ 200). The aversion indexes are based on the time to form the first pseudopod and the expansion rate. Aversion indexes close to 0 indicate habituation while values clearly above 0 indicate an aversion to the repellent. (b) Percentage of sodium measured in paper explored by habituated (N ¼ 39) and control plasmodia (N ¼ 53) while they were transiting from plasmodia to sclerotia. % sodium

indicates: Na (mg)/paper dry weight (mg) × 100. (c) Percentages of sodium measured in habituated (N ¼ 19) and control soaked sclerotia (N ¼ 20). % sodium indicates: Na (mg)/sclerotia dry weight (mg) × 100. (d) Percentages of sodium measured in habituated (N ¼ 36) and control dried sclerotia (N ¼ 31). % sodium indicates: Na (mg)/sclerotia (mg wet weight) × 100.

Constrained absorption of repellent

A topic application of salt was able to mimic training to some extent. All plasmodia placed in a salt arena were reluctant to form the first pseudopod (figure 5; glmm, first pseudopod: Wald x^2 ¼ 1.46, p ¼ 0.226). However, once the exploration started, plasmodia that were constrained to absorb salt water before the test expanded quicker than plasmodia that had absorbed only water (figure 4; glmm, expansion rate Wald x^2 ¼ 12.79, p, 0.001)

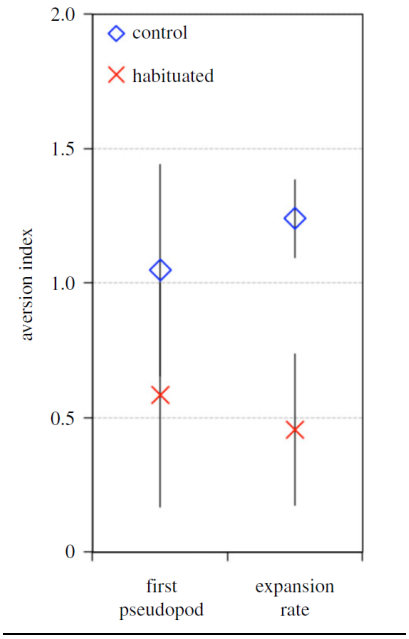


Figure 5. Constrained absorption of repellent. Exploration test for habituation. Plasmodia were constrained to absorb salt (habituated) or distilled water (control) and required to explore an arena with (N 80) or without salt (N 80). The aversion indexes are based on the time to form the first pseudopod and the expansion rate. Aversion indexes close to 0 indicate habituation while values clearly above 0 indicate an aversion to the repellent.

Discussion

Here, we found that habituation to a repellent persisted through the dormant stage in slime moulds. To our knowledge, this is the first study to show long-term habituation in a non-neural organism. We also found that repellent uptake could be one of the mechanisms underlying shortand long-term habituation in slime moulds. Four main results support this hypothesis. First, training slime moulds to habituate to a repellent led to an increase in intracellular repellent concentration. Second, the repellent absorbed during habituation was extruded during recovery. Third, a certain amount of repellent absorbed during habituation was stored throughout the dormant stage. Lastly, we succeeded in inducing habituation in naive slime moulds by constraining them to absorb a repellent.

Short-term habituation and repellent uptake

Using a different protocol, named 'mass habituation', we corroborated previous studies and showed short-term habituation in slime moulds (Boisseau et al. 2016; Vogel & Dussutour 2016). Slime moulds reared with a salt diet for 6 days stopped showing any aversive behaviour toward the salt. In previous training protocols, slime moulds were in contact with the repellent intermittently while in this new protocol slime moulds were continuously in contact with the repellent. This last feature renders the training more ecologically relevant as slime moulds are more likely to experience an aversive substance uniformly scattered while feeding. This protocol enabled high throughput training and we succeeded in achieving similar performances to a previous protocol (Vogel & Dussutour 2016). In addition, we did not observe any detrimental effect of salt on slime mould survival. The other advantage of this protocol is that we were able to train slime moulds while running chemical assays since a single cell can be cut into multiple viable cells. This allowed us to demonstrate that slime moulds absorbed the salt throughout the training and extruded it during recovery. The level of sodium measured in control slime moulds was relatively low and in agreement with previous measurements (0.008%—1.4

mM kg^{21} wet weight, 0.05%—9.3 mM kg^{21} dry weight (Kuroda & Kuroda 1982), as water content of plasmodia is 85% (Tran et al. 2015)). In contrast, the level of sodium measured in habituated slime moulds was 10 times the level of the controls, confirming that slime moulds can pick up sodium from the environment (Miller et al. 1968). Thus, slime moulds tolerated large variation in intracellular sodium concentration without being impaired. To our surprise, intracellular sodium concentration was positively correlated with slime mould performance, supporting the role of sodium uptake in habituation.

Long-term habituation and repellent storage

We showed that information acquired during the training could also be preserved through the dormant stage even after one month. We also reinitiated sclerotia after 1 year but did not include the data in this paper as most of the control slime moulds died (224 out of 267) while half of the habituated ones survived (149 out of 288). This suggests a link between sclerotium age and resistance to osmotic stress (Gehenio 1944). On exploring a salt environment, habituated slime moulds revived after one month showed some degree of aversive behaviour but they were far less repelled by salt than control slime moulds. Interestingly, the level of aversion toward the salt in controls was lower for long-term habituation than for short-term habituation (figure 2a and figure 3a). This might have been due to differences in their physiological states. For short-term habituation tests, control slime moulds were well fed, i.e. they were literally sitting on a patch of food before having to cross the salt bridge. In contrast, for long-term habituation tests, slime moulds were turn into sclerotia, a process that took one week under starved condition, and then, they were revived after a one month, placed on agar gel and faced with a salt bridge. Hence, in these two experiments, the level of motivation might have been different and might have affected the slime moulds' willingness to cross a salt bridge.

Again, we were able to correlate habituation with intracellular sodium concentration. Habituated sclerotia had higher sodium content than control ones.

Interestingly, during sclerotization habituated sclerotia extruded a large amount of sodium accumulated throughout habituation. This is not surprising as differentiation of plasmodium to dormant sclerotium is characterized by a large change in metabolism (Aldrich 1982). This result might indicate either that a low level of repellent is sufficient to trigger and preserve the memory of habituation or that the repellent is not the only information supporting habituation. Internalizing a chemical repellent to retain habituation might be an acceptable gambit for the future since the chemical substances encountered before sclerotization might still be there when the slime mould is reinitiated.

A simple mechanism

In a previous study (Vogel & Dussutour 2016), it was shown that slime moulds habituated to salt could transfer this adaptive response by cell fusion to naive individuals in less than 3 h. Here, we showed that habituation can be induced in slime moulds in only 2 h by constrained absorption of the repellent. Slime moulds forced to absorb salt for 2 h showed only a mild aversion toward the salt while controls presented a pronounced aversive behaviour. Taken together, all these results suggest a key role of sodium uptake in the emergence and maintenance of habituation. Sodium is known to decrease migration rate in slime moulds (Denbo & Miller 1976) via a depolarization of the membrane potential (Ueda et al 1975). Sodium entry might counteract this process by restoring membrane potential and allowing migration. Using radioactive markers, past studies have shown that slime moulds can pick up and retain sodium within the cytoplasm (Miller et al. 1968). Yet, we do not know if the entry of sodium is an active or a passive process. In plants and yeast, sodium is driven into the cell passively by the negative electrical potential difference across the membrane resulting from the difference between the concentrations of sodium inside and outside the cell (Blumwald 2000). Sodium enters through transport protein channels used to acquire potassium, as those transporters do not discriminate between the two ions. Similar transporters have

been described in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* (Müller & Hartung 1990) and might certainly exist in *P. polycephalum*. Sodium entry might allow habituation but migrating in a salt environment could impose two major stresses on slime moulds. First, water is drawn out of the cells through osmosis (osmotic stress), which might lead to desiccation. Second, in plants and yeast, sodium competes with potassium for binding sites, leading to a decrease of the $K^þ/Na^þ$ ratio. This ionic stress impairs cell functions as protein synthesis depends strongly on potassium concentration and sodium might damage DNA (Blumwald 2000). Plants and yeast have found active ways to overcome this damage: cell volume regulation, sodium extrusion, compartmentalization of sodium into vacuoles and synthesis of osmoprotectants (Blumwald 2000; Tester & Davenport 2003). Our results have shown that slime moulds were capable of releasing sodium to recover and of storing sodium throughout the dormant stage. We did not observe any cell volume changes and further analysis is needed to investigate synthesis of osmoprotectants.

Beyond habituation to NaCl

In a previous study, slime moulds were trained to habituate to different chemical substances: quinine or caffeine (Boisseau et al. 2016). Thus, we might wonder if the repellent was also absorbed and kept within the cell. Salt can be passively absorbed by transport proteins but what about quinine and caffeine? In plants, alkaloids such as quinine and caffeine are easily taken up and released but they can also be accumulated in large amounts and stored inside vacuoles (Shitan & Yazaki 2007). Alkaloid transport is done via ATP-binding cassette (ABC) transporters, which constitute a large, diverse and ubiquitous superfamily of proteins found in a large range of organisms including slime moulds (Verrier et al. 2008). Hence, it might be possible that repellent uptake plays a key role in alkaloid habituation as well. Quinine, caffeine and NaCl are all chemical stimuli but slime moulds also respond to other types of stimuli such as light, temperature gradients,

humidity and gravity (Aldrich 1982; Rojas & Stephenson 2017). If habituation extends to all sensory modalities, it ought to rely on different mechanisms. In animals, it has been shown that behind the concept of habituation is a large range of cellular mechanisms that are differentially activated by different stimulus paradigms (Rankin et al. 2009). Similarly, habituation in slime moulds could be encoded via different physiological, transcriptional, morphological and/or biophysical processes, depending on the type of stimulus used. We aim to address this question in subsequent rounds of experimentation.

Conclusion

Habituation is critical for survival, in that it allows organisms to ignore irrelevant stimuli so that they can pay attention to more important ones (Rankin et al. 2009). Thus, it is not surprising that habituation is observed in a large range of living beings such as single celled organisms (Osborn et al. 1973; Hamilton et al. 1974; Hennessey et al. 1979; Wood 1988; Kunita et al. 2016; Boisseau et al. 2016; Vogel & Dussutour 2016), plants (Gagliano et al. 2014) and animals (Thompson 2009; Rankin et al. 2009). Although the mechanisms underpinning habituation are still unknown for most non-neural organisms, habituation might have evolved independently in those phylogenetically distant groups (Moore 2004). In non-neural organisms, various candidate mechanisms for habituation have been suggested: epigenetic reprogramming in unicellulars (van Duijn 2017) and in plants (Verrier et al. 2008), ion flows propagated by cell– cell junctions in plants (Verrier et al. 2008) and chemical signalling networks in both unicellulars (Dukas 2009) and plants (Verrier et al. 2008). Here in this paper, we have presented the first evidence of long-term habituation in non-neural organisms and provided the first glimpse of the underlying mechanism. We are convinced that habituation is just one example of cognitive abilities that might be shared by most living organisms. As Godfrey-Smith (2002, p. 236) would say 'There are lots of ways to process information and control behaviour; a central nervous system is one way, but not the only way'.

Data accessibility. The datasets supporting this article have been uploaded as part of the electronic supplementary material.

Authors' contributions. A.D. conceived the study. A.B. and A.D. designed the study. A.B. and J.D. performed the experiments. A.B. and A.P.-E. carried out data acquisition and data analysis. A.D. and J.D. performed the chemical assays. A.D., A.B. and A.P.-E. wrote the manuscript. A.D. secured funding. All authors gave final approval for publication.

Competing interests. We declare we have no competing interests. Funding. The research was supported by a grant from the 'Agence Nationale de la Recherche', reference no. ANR-17-CE02-0019-01 SMARTCELL.

Acknowledgements. We thank Edgar Dusacre, Maxence Mougon, Morgan Pezet and Pauline Vinet for technical assistance, François-Xavier Dechaume-Moncharmont and Vincent Fourcassié for statistical advice, and Deborah Federico and Jean-Louis Deneubourg for fruitful discussions.

Chapitre 3: Les rôles potentiels des oscillations dans les capacités et l'apprentissage chez les myxomycètes.

Résumé

On retrouve des phénomènes oscillatoires à toutes les échelles du vivant et cela commence à l'échelle de la cellule. En fait, les cellules vivantes génèrent des phénomènes oscillatoires par l'intermédiaire de boucles de rétroaction négative. Cela arrive dès lors que le produit d'un gène (appelé transcrit) agit négativement sur sa propre transcription (i.e. production): sa production diminue quand il est très présent et augmente quand il est rare. Le cycle circadien est un parfait exemple de ce type de boucle. Il est omniprésent dans le vivant, il a été observé chez les mammifères, les insectes, les plantes, les champignons et les cyanobactéries (des bactéries photosynthétiques). Non seulement les phénomènes oscillatoires semblent présents dans tout le vivant mais ils sont aussi très nombreux au sein d'un même organisme. Par exemple, le potentiel électrique de populations de neurones du cerveau humain oscille à des fréquences variant de 0.01 à 600 Hz (en fonction de leur localisation). Bien que *P. polycephalum* soit unicellulaire, il possède aussi plusieurs phénomènes oscillatoires. Chez ce Myxomycète, ces phénomènes forment deux catégories : les oscillations à court et à long terme. Après avoir décrit ces deux types d'oscillations dans les deux paragraphes à venir, nous allons théoriser sur le potentiel rôle de ces oscillations dans les capacités d'apprentissage de *P. polycephalum*.

Les oscillations à court terme sont celles qui provoquent les contractions du réseau de tubes à l'intérieur de la cellule. Ces contractions ont la même rythmicité (la même période et la même phase) que les concentrations en ATP et en H+. Comme ces éléments font partie du métabolisme énergétique, leurs variations en concentration indiquent la consommation énergétique et donc l'activité de la cellule. De plus, le Ca2+, un ion omniprésent dans la signalisation cellulaire, est à l'interface entre le métabolisme et les mouvements des protéines fibreuses formant la structure interne de la cellule. Les oscillations en Ca2+ ont la même période que

les oscillations en AMPc (une autre molécule de signalisation) mais légèrement décalées (i.e. elles n'ont pas la même phase). Selon certains chercheurs les variations en ATP, H+, Ca2+ et AMPc expliquent la façon avec laquelle *P. polycephalum* contracte les tubes de son réseau interne pour faire circuler son cytoplasme. Selon d'autres chercheurs, les propriétés mécano-chimiques des tubes suffisent à expliquer ces contractions. Les modèles les plus récents décrivent encore mieux les comportements du plasmode en prenant en compte ces deux explications.

Contrairement à toutes ces oscillations dont la période est de quelques minutes, les oscillations à long terme ont une période de plusieurs heures. Elles sont liées à la division synchrone de tous les noyaux du plasmode et cela arrive toutes les 8 à 12h. Si le plasmode est séparé en deux, ce rythme reste synchronisé un certain temps et la fusion de deux plasmodes provoque la synchronisation de leurs rythmes de division (dits, mitotiques). Cette capacité de synchronisation, très étudiée dans les années 70 chez *P. polycephalum*, serait le fruit des interactions d'un réseau de molécules régulatrices. L'étude de ces molécules et de leurs interactions s'est, en fait, révélée beaucoup plus simple avec d'autres organismes comme la levure (un champignon unicellulaire). En pratique, les chercheurs ont supprimé, une à une, l'expression des molécules constitutives du cycle cellulaire de la levure pour en comprendre le fonctionnement. Le cycle cellulaire ainsi découvert met en jeu des molécules nommées cyclines et leurs kinases (des enzymes capables d'ajouter un groupement phosphate à une autre molécule, ici une cycline). La structure de ces molécules est si importante qu'elle n'a presque pas changé au cours de l'évolution. Ces molécules sont partagées par des organismes très différents comme les animaux ou *P. polycephalum*. Nous sommes finalement parvenus à comprendre le cycle cellulaire chez *P. polycephalum*, mais en commençant par le comprendre chez un autre organisme. En résumé, la rythmicité du cycle cellulaire est provoquée par des changements de concentration, rythmiques eux aussi, des kinases et donc de l'état de phosphorylation des cyclines. Les phénomènes oscillatoires de *P. polycephalum*, à court (liés au métabolisme ou à l'activité contractile) ou à long terme (liés à la

mitose), partagent le même environnement (cytoplasme) et sont donc interdépendants.

Dans ce qui suit, nous allons décrire comment l'étude des systèmes comprenant des oscillateurs permet de concevoir la manière avec laquelle un organisme comme *P. polycephalum* pourrait apprendre. Le premier phénomène à partir duquel on peut construire ce raisonnement est la synchronisation des oscillateurs. Prenons une population d'oscillateurs (émis par un groupe de noyaux) répartis dans l'espace (contenus dans un plasmode). Selon le modèle de Kuramoto, en fonction de la force de couplage de ces oscillateurs, ils peuvent tous se synchroniser (comme c'est le cas du cycle mitotique de *P. polycephalum*) ou produire des groupes oscillants à la même fréquence (comme on l'observe dans le cerveau). Dans certaines conditions, ce modèle permet aussi de reproduire des phénomènes oscillatoires comme les spirales, les vagues et d'autres, plus difficiles à décrire, que l'on qualifie de chimériques. En ce qui concerne les phénomènes oscillatoires contractiles de *P. polycephalum*, on observe des patrons de synchronisation oscillatoire très variés (e.g. des spirales rotatives) qui peuvent être expliqués par la diffusion ou l'advection des oscillateurs (à travers le mouvement du cytoplasme).

La seconde caractéristique potentielle d'un système oscillatoire réside dans sa capacité à intégrer une information extérieure. C'est le cas par exemple de neurones du cerveau du rat dont le régime oscillatoire est instantanément modifié par la stimulation de ses vibrisses. Quand elles ne sont pas stimulées, les neurones reliés aux vibrisses ont un régime oscillatoire de repos. Dès lors qu'elles sont stimulées, les modifications du régime oscillatoire de leurs neurones retranscrivent cette information. Chez *P. polycephalum*, lorsqu'une partie du plasmode entre en contact avec un nouveau stimulus, cela change le régime oscillatoire de repos localement, se propage dans tout le réseau et lui permet d'ajuster son comportement global. Cela rappelle ce qu'il se passe dans le cerveau du rat, sauf que *P. polycephalum* réalise cela avec une seule cellule.

Enfin, la troisième et dernière caractéristique d'un système d'oscillateurs en interaction est son potentiel computationnel et d'apprentissage. La combinaison d'éléments promoteurs de synchronisation et d'éléments générateurs de stochasticité (d'aléatoire) permet, en théorie, à un système d'intégrer les informations perçues et les informations stockées. Pour cette raison, le système oscillatoire de *P. polycephalum* a la capacité computationnelle nécessaire à l'apprentissage. Un exemple que nous avons déjà évoqué et qui se rapproche le plus d'un apprentissage chez *P. polycephalum* est le modèle mathématique réalisé par Saigusa et al. (2008). En modélisant une population d'oscillateurs, ces chercheurs sont parvenus à reproduire les résultats obtenus lorsque les plasmodes continuaient à ralentir de manière périodique, même lorsque la stimulation avait cessé. Il y a de fortes raisons de penser que le régime oscillatoire de *P. polycephalum* est affecté lors de l'exposition répétée à un stimulus provoquant l'habituation à celui-ci, mais cela reste à démontrer.

Adaptive behaviour and learning in slime moulds: the role of oscillations

A. Boussard 1†, A. Fessel 2†, C. Oettmeier 2†, Léa Briard 1, Hans-Günther Döbereiner 2 and Audrey Dussutour 1

[1]Research Centre on Animal Cognition (CRCA), Centre for Integrative Biology (CBI), Toulouse University, CNRS, UPS, Toulouse 31062, France
[2]Institut für Biophysik, Universität Bremen, Otto-Hahn-Allee 1, 28359 Bremen, Germany

†Co-first authors/equal contribution/names listed in alphabetical order.

Subject Areas: behaviour, biophysics, cognition

Keywords: *Physarum polycephalum*, learning, cognition, oscillations, synchronization

Abstract

The slime mould *Physarum polycephalum*, an aneural organism, uses information from previous experiences to adjust its behaviour, but the mechanisms by which this is accomplished remain unknown. This article examines the possible role of oscillations in learning and memory in slime moulds. Slime moulds share surprising similarities with the network of synaptic connections in animal brains. First, their topology derives from a network of interconnected, vein-like tubes in which signalling molecules are transported. Second, network motility, which generates slime mould behaviour, is driven by distinct oscillations that organize into spatio-temporal wave patterns. Likewise, neural activity in the brain is organized in a variety of oscillations characterized by different frequencies. Interestingly, the oscillating networks of slime moulds are not precursors of nervous systems but, rather, an alternative architecture. Here, we argue that comparable

information-processing operations can be realized on different architectures sharing similar oscillatory properties. After describing learning abilities and oscillatory activities of *P. polycephalum*, we explore the relation between network oscillations and learning, and evaluate the organisms' global architecture with respect to information-processing potential. We hypothesize that, as in the brain, modulation of spontaneous oscillations may sustain learning in slime mould.

This article is part of the theme issue 'Basal cognition: conceptual tools and the view from the single cell'.

Introduction

Every living organism uses sensory and information-processing mechanisms to evaluate and interact with both its internal milieu and its surroundings. Most processes underlying environmental monitoring, signal propagation or integration of motor and sensory functions are evolutionary conserved between single-celled organisms and animals. In this special issue, we emphasize that cognitive abilities such as perception, problem-solving and learning, are not restricted to the animal kingdom but have evolved in all organisms to satisfy the existential needs for survival (Godfrey-Smith 2016; van Duijn et al. 2006; Lyon 2015; Lyon 2019; Calvo & Keijzer 2011; Baluska & Levin 2006). As Bourgine & Stewart (2004) stated, 'A system is cognitive if and only if sensory inputs serve to trigger actions in a specific way, so as to satisfy a viability constraint'. Cognitive abilities rely on recursive chemical communication of intracellular signalling networks which are highly organized in space and time and which depend on historical and environmental context (Koseka & Bastiaens 2017). The functional link between dynamic processes in cells and their cognitive abilities remains to be elucidated. One of the recurrent patterns observed in cells are self-sustained oscillations which can encode various information (Behar & Hoffmann 2010; Purvis & Lahav 2013; Levine et al. 2013; Isomura & Kageyama 2014). The aim of this review is to discuss how learning in a unicellular organism might rely on self-sustained oscillations. Our model system is the acellular slime mould *Physarum*

polycephalum which shows various oscillatory phenomena whose cognitive significance has yet to be demonstrated.

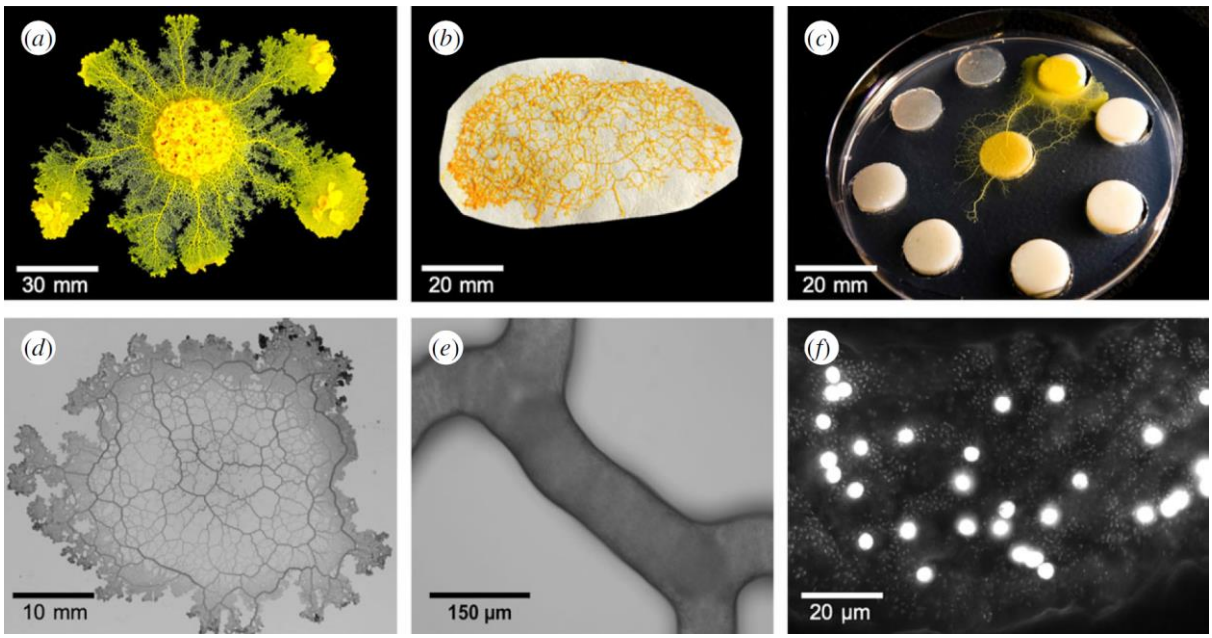


Figure 1. These pictures illustrate (a) a macroplasmodium; the vegetative phase of *P. polycephalum*, (b) a sclerotium, the dormant stage, (c) a slime mould making a decision between different food sources varying in quality, (d) a vein network, (e) a magnified vein and (f) the nuclei stained with DAPI within the plasmodium.

Learning, defined as the modification of behaviour by experience, is one of the major innovations in the evolution of life. Using past experiences is often critical for optimal decision-making in a fluctuating environment and is involved in every aspect of an organism's life, including foraging and interacting with other individuals. We usually think of learning as a trait that is limited to Neurozoans (i.e. organisms with a central nervous system). Indeed, learning is often equated with neuronal changes like synaptic plasticity, implicitly precluding its existence in aneural organisms such as plants and unicellulars (Dukas 2009). While the evolutionary benefits of learning are clear, very little is known about its origins. Even the simplest organisms must adapt to changing environments, raising the possibility that mechanisms for learning might pre-date the evolution of nervous systems, possibly existing in a breadth of as-yet unstudied organisms (Lyon 2015; Calvo & Keijzer 2011; Baluska & Levin 2006; Fernando et al. 2009; Ginsburg &

Jablonka 2009; McGregor et al. 2012; Westerhoff et al. 2014; Gagliano et al. 2017; Tang & Marshall 2018). Evidence for learning in single-celled organisms remains scant and, to date, only few unequivocal reports of such processes have been described. Learning in single-celled organisms has been investigated mainly in ciliates and acellular slime moulds, and there are several reliable reports documenting learning in *Stentor sp*. (Wood & Squire 1992), *Paramecium sp.* (Hennessey et al. 1979), *Tetrahymena sp.* (Kunita et al. 2016) and *P. polycephalum* (Boisseau et al. 2016).

One of the most fundamental questions in cognitive science is: how can information inferred from interaction with the physical world be encoded in physical/chemical changes in an organism, and how is it decoded as future recall? Although many fundamental processes in the brain have been understood, the current state of the art in neuroscience is still far from providing a complete picture. In particular, there exists no coherent explanation for how higher cognitive function arises from the interplay of elementary biological mechanisms. To truly understand the most fundamental mechanisms underlying learning and memory, it is essential to study the origins of cognition in unicellular organisms that implement learning in a non-neural substrate. Due to its comparably simple structure in relation to its behavioural complexity and due to the ease with which it can be cultivated and manipulated, *P. polycephalum* presents itself as an ideal model system for relating basal cognitive functions to biological mechanisms (Oettmeier et al. 2017; Vallverdu et al. 2018; Adamatzky 2017). In principle, all processes are accessible, in many cases even without disrupting the system and with spatio-temporal resolution constrained only by the experimental set-up. In this review, we explore how a simple physical process integrating oscillators could mechanistically explain complex abilities such as learning in *P. polycephalum*.

Cognitive abilities of *Physarum polycephalum*

Physarum polycephalum: a unique model

The slime mould *P. polycephalum* is a remarkable organism belonging to the Amoebozoa. It is often used as a model system to study problem-solving in aneural biological systems (figure 1) (Oettmeier et al. 2017; Vallverdu et al. 2018; Adamatzky 2017; Reid et al. 2015). Its vegetative state, the plasmodium, is a giant mobile cell, whose basic structure consists of a syncytium of nuclei and an intracellular cytoskeleton that forms a complex cytoplasmic network of veins (figure 1). The plasmodium can extend to up to hundreds of square centimeters and can be severed into viable and structurally similar yet smaller subunits. Upon contact, plasmodia can fuse with each other, giving rise to the (re-)formation of a giant plasmodium (Aldrich 1982). *Physarum polycephalum* can be reared and maintained in a liquid-shaking culture as micrometer-sized fragments (microplasmodia) or as macroplasmodia on a solid substrate. Lastly, a starving plasmodium can encapsulate and enter a dormant stage called sclerotium (figure 1). *Physarum polycephalum* can turn back from this resting stage to a plasmodium within 24 h after transfer to fresh food medium.

Both *P. polycephalum*'s motion and its behaviour rely on its internal architecture. Its cytoplasm consists of a visco-elastic (gel, also named ectoplasm) and a liquid (sol, also named endoplasm) phase (Aldrich 1982). This compartmentation is due to a sharp concentration change of the fibrous proteins forming the cytoskeleton (Radszuweit et al. 2014). Ecto- and endoplasm are convertible into each other. The cell body of *P. polycephalum* is a transport network consisting of interconnected tubes (figure 1). Ectoplasm, which contains actin and myosin, forms the contractile walls of the tubes (figure 1). Within these veins flows the endoplasm, which contains organelles such as nuclei and mitochondria (electronic supplementary material, movies S1 and S2). The veins contract and relax periodically, causing the endoplasm to flow back and forth, a phenomenon

termed 'shuttle streaming' (Matsumoto et al. 2008). The vein network of *P. polycephalum* bears two analogies with the vertebrates' circulatory systems. First, like the vasculature, the veins transport and distribute the endoplasm throughout the cell body. Second, the veins are pore-like capillaries, allowing respiratory gases, molecules and organelles to be exchanged with the surrounding cytoplasm (Oettmeier et al. 2018). This open network allows to maintain homeostasis in cells ranging from 10 μm^2 to 10 m^2. The spatial structuration of *P. polycephalum*'s vein network and its dynamics allows an efficient regulation of the cytoplasmic flow within the entire cell (Alim et al. 2013; Baumgarten & Hauser 2013). This vein network and the interactions between the ectoplasm and the endoplasm have been studied extensively by numerous biophysicists (Nakagaki & Guy 2008; Alim 2018).

The vein network is also responsible for cellular motility. *Physarum polycephalum* can migrate at a speed of up to 4 cm h^{-1} (Alim et al. 2013) through the interplay of intracellular flow, adhesion and rhythmic contractions of the intracellular actomyosin cytoskeleton (Matsumoto et al. 2008; Alim et al. 2013). These contractions produce a pressure gradient that pushes the endoplasm towards the cell periphery where the veins vanish and the endoplasm can flow freely. Local cytoskeletal reorganization and local alteration of the actin–myosin cortex lead to the formation of pseudopods or fan-shaped leading fronts which extend and retract in synchrony with the shuttle streaming of the endoplasm (Matsumoto et al. 2008; Lewis et al. 2015; Baumgarten & Hauser 2014). Based on internal and external cues, *P. polycephalum* can adapt and alter its shape, size and motion. The frequency and the amplitude of the cytoskeleton contractions depend on the quality of the environment (Durham & Ridgway 1976; Miyake et al. 1994; Matsumoto et al. 1986). For instance, higher frequencies are observed in response to attractive, high-quality resources (Ray et al. 2019), whereas lower frequencies are recorded when *P. polycephalum* encounters repulsive stimuli such as chemical repellents (Matsumoto et al. 1986). As a result, slime moulds migrate towards or away from a variety of external stimuli such as chemicals (Durham & Ridgway 1976), light

(Marwan 2001), temperature (Wolf et al. 1997), humidity (Rakoczy 1973), gravity (Block et al. 1994) or substrate distortion Murugan et al. 2020).

Physarum polycephalum's learning abilities

Although slime moulds lack the complex dedicated neural hardware of Neurozoans, the environment they evolved in is no less complex and they face the same challenges: they must search for and choose between resources, adapt to changing conditions, avoid dangers and find suitable microclimates to inhabit. *Physarum polycephalum* demonstrates key aspects of complex decision-making (Oettmeier et al. 2017; Vallverdu et al. 2018; Adamatzky 2017; Reid et al. 2015; Schenz et al. 2019; Gao et al. 2019) (figure 1). It can find its way in a maze (Nakagaki et al. 2000), construct efficient transport networks (Tero et al. 2010), distinguish how different masses distort the substrate (Murugan et al. 2020), avoid obstacles (Reid et al. 2012) and risky environments (Latty & Beekman 2010), optimize its nutrient intake (Dussutour et al. 2010; Reid et al. 2016), and use conspecifics' cues to choose what substrate to exploit (Vogel et al. 2015; Briard et al. 2020). All these feats rely on the abilities of *P. polycephalum* to sense and respond simultaneously to a wide range of biotic and abiotic stimuli (Durham & Ridgway 1976; Miyake et al. 1994; Matsumoto et al. 1986; Ray et al. 2019; Marwan 2001; Wolf et al. 1997; Rakoczy 1973; Block et al. 1994).

Despite their increasing recognition as a model for the study of complex behaviours in unicellular organisms, surprisingly little attention has been paid to the ability of slime moulds to learn and to modify their behaviour accordingly. Four studies have shown that *P. polycephalum* displays the capacity to learn (Boisseau et al. 2016; Saigusa et al. 2008; Vogel & Dussutour 2016; Boussard et al. 2019). In the first study, Saigusa et al. (2008) showed primitive anticipatory and recall behaviours. Individuals exposed to periodically occurring negative stimuli were found to reduce their locomotive speed in response to each stimulus. When the negative stimuli were withdrawn, the slime moulds spontaneously reduced their

locomotive speed at the point in time when the next negative stimulus would have occurred, i.e. they learned the periodicity. Once the spontaneous slowdowns stopped, they could be induced again by a single negative stimulus, which implies recall of the memorized periodicity. This study has sparked several models considering the involvement of oscillations in aneural learning, as will be further discussed in §4. In the second study, Boisseau et al. (2016) demonstrated habituation, the simplest form of learning, in *P. polycephalum*.

Habituation is a progressive decrease in the magnitude of a behavioural response to an iterative stimulus. Using locomotion as the behavioural output and diverse chemicals as repellent stimuli, the authors showed that *P. polycephalum* learned to ignore a chemical when it was encountered repeatedly for 5 days (habituation), but responded again when the chemical was withheld for a certain time (spontaneous recovery). They also demonstrated stimulus specificity and ruled out sensory and motor fatigue, often mistaken for habituation. In the third study, Vogel & Dussutour (2016) showed that non-habituated slime moulds were able to directly acquire a learned behaviour from a habituated slime mould via cell fusion. They revealed that the transfer of learned behaviour was effective only when the vein networks merged and the cytoplasm streamed back and forth between the fused individuals. In the last study, Boussard et al. (2019) showed that the memory of habituation can be stored for a month during the dormant stage and retrieved once the slime mould is revived. Chemical analyses indicated an uptake of repellent during the process of habituation and its retention throughout the dormant stage. The authors showed a strong correlation between the level of intracellular repellent and the habituation performance, and revealed that constrained absorption of the repellent induced habituation in 2 h. This study proposed that *P. polycephalum* absorbs the repellent and uses it as a 'circulating memory'.

Inferring learning from motion analysis

Motion is straightforward to capture in almost any living system. In this regard, time scale is the only difference between the wing flapping of

hummingbirds and the pulsatile movement of *P. polycephalum*. While it is easy to detect motion, given the right sampling frequency, it is much harder to infer intent from movement (Manicka & Levin 2019). This highlights the difficulty of designing experiments addressing cognitive abilities in aneural organisms. In other words, when do we interpret a moving system as cognitive, as opposed to a purely biochemical or biomechanical process? Regardless of the organism, at the microscopic scale, motion results from simple biological processes. In most cells, diverse organization of the actin cytoskeleton can produce pushing, pulling and resistance forces responsible for the whole cell shape and migration (Svitkina 2018). Studies investigating learning or decision-making in *P. polycephalum* interpret motion as behaviours. For instance, Boisseau et al. (2016) measured the migration speed of *P. polycephalum* when facing a repellent and concluded that habituation occurs when the speed ceased to be affected by the repellent. Thus, they implied that motion can reflect cellular 'memory' to previous stimuli. One can question the relevance of interpreting motion as a cognitive output as opposed to simple biochemical processes.

Contrary to motion, demonstrating a cognitive ability in any living organism requires testable criteria. Cognition can be defined as the individual capacity to perceive, process and use information. Despite numerous evidence showing that cognitive abilities such as sensing, communication, memory, learning and decision-making are found in prokaryotes, single-celled eukaryotes, plants and fungi (Westerhoff et al. 2014), some authors restrict the existence of cognition to neural organisms. For instance, Dukas (2004) defines cognition as 'the neuronal processes concerned with the acquisition, retention, and use of information'. Yet, a cognitive ability observed in several organisms could either rely on similar mechanisms and share a common evolutionary origin or result from an evolutionary convergence (van Duijn 2017). For instance, in Neurozoans, habituation results from the decreased release of chemical neurotransmitters at synaptic terminals which modulate the weights of certain neural connections. However, in *P. polycephalum* and other single-celled organisms, habituation cannot be encoded in a neural

network. Yet, a detailed analysis of *P. polycephalum*'s behaviour (Boisseau et al. 2016) suggests that this organism is capable of habituation as it fulfils all the criteria that define a habituation phenomenon (Rankin et al. 2009). Thus, should we restrict a cognitive ability to its underlying mechanisms, and by doing so, preclude its existence in many systems or should we consider together its biological function and its implementation (Lyon 2019)? As suggested by Marr (Marr 1982), to study a cognitive system we need to answer three questions: what problem is the system trying to solve? How does the system solve the problem at the behavioural level? and what are the mechanisms underlying the behavioural response? The accumulating evidence supporting the existence of cognitive abilities in slime moulds challenges us to understand what kind of physical systems underlie such abilities. One of the hypotheses we make is that learning in slime moulds might result from intracellular oscillators, as oscillations can encode information in their frequency, amplitude or duration. We especially focus on how the coordination of relatively simple oscillatory processes at the cell and molecular levels results in the emergence of learning in *P. polycephalum*.

Oscillations in *Physarum polycephalum*

Oscillation occurs when 'the values of variables characterizing the behaviour of a system repeatedly rise and fall' (Bechtel & Abrahamsen 2013). The minimal requirements for regular biological oscillations are the existence of a negative feedback loop, a time delay in the occurrence of this feedback and the nonlinear interactions involved in this feedback (Lenz & Sogaard-Andersen 2011). Longer time delays in the feedback cause longer periods of oscillation. Oscillations are ubiquitous in biology from the intracellular chemical level to the ecological level. They vary in time scale from seconds (ion transport or calcium release), to minutes (changes in protein levels during the cell cycle), to hours or days (changes in cell morphology), and up to years (generation time). The most universal oscillator is the circadian clock which is found in a variety of living organisms, including mammals, insects, plants, fungi and cyanobacteria (Young & Kay 2001).

The pervasiveness of oscillations stresses the importance of thinking dynamically about the mechanisms underlying the behaviour of a biological system. Hence, a good appreciation of the time scale of this system is crucial for understanding its behaviour.

The human brain self-generates numerous oscillations, i.e. regular fluctuations in electrical potential occurring simultaneously in many neurons, whose frequencies range from infraslow less than 0.01 Hz to ultrafast 600 Hz (Buzsaki et al. 2013). Neuroscientists categorize these oscillations according to their frequency (from the slowest to the fastest: slow-wave sleep, delta, theta, alpha, beta and gamma, and ripples oscillations). At a global scale, slow oscillations generate large and synchronous membrane potential fluctuations in large populations of neurons, whereas, at a local scale, fast oscillations produce such fluctuations in smaller populations of neurons (Buzsaki 2006). Indeed, contrary to what occurs in a computer, where communication is equally fast between close and distant units, in the brain, fast oscillations are limited to local assemblies of neurons, due to biological constraints (i.e. axonal conduction delays) (Buzsaki 2006). Hence, brains use a complex system of multiple oscillators for its operations when a computer only uses one. These different oscillators in the brain coexist and interact with each other hierarchically: the slower oscillators often modulate the faster ones, a phenomenon referred to as cross-frequency coupling (Watson & Buzsaki 2015). Using this coupling, brains can integrate distributed local processes into globally ordered states.

In the human brain, specific oscillation signatures are related to learning and memory processes. For instance, theta and gamma oscillations are mainly observed during learning processes. Slow-wave sleep and sharp-wave ripples are instrumental in consolidation of memories (Headley & Paré 2017). Neuronal oscillators are complex but rely nonetheless on principles that are comparable to those of oscillators in other biological systems. Similarly to the brain, *P. polycephalum* is organized at multiple temporal and spatial levels and it is tempting to relate this spatio-temporal architecture to its cognitive abilities. Our goal in this

review is to understand the potential link between the oscillations observed in *P. polycephalum* and its learning capacities. In the next section, we will describe the variety of oscillations reported in *P. polycephalum*. We will highlight how oscillators play an important role in diverse organismal functions on a continuum of time scales. We will first focus on the relaxation–contraction cycle which relies on short-period oscillations (90 s). Then, we will present the nuclear division and gene expression cycle which are characterized by long-period oscillations (a few hours). Short-period oscillations could support short-term memory, whereas longer-scale oscillations could be involved in long-lasting memories.

Short-period oscillations in *Physarum polycephalum*: the contraction cycle

When facing a repellent in its environment, *P. polycephalum* reduces its migration speed. However, as mentioned earlier, constrained absorption of the repellent quickly attenuates this behaviour, and the slime mould behaves almost as if the repellent was absent (habituation) (Boisseau et al. 2016). Thus, the entry of repellents into the cell might interact with the shuttle streaming responsible for the migration of the organism (Boussard et al. 2019). In *P. polycephalum*, several well-defined chemical oscillators control regular relaxation–contraction patterns which locally drive the intracellular flow and are at the root of further large-scale patterns such as migration and cell shape. In turn, the shape and motion of the cell influence these local oscillations (Takamatsu et al. 2000; Yamada et al. 1999; Kuroda et al. 2015). Relaxation–contraction patterns are generated through intrinsic nonlinear oscillatory phenomena in the plasmodium supported by complicated mechano-chemical reactions among intracellular chemicals such as ATP, free intracellular calcium ($[Ca^{2+}]$) and actin, but also among organelles. These oscillators are interconnected, often coupled and partially dependent on each other (Avsievich et al. 2017). Most of the observed chemical oscillators are associated with energy metabolism and respiration, with mitochondria being most prominently involved at

the organelle level. In the following, we will present the chemical oscillators that have been described in *P. polycephalum*.

Calcium, as the universal signalling ion in cells, is involved at almost every level of intracellular signalling and bridges the gap between locomotion and energy metabolism. Oscillations in cytosolic [Ca^{2+}] represent one of the most important examples of cellular rhythm in most organisms. In *P. polycephalum*, free intracellular [Ca^{2+}] is directly linked to actomyosin contraction (Ridgway & Durham 1976; Kessler et al. 1980; Kuroda & Kuroda 1982). [Ca^{2+}] and actomyosin contractions oscillate with a similar period but in approximate anti-phase (Yoshimoto et al. 1981; Yoshiyama et al. 2010), because the actin–myosin interaction is inhibited by [Ca^{2+}] (Nakamura & Kohama 1999). In the resting state, the cytoplasmic concentration of [Ca^{2+}] is kept as low as possible. Excess [Ca^{2+}] is either extruded via the cell membrane or sequestered in mitochondria and cytoplasmic vesicles. When the cell is stimulated, [Ca^{2+}] increases due to its release from storage or the entry of extracellular [Ca^{2+}]. This transient increase is used by the cell as a secondary messenger to regulate the interaction between actin and myosin. However, in contrast to animal cells, in *P. polycephalum* intracellular [Ca^{2+}] is an inhibitor (Kohama 2016). High [Ca^{2+}] coincides with relaxation, whereas low [Ca^{2+}] induces contraction. The [Ca^{2+}] oscillator was first modelled by Smith & Saldana (1992), using a phosphorylation–dephosphorylation cycle of myosin light chain kinase. [Ca^{2+}] waves travel at approximately 5 µm s^{-1}, suggesting that they are not propagated by shuttle streaming (Mayne 2016), which is much faster (up to several mm s^{-1}). Furthermore, in the absence of external stimulations, [Ca^{2+}] is not homogeneously distributed within the cell but forms a gradient throughout the plasmodium (Natsume et al. 1992), the mean concentration at the front is higher than that at the rear, establishing cellular polarization during migration. Both repellents and attractants change the spatio-temporal pattern of [Ca^{2+}]. A stimulation with an attractant at the rear increases the frequency of [Ca^{2+}] oscillations, raising [Ca^{2+}] at the stimulation site, whereas a repellent has the opposite effect.

Another oscillatory compound is ATP, which is distributed in patterns throughout the plasmodium (Ueda et al. 1987) and exhibits oscillations in phase with the relaxation–contraction cycle (Kessler et al. 1980; Yoshimoto et al. 1981). ATP efflux increases during the contracting phase, whereas it decreases during the relaxing phase. In a migrating plasmodium, ATP concentrations are approximately twice as high at the front (Ueda et al. 1986) than at the rear. ATP provides energy for the contraction of the actomyosin cytoskeleton, which in turn generates cytoplasmic streaming. The ATP-producing pathways, e.g. glycolysis in the cytoplasm and biological oxidation in mitochondria, directly influence the contractile activity of *P. polycephalum*. Hence, there is a strong link between energy metabolism and locomotion.

When the plasmodium is starved, ATP synthesis is impacted and the slime mould is constrained to switch to different energy-generating mechanisms (Oettmeier & Dobereiner 2019) or initiate more drastic measures (e.g. sclerotization or sporulation). Inhibition of both ATP synthesis and respiration in mitochondria stop locomotion but inhibition of ATP synthesis alone does not. Thus, it was suggested that another mitochondrial function, such as $[Ca^{2+}]$ regulation, controls the rhythmic contractions (Kessler et al. 1980; Yoshimoto & Kamiya 1984).

Oscillations of H^+ and cAMP also accompany the oscillatory contractility of *P. polycephalum* (Nakamura et al. 1982). Cytosolic H^+ oscillations are a by-product of oxidative phosphorylation and are in phase with ATP oscillations; they are related to the energy metabolism (Nakamura et al. 1982). cAMP oscillates approximately 60° ahead of the $[Ca^{2+}]$ oscillations (Mayne 2016; Ueda et al. 1986) and is also involved in cell polarization. It forms a gradient from front to back, with the back showing several times higher concentrations than the front. Knowing that ATP and H^+ trigger contraction and oscillate in phase, whereas cAMP and $[Ca^{2+}]$ are responsible for the relaxation, Ueda et al. (Ueda et al. 1986) proposed that a feedback loop consisting of ATP, H^+, cAMP and $[Ca^{2+}]$ controls the contraction cycle. They postulated that a negative feedback occurs from $[Ca^{2+}]$ to ATP–H^+ in the mitochondria where ATP is produced due to H^+ influx and Ca^{2+} entrance in

exchange of H^+. Ueda et al. (1986) suggested that these interactions between [Ca^{2+}], ATP and H^+ are involved in the time-keeping of the rhythmic oscillations.

Experimental and theoretical evidence indicates that mitochondrial energetic variables oscillate autonomously as part of a network of coupled oscillators (Aon et al. 2008). The concentration of intracellular NAD(P)H in plasmodia of *P. polycephalum* was found to oscillate with the same period as the rhythmic contractions, but a third of the period ahead (Mori et al. 1987). When irradiated with UV light, the contractions can be stopped without affecting the rhythmic variation of NAD(P)H. Thus, the NAD(P)H oscillator works independently of the rhythmic contractile system, but seems to be entrained with it. A continuous energy production in the form of ATP appears to be necessary for oscillatory contractions. Both glycolysis, an oscillatory process in itself, and mitochondrial respiration influence the regulation of the contraction oscillations.

In addition to the chemical oscillators, it should be mentioned that spatio-temporal oscillations can also originate from mechano-chemical properties of an active material (Radszuweit et al. 2013; Kumar et al. 2014; Radszuweit et al. 2010). Spatial coordination can be achieved by mechanical interactions between different regions (e.g. Matveeva et al. (2010), and local positive feedback between deformation and contraction of the contractile apparatus induces the observed characteristic contractile behaviour by hydrodynamic interaction alone via the streaming of endoplasm. However, more realistic models combine the interaction of mechanical and chemical oscillations. It was found that the temporal frequency is set by the chemical oscillator, whereas wavelength is determined by a mechano-chemical instability (Alonso et al. 2016). In addition, only a combined model such as (Radszuweit et al. 2013; Alonso et al. 2016) allows for migration of microplasmodia. Radszuweit et al. (Radszuweit et al. 2010) proposed a model for the oscillations which is based on both chemical (i.e. exchange of calcium between the cytosol and storage vessels) and mechanical factors (i.e. flow and deformation).

We can assume that the contraction cycle in *P. polycephalum* relies on a feedback system between the contractile apparatus (i.e. the actomyosin system), the

calcium regulatory system, and the energy metabolism (Satoh et al. 1982; Korohoda et al. 1983). It stands to reason that, since all of these oscillators are highly interconnected, they must be synchronized in some manner to produce coordinated behaviours as a function of environmental conditions (e.g. Dörfler et al. (2013)). These oscillators might be involved in learning and memory as any encounter with a stimulus could be encoded and stored as changes in the contraction cycle and by extension as modifications of the vein network architecture.

Long-period oscillations in *Physarum polycephalum*: the cell cycle

In *P. polycephalum*, a lower level of intracellular repellent is sufficient to trigger the memory of habituation after the dormant stage (Boussard et al. 2019). This suggests that the interaction between the repellent and the relaxation–contraction cycle, which could support short-term habituation, is not the only mechanism supporting long-term habituation. In the brain, memory consolidation—the process by which a short-term memory is transformed into long-term memory—requires gene transcription and de novo protein synthesis to strengthen synaptic connections, e.g. facilitation and maintenance of synaptic plasticity, growth of new functional synapses or physical insertion of new receptors (Hernandez & Abel 2008). Gene transcription and protein synthesis could be responsible for memory consolidation also in *P. polycephalum*. In all eukaryotic cells, gene transcription requires the chromatin to be 'open', allowing easy access of transcription factors to target genes. In a non-dividing cell, such as a neuron, chromatin can be readily open and gene transcription can occur at any time. By contrast in a dividing cell, such as *P. polycephalum*, chromatin undergoes dramatic compaction during mitosis which precludes gene transcription (Saued 1978). Hence, in *P. polycephalum*, gene transcription is temporally restricted, setting up critical temporal windows during which this process must take place. In addition, as the cell-division cycle globally disrupts and reorganizes the molecular content of

the cell, it can profoundly influence learning and memory performances. In the following, we will briefly describe the mitotic cycles of *P. polycephalum*.

The plasmodium of *P. polycephalum* is a polynucleated cell that undergoes nuclear division every 8–12 h (Aldrich 1982). In contrast to most cells, mitosis is not followed by cytokinesis and it occurs within the nuclear membrane (closed mitosis) which is common in protists and fungi. In *P. polycephalum*, the phase G1 is absent, the S-phase lasts for 2–3 h, followed by a long G2 phase and 30 min mitosis (the nuclear division itself) (Aldrich 1982). In *P. polycephalum*, gene transcription, and in particular mRNA transcription, goes from zero during mitosis to a maximum in early S-phase (Sauer 1978). Remarkably, the plasmodium exhibits synchronous mitotic division of its entire population of nuclei, and therefore, the number of nuclei doubles every cell cycle (Aldrich 1982). Pieces cut off from a plasmodium maintain this synchrony for a certain time and two asynchronous plasmodia can synchronize their mitotic rhythm after fusion (Rusch et al. 1966; Guttes & Guttes 1964). Experiments on the cell cycle, particularly those employing fusion techniques in *P. polycephalum* (Rusch et al. 1966; Guttes & Guttes 1964), gave rise to pioneering theoretical models (Tyson & Kauffman 1975; Kauffman & Wille 1975) that presented the mitotic oscillator as a dynamical system and suggested that synchronous mitotic division emerges from dynamic interactions of regulatory molecules. *Physarum polycephalum* was considered as the ideal organism to study the cell cycle in the seventies. However, due to the lack of tools to disrupt gene function in *P. polycephalum*, in the 1980s most researchers turned to other model systems in which they could test their hypotheses.

In the last decades, numerous independent genetic and biochemical studies using different organisms such as Xenopus and yeast identified a major evolutionarily conserved regulatory network for cell-division cycle (i.e. mitosis) regulation (Arata & Takagi 2019). This network includes a cyclin that is periodically synthesized and degraded at specific cell cycle phases and a kinase (cyclin-dependent kinases, CDKs) that is regulated by phosphorylation and interaction with activators and inhibitors. The oscillations in CDK activity, in

complex with regulatory cyclin subunits, drive the cell-division cycle. In parallel to experimental measurements, mathematical modelling of the cell cycle has proved helpful in unravelling how interacting proteins such as Cyclin and their partner CDK control the dynamics of cell division. These models contributed to the modern understanding of the cell as a complex dynamical system (Gérard et al. 2015; Ferrel et al. 2011; Tsai et al. 2008).

Cyclins and CDK are present in all eukaryotes, including *P. polycephalum* (Schaap et al. 2016). In *P. polycephalum*, the vigorous actomyosin-driven cytoplasmic streaming described earlier ensures that local accumulation of cyclin/Cdk complexes diffuses (Schaap et al. 2016) and triggers the activation of cyclin/Cdk complexes in neighbouring nuclei, maintaining mitotic synchrony (Guttes & Guttes 1964). Until now, yeasts have historically been a major model system to understand the control of the cell-division cycle in animals, taking advantage of their powerful genetics and rapid duplication times. However, otherwise conserved cell cycle regulators have been lost in this organism. By contrast, the complete set of *P. polycephalum* cell cycle regulatory molecules has been identified (Schaap et al. 2016). Hence, with new options for experimental manipulation and in conjunction with mathematical modelling, *P. polycephalum* could become once more an attractive model organism to study cycle regulation at the regulatory complexity of a mammalian cell.

Mitotic and genetic oscillators are relevant to understanding learning and memory in *P. polycephalum* not only due to their oscillatory nature, but also because they provide a way to encode past experiences as epigenetic changes. The concept of epigenetic memory was defined by D'Urso & Brickner (D'Urso & Brickner 2014) as 'a stable propagation of a change in gene expression induced by developmental or environmental stimuli'. Epigenetic memory impacts gene expression and their associated feedback loops over both short and long time scales. Several evidence suggests that epigenetic mechanisms can regulate the ability to

store long-term memories in Neurozoans, it might also be true for aneural organisms (Day & Sweatt 2011).

From oscillations to learning

Biological systems of very different architecture and complexity, representatively the (central) nervous system and the slime mould *P. polycephalum*, possess the ability to orchestrate complex behavioural patterns. This includes reacting to external stimuli in a well-controlled manner and adapting their responses based on past experiences which indicates capabilities for information processing and learning. Despite their independent evolutionary histories (van Duijn 2017), close inspection of the dynamics of both systems reveals that they share a basal feature: they show rich oscillatory dynamics (§3).

In biology, in artificial intelligence and in physics, a system requires a certain level of complexity to process time-variant information presented by multiple inputs while recalling and adjusting past experiences. This complexity may be driven by the complexity of the system's microscopic units themselves or/and by the nature and topology of their interactions in conjunction with the system size. Systems of interacting oscillators are known to self-organize their dynamics into diverse spatio-temporal patterns, possibly providing the required complexity. Once all differences in structure, function and complexity between nervous systems and the tubular network of *P. polycephalum* are put aside, what remains are biological systems that self-organize their structure as complex networks and their function as interacting and oscillatory units that give rise to emergent properties, resulting in well-controlled behaviours.

Physics procures universal frameworks to apprehend the complexity of such biological systems, and in particular unravelling the working principles of information processing in Neurozoans has seen significant progress in the recent past. In this section, as a perspective for future research, we raise the question whether similar microscopic interactions result in similar capacities among seemingly very different organisms. To lay the basis for developing this perspective

further, we provide in §4.a a brief overview of synchronization phenomena. In §4.b, we explore how integration of environmental information can be facilitated by oscillating systems via the modification of an attentive resting state, and candidate mechanisms that can generate and maintain such a state are discussed in §4.c. Interestingly, the very same mechanisms support adaptation and learning in artificial and non-artificial systems. This is addressed in §4.d.

Synchronization, a prerequisite

Synchronization, a phenomenon arising from the interaction of two or more oscillators, can be observed in many biological systems. The position of an oscillator in its cycle can be described in terms of its phase, which advances at a pace set by the oscillator's natural frequency. Interacting oscillators influence each other's phase progression (figure 2). A paradigm for synchronization is a population of globally coupled oscillators (i.e. each oscillator in the population is affected by the dynamics of the rest), in which the natural frequencies are initially heterogeneously distributed. As time progresses, the oscillators minimize their pairwise phase differences, resulting in a pattern known as full synchronization, where all oscillators operate at the same instantaneous frequency and phase. This is described mathematically by the canonical Kuramoto model (Rodrigues et al. 2016), which predicts a phase transition between desynchronized and synchronized states, based on the global coupling strength (figure 2d,f; electronic supplementary material, movie S3). Synchronous mitosis in *P. polycephalum* illustrates such global coupling leading to a state of full synchronization. Here, nuclear division is robustly controlled across the entire organism and occurs when the ratio of DNA to cytoplasm in the plasmodium drops below a certain value due to an increase of the cellular volume (Sudbery & Grant 1976).

Modifications of the Kuramoto model give access to a much richer spectrum of synchronization patterns as observed in many biological systems such as cardiac cells, populations of fireflies or assemblies of neurons. Strikingly, employing local

instead of global coupling or combinations thereof can lead to the emergence of complex spatio-temporal patterns. These patterns range from full synchronization or desynchronization to spiral waves, travelling waves (figure 2e), and even to curious chimera states (Abrams & Strogatz 2004), where part of the population is synchronized and part is not. Notably, the Kuramoto model can be modified to account for local coupling and is also well suited for describing populations of oscillators coupled through a network topology (Rodrigues et al. 2016), as shown in figure 2d,e and electronic supplementary movie S4 for a random planar network. Indeed, synchrony in a population of oscillators is crucially affected by the topology of their network (regular lattice, random network and smallworld network). This lies as the foundation of diverse dynamics observed in biological networks, such as the central nervous system. Synchrony in the brain supports neural communication and neural plasticity and is relevant for many cognitive processes (Fell & Axmacher 2011). Similarly, synchronization phenomena observed in the plasmodium's intrinsic cellular oscillations have been suggested to support complex behaviour in *P. polycephalum* (Tsuda & Jones 2011).

As described previously (§3.a), transport of cytoplasm in *P. polycephalum* is actively driven by rhythmic contractions associated with biochemical oscillations. The rhythmic contractions typically organize as travelling waves (Alim et al. 2013; Rodiek et al. 2015), but other patterns such as rotating spirals are observed (Takagi & Ueda 2008). Although a variety of active materials is capable of generating such patterns, they can also be indicative of locally coupled oscillator systems. Unlike neural networks or cardiac cells, the plasmodium of *P. polycephalum* is not composed of discrete, interacting units but instead forms a continuous yet inhomogeneous material (§2.a). It has been shown that *P. polycephalum* reproduces the dynamics of coupled oscillators at large spatial scales when introducing an artificial discretization by shaping the plasmodium into extended patches connected by thin veins (Yamada et al. 1999; Takamatsu et al. 2001). In this setting, due to the imposed asymmetry, the connections were largely passive. By contrast, in naturally grown plasmodia, the connecting veins contribute

actively to the oscillatory dynamics. Here, it appears necessary to move to smaller spatial scales by regarding the plasmodium as a continuum of oscillators coupled locally via diffusion, advection of chemicals through active transport, and through mechanical interaction. This approach has been pioneered by Kobayashi et al. (Kobayashi et al. 2006).

Integration of environmental information

Both in nerves and in *P. polycephalum*'s veins, chemical oscillations are responsible for conveying macro-oscillations as well as transport or motion at the organism scale. What we call macro-oscillations might be the rhythmic movement of the human legs, the wings of a bird, as well as the center of gravity of a *P. polycephalum* plasmodium (Matsumoto et al. 2008). Why are these motions rhythmic? An enticing argument arises from a neuroscience perspective, stating that rhythmicity provides a powerful tool for organisms to infer easily from their environment. Buzsáki (2006) sees leg movements as an oscillating system in which perturbations indicate an environmental change. Considering leg movement, a change of the floor topology will disturb the movement rhythmicity and therefore will become a piece of integrated information allowing motion continuation.

Hence, an environmentally driven behavioural change can be seen as integration of environmental information through change in the oscillatory pattern. A prominent example is found in rats, in which active movement of the whiskers generates the sense of touch. The perturbation of the whisker movements following a contact with an object elicits a sensory signal that carries information about the object. In rats, whisker motion over a texture produces a specific temporal profile of velocity, which is encoded in the temporal pattern of neural activity, for instance rougher surfaces evoke higher firing rates (Diamond et al. 2008). Hence, the information given by mechanoreceptors is directly encoded into a new oscillatory pattern in the brain. This kind of functioning pervades the neural sensing of external

stimuli, and changes in oscillatory patterns are likely to be a common mechanism by which Neurozoans integrate and store information.

P. polycephalum's biochemical and cytoplasmic oscillations may have a similar purpose and might offer a possible explanation for the organism's ability to process, integrate and store information. *P. polycephalum* exhibits few sustained large-scale oscillations and a continuous spectrum of short-scale oscillations of varying spatiotemporal scale when not faced with any stimuli (i.e. resting state) (Fleig et al. 2020). Adding a stimulus in the environment has been suggested to activate regular large-scale oscillation patterns within this continuous spectrum (Fleig et al. 2020).

Upon encountering an external stimulus, *P. polycephalum* responds first by adjusting its oscillation frequency and amplitude locally. This change then spreads over the entire network (Alim et al. 2017) and finally the morphology of the slime mould adapts to the environment (Takamatsu et al. 2009). Positive stimuli such as chemoattractants lead to increased frequencies, whereas negative stimuli such as chemical repellents lead to a decrease (§3.a.). Consequently, it appears reasonable to assume that the stimulated regions in- or decrease their importance for the global oscillation pattern: positively stimulated fronts act as pacemakers, whereas negatively stimulated regions concede. Indeed, it is observed in small fragments (Rodiek et al. 2015) and in macroplasmodia (personal observation), Q1 that travelling waves responsible for mass displacement are directed towards those fronts where the slime mould extends, underlining the plausibility of this concept.

Hence, an encounter with an external stimulus could be memorized as a change in the spatio-temporal dynamics of the system. Returning to the results of Boisseau et al. (2016), we might wonder: how does the global oscillation pattern change in response to repetitive stimulations to allow habituation? We do not have the answer yet, but we believe that the process of habituation in *P. polycephalum* relies on both an attentive resting state and mechanisms to adapt the oscillation patterns to changing environments.

Maintaining excitability: resting-state activity and self-organized criticality

As outlined in the previous section, the disturbance of an oscillatory resting state via an input is an efficient mechanism for integrating environmental information. This mechanism is extensively used in Neurozoans' central nervous systems. Here, we describe how the resting state affects neural functioning and introduce a number of advanced mechanisms that can maintain or modify the resting state of an oscillatory system. These mechanisms have proved to be relevant in the context of self-organization or adaptive control, in particular in neural systems. Their involvement in *P. polycephalum* is unclear yet appears to be entirely possible in the light of the analogy proposed in this article.

Resting-state activity in the brain is not immediately related to any motor task or sensory input. It represents spontaneous activity that is closely related to the functional organization of the neural network and encompasses both sub-threshold membrane potential oscillations and patterns of neural spiking activity. By assisting spike-timing-dependent plasticity (see §4.d), synchronization of the sub-threshold activity facilitates reliable and precise adaptation of synaptic strengths (Mainen et al. 1995). Therefore, the resting state is involved in organization of the neural activity, optimization of the learning process, network development in the brain and is believed to be implicated in higher functions, such as different states of consciousness and focus (Roach et al. 2018; Pizoli et al. 2011). Finally, it interacts with external inputs (see §4.b).

Recent results suggest that the observed resting-state patterns indicate a state at which the brain is stable yet responsive. This is summarized as the critical brain hypothesis (Hesse & Gross 2014), stating that the brain operates, controlled by a self-organizing process, in a subcritical regime, yet close to the critical point (Wilting & Priesemann 2018), where it is most excitable. Criticality is an umbrella term that denotes the behaviour of a system perched between order and disorder. In the brain, the subcritical regime is considered as unexcitable, whereas the critical regime displays cascades of activity unrelated to any input. Neither regime is

favorable for normal brain function and excitations lead to a controlled response only slightly below the critical point.

Evidence suggests that the phase transition associated with the critical point in question is, in fact, the transition between desynchronization and synchronization (Fontenele et al. 2019) (see also §4.a), highlighting once more that synchronization, a very basic feature of coupled oscillatory systems, is at the very heart of coordination of complex functions. The mechanism that appears to be responsible for restoring the system to the working point after it has shifted too far into the critical or subcritical regimes is sleep (Meisel et al. 2013), during which resting-state activity is pronounced. Curiously, during sleep, the resting-state activity couples to the flow of blood and cerebrospinal fluid (Fultz et al. 2019), the latter being driven by the synchronized motion of cilia (Faubel et al. 2016). This mechanism is hypothesized to facilitate, for instance, waste disposal and hints at another analogy: throughout this article, spatio-temporal synchronization of relaxation– contraction oscillations has been pointed out as the driving force behind fluid flow in the slime mould. Here, a quite similar mechanism that is rooted in the spatio-temporal synchronization of neural oscillations drives fluid flow in the brain.

It is unclear whether self-organized criticality is involved in the dynamics of *P. polycephalum*. Coggin & Pazun (1996) indicate that the spectrum of frequencies observed in *P. polycephalum* may constitute a signature of criticality. The authors further support their hypothesis by showing that the oscillating system operates at the edge of chaos (at the boundary between order and disorder), another indication for criticality that has been studied in the context of self-organization in general, and in particular in neural networks (Kanders et al. 2017). The peculiar power spectrum of *P. polycephalum* has not only been noted in the context of criticality but also with regard to the anticipatory learning behaviour of the slime mould described in §3.b. Here, it serves as an underlying assumption to the model of Saigusa et al. (2008). Despite its implications, the mechanisms generating the power spectrum are as of now unclear and thus the hypothesis has not been further verified.

How can an oscillatory system be maintained at the edge of chaos? Mechanisms facilitating this include coherence resonance and stochastic resonance (Mori & Kai 2002) that can stabilize a spectrum by noise-induced entrainment and synchronization, which lead to frequency selection (Vasquez-Rodriguez et al. 2017; Avena-Koenigsberger et al. 2018). Alternatively, modification of the Kuramoto model to include adaptively controlled coupling leads to a similar effect. The scheme facilitating this adaptive control in dynamical systems that exhibit chaos builds on the self-organized control of unstable periodic orbits through inclusion of a delayed intrinsic feedback (Pyragas 1992). Intriguingly, by application of this scheme to coupled Kuramoto oscillators, Kaluza & Mikhailov (Kaluza & Mikhailov 2014) were able to generate a system that robustly adapts desired synchronization levels through feedback control of coupling strengths. This corresponds to the adaptation of synaptic weights in a neural network (see §4.d), highlighting that the combination of these rather general mechanisms can facilitate learning in addition to maintaining criticality. Recently, these principles of adaptation have been experimentally verified in an artificial system of optically coupled chemical oscillators (Totz et al. 2018) and have been extended to complex, modular synchronization patterns (Fengler et al. 2019).

Albeit operating on a slow time scale, the adaptation of coupling strengths is a motive in the structure formation of *P. polycephalum* (Fessel et al. 2012) (§4.d). It is driven by the oscillatory shuttle streaming and used by the organism to adapt to its environment by eventually modifying the topology of its network. Notably, such topological adaptation is another form of maintaining criticality if it stabilizes the system in the vicinity of the percolation-phase transition (Bornholdt & Rohlf 2000). In networks, percolation is the transition between a low-connectivity, fragmented state and a state with high connectivity, indicated by the existence of a giant component (Fessel et al. 2012). Due to the slow time scale, percolation appears as a rather unlikely candidate in *P. polycephalum* or Neurozoans, unless the highly dynamic network of flow directions (in the slime mould) or neural

activations (in Neurozoans) is considered instead of topologies of veins or neurons (Bornholdt & Rohlf 2000).

Adaptation and computation

Although topological adaptation is a weak candidate for explaining criticality, it is clearly involved in the formation of memory in Neurozoans. Here, it manifests as the adaptation of weights (synaptic strengths) between neurons and is controlled by a mechanism referred to as spike-timing dependent plasticity: connections are promoted if neurons fire in synchrony and demote otherwise. This feedback mechanism for the adaptation of the neural network topology is reminiscent of the current reinforcement model brought forward by Tero et al. (2007), which states that veins in the tubular network of *P. polycephalum* are promoted if there is a sufficient volume flow, and demoted otherwise. This oscillatory flow is driven by relaxation–contraction oscillations that organize as a wave (Alim et al. 2013). For efficient transport, phase and frequency relationships along a single vein need to be intricately maintained (Julien & Alim 2018; Bäuerle et al. 2020), indicating that precise control of the spatio-temporal oscillation pattern is required in the slime mould as well.

Intriguingly, the analogy not only applies to synaptic plasticity and current reinforcement, but also to memristors, electrical components with a resistance that is based on the history of currents flowing through them. Memristor-based computational models have been successful at modelling learning in *P. polycephalum* in the form of anticipation of periodic events (Pershin et al. 2009) (see also §§3.b and 4.c), as well as the computation of shortest paths (Pershin & di Ventra 2013). Indeed, the 'electric circuit analogy' is more general and encompasses hydraulic counterparts for all basic electrical components. In consequence, microfluidic devices can be manufactured that mimic the function of electrical circuits (Oh et al. 2012), including the generation and control of oscillatory flows (Mosadegh et al. 2010), thus extending the analogy to alternating

currents. This has been widely applied, for instance, for the description of oscillatory blood flow in the field of hemodynamic (Zamir 2016). There it has led to the formulation of the Windkessel model, a motif of electrical networks consisting elementarily of a resistor and a capacitor in parallel. The Windkessel model accounts for the influence of vessel elasticity on pulsatile flows and has been successfully employed to model frequency selection, migration and symmetry breaking in *P. polycephalum* (Oettmeier & Döbereiner 2019). In neuroscience, the approach of modelling biological transport processes by a corresponding electrical circuit has seen great success, pioneered for instance by the Hodgkin–Huxley model (Hodgkin & Huxley 1952). Intriguingly, the Windkessel model has also been applied by Cabral et al. (2011) for modelling the organization of resting-state activity (see §4.c) in the brain in conjunction with the Kuramoto model for synchronization (Cabral et al. 2011). Notably, the model of Cabral et al. (2011) also requires the interaction between oscillators to be time delayed, an effect which has been first shown to exist in biological systems in *P. polycephalum* (Takamatsu et al. 2000).

The emergent computational principles of neural systems have broad implications beyond fundamental neuroscientific research. The development of siliconbased multi-purpose computing architecture is facing severe limitations, making bioinspired innovations indispensable. Neuromorphic computing (Wuderlich et al. 2019) mimics basic functions of neurons and synapses, paving the way for efficient hardware implementation of deep learning, potentially using memristors (Li et al. 2018). Furthermore, oscillator-based computing (Csaba & Porod 2020) seeks to harness the complexity of oscillatory systems for computation. Both can make use of reservoir computing (Tanaka et al. 2019), the concept of adapting to the inherent computational powers of naturally or randomly generated systems instead of tailoring them to the task. Intriguingly, systems have been generated in this fashion that unite oscillatory properties, signatures of criticality, memristivity and learning (Hasegawa et al. 2011; Stieg et al. 2012; Demis et al. 2015). Irrespective of the details of the implementation, understanding

the rules governing how natural oscillatory systems such as *P. polycephalum* process information and learn is paramount to the advance of computing, and any advances are expected to be of mutual benefit.

Transdisciplinary integration of universal mechanisms and concepts

In this review, we have undergone a journey from the biochemistry of molecular constituents via the physics and the biology of mesoscopic cellular organization to macroscopic behaviour of *P. polycephalum*. We have argued that coordination and interaction of oscillations across a vast range of spatio-temporal frequencies and wavelengths provide a powerful theme of self-organization in active matter, i.e. life. We have eluded to analogies in pattern formation and dynamics between the human brain and *P. polycephalum* plasmodia linking microbiology with neurobiology employing chemistry, physics and ecology along the way. Moreover, we pointed out that these analogies likely will turn out to be universal mechanisms, thus highlighting possible routes towards a unified understanding of learning. To arrive at this point, we had to immerse ourselves into each other's disciplines. Without the behavioural perspective leading to a clear characterization of foraging in *P. polycephalum*, we could not elevate biological physics from describing basic mechanisms of tubular network dynamics to the far more complex level of correlated foraging behaviour. Reciprocally, the ensuing mechanistic understanding will facilitate a deeper understanding of behavioural traits. Such a transdisciplinary approach towards *P. polycephalum* promises to be fruitful also in the future investigation of basal cognition in comparison to cognitive functions in the human brain. We aim to understand information processing on oscillating networks with variable topology. We have identified synchronization of oscillators as a basic principle applicable independently of the substrate and specific architecture. This is key, for instance, for the neurobiology of attention (Drebitz et al. 2018). Further concepts needed to describe the ensuing structure formation in

driven non-equilibrium systems are provided by stochastic thermodynamics (Goldt & Seifert 2017) and Bayesian mechanics of a limited set of behavioural states as given by Markov blankets defining the organism through its interface with the environment (Palacios et al. 2020). Aneural model systems, like *P. polycephalum* and their simple Neurozoan counterparts, like Hydra (Szymanski & Yuste 2019) or C. elegans (Faumont et al. 2012), have the crucial property that behaviour is readily accessible by the dynamics of their morphology and/or topology. This macroscopic level can be modelled by a mesoscopic description of the network (and further components) whose parameters are set by microscopic details. For these three systems, details are known to a large extent. A full hierarchical description of behaviour is possible, extending from individual organisms to the collective behaviour of populations made up of small groups, swarms or even complex societies. In the spirit of universal mechanisms, we expect to find similar structures defining traits like habituation, anticipation, decision-making and attention also at this higher hierarchical level, as has been identified, e.g. when comparing *P. polycephalum* with ants (Reid & Latty 2016) or transport networks (Tero et al. 2010), as well as in the Kelly criterion, a heuristic for optimal asset allocation (Kelly 2011).

Data accessibility. This article has no additional data.

Authors' contributions. A.B., A.F. and C.O. laid down the overall plan of the manuscript. A.B., A.F., C.O., L.B., H.-G.D. and A.D. contributed to the first draft of the manuscript. A.F., C.O. and A.D. produced the figures and the movies. A.D. coordinated the writing of the manuscript. A.D. and H.G.-D. secured funding. All authors gave final approval for publication.

Competing interests. We declare we have no competing interests.

Funding. We received no funding for this study.

Acknowledgements. A.B. and L.B. are supported by a grant from the 'Agence Nationale de la recherche' reference no. ANR-17-CE020019-01-

SMARTCELL. A.F., C.O. and H.-G.D. acknowledge support by the German Research Foundation (DFG, grant no. DO 699/6-1).

A.F. acknowledges funding by the Central Research Development Fund (CRDF) of the University of Bremen.

Chapitre 4: Cellects, un logiciel pour quantifier les comportements de cellules géantes.

Résumé

Quantifier les comportements d'un organisme pour répondre à des questions scientifiques est un problème qui requiert de la précision, de la versatilité, de la reproductibilité, ainsi qu'une remise en question de nos capacités à observer avec objectivité. Ces facteurs déterminent la qualité de la quantification des comportements. De plus, certains comportements, comme les phénomènes oscillatoires dont nous avons parlé au chapitre précédent, sont très difficiles à observer et à mesurer. J'ai développé Cellects pour que l'on puisse quantifier avec fiabilité les comportements de *P. polycephalum*.

L'analyse d'image automatique est une pratique de plus en plus utilisée en biologie expérimentale, notamment en éthologie. En général, les programmes d'analyse d'images consistent à identifier une forme (cela peut être un objet, un visage, un animal, une couleur…) sur une image ou une vidéo. Le processus par lequel on y parvient s'appelle la segmentation. Alors que les méthodes de détection manuelle sont parfois plus précises, les avantages de la détection automatique résident dans la reproductibilité, la réduction du biais de l'observateur et la réplicabilité. La reproductibilité permet de reproduire à l'identique les résultats d'une même expérience. La réplicabilité permet de s'assurer que les analyses sont les mêmes dans deux expériences différentes. Alors que cela est presque impossible pour un être humain, un logiciel le permet systématiquement. De la même manière, alors qu'un programme réalise toujours les mêmes erreurs/succès, deux observateurs risquent d'avoir des biais différents dans leur façon d'analyser les images: nous appelons cela le biais de l'observateur. En plus de ces avantages, nous allons voir comment Cellects obtient une précision supérieure à la détection manuelle.

Nous avons développé Cellects à partir d'un programme matlab réalisé par Alfonso Perez-Escudero pour l'étude de Vogel et al. (2015). Ce programme utilisait

une valeur d'intensité lumineuse (dans le bleu) pour détecter *P. polycephalum*. Dans une configuration, Cellects peut trouver automatiquement cette valeur seuil pour toutes les images d'une vidéo. Dans deux autres configurations, Cellects étudie la dynamique de variation d'intensité lumineuse pour détecter les mouvements des cellules. Ces configurations et des combinaisons de celles-ci permettent à ce logiciel de détecter précisément les cellules dans des conditions très différentes.

A partir de ces détections, Cellects va mesurer un grand nombre de variables permettant de quantifier avec précision les comportements d'une cellule comme *P. polycephalum*. Cellects réunit les variables mesurées dans les chapitres 1 et 2 et permet de mesurer certains des phénomènes oscillatoires décrits dans le chapitre 3. Il peut faire cela avec n'importe quel nombre d'arènes expérimentales.

Cellects a été pensé pour faciliter son utilisation et son amélioration. Pour cela, il guide ses utilisateurs avec une interface comprenant des illustrations de l'analyse au fil de l'eau, son code source est libre et ouvert, et il peut être installé en quelques clics sur Windows via un exécutable.

Cellects, a software to quantify cell expansion and motion

A. Boussard, P. Arrufat, A. Dussutour and A. Pérez-Escudero

Rue Marianne Grunberg-Manago, 31400 Toulouse, France

Research Centre on Animal Cognition (CRCA), Centre for Integrative Biology (CBI), Toulouse University, CNRS

Correspondence author: aurele.boussard@gmail.com

Abstract

Automated quantification offers unique opportunities to study biological phenomena, increasing reproducibility, replicability, accuracy, and throughput, while reducing observer biases. We present Cellects, a tool to quantify growth and motion in 2D. This software operates with image sequences containing specimens growing and moving on an immobile flat surface. Its user-friendly interface makes it easy to adjust the quantification parameters to cover a wide range of species and conditions, and includes tools to validate the results and correct mistakes if necessary. The software provides the region covered by the specimens at each point of time, as well as many geometrical descriptors that characterize it. We validated Cellects with *Physarum polycephalum*, which is particularly difficult to detect because of its complex shape and internal heterogeneity. This validation covered five different conditions with different background and lighting, and found Cellects to be highly accurate in all cases. Cellects' main strengths are its broad scope of action, automated computation of a variety of geometrical descriptors, easy installation and user-friendly interface.
github link: https://github.com/Aurele-B/Cellects

keywords: growth and motion quantification, 2D biological growth, automated tracking, cell expansion, biotechnology, video analysis, time-lapse analysis, software, high throughput, microbiology, mycology, pharmacology, toxicology, ecology, behavioural ecology, ethology.

Introduction

All species exhibit growth, be it at the individual level (through development) or at the population level (through reproduction). Recent advances in imaging techniques have made it relatively easy and inexpensive to capture biological growth at almost all scales, including molecular aggregation (Jyothi et al., 2020), bacterial growth

(Moller et al., 1995), human human brain development (Rajagopalan et al., 2011), forest recovery (Hird et al., 2021) and many more. These techniques have produced an explosion in the availability of datasets in the form of videos or time-lapses, and analysis of these datasets has become an important bottleneck. Automating this analysis presents challenges, especially when different parts of the organism have different appearance (for example, newly formed parts usually have different coloration or density than older parts), when the contrast between the organism and the background is poor, and when the growth pattern is complex and unpredictable. Also, different organisms exhibit very different characteristics, requiring different segmentation and analysis approaches, making it difficult to develop a general-purpose software that can quantify growth for a wide variety of organisms in challenging conditions.

The main limitations that prevent current systems from being widely used are the following. First, most growth quantification algorithms focus on a single type of organism, such as bacteria (Ernebjerg & Kishony 2012, Levin-Reisman, 2014, Bär et al., 2020, Koch et al., 2021, Pandey et al., 2021, Mollet et al., 2021, Spedalieri et al., 2020), yeasts (Falconnet et al., 2010, Doncic et al., 2013), slime molds (Halvorsrud & Wagner 1998, Vogel et al., 2015, Dirnberger et al., 2017, Patino-Ramirez et al., 2021), plants (French et al., 2009, Felekis et al., 2011), tumors (Haney et al., 2001) or stem cells (Yoshida et al., 2019).
Second, many of them lack a graphical user-friendly interface (Ernebjerg & Kishony 2012, Koch et al., 2021, Falconnet et al., 2010, Spedalieri et al., 2020, Halvorsrud & Wagner 1998, Vogel et al., 2015, Dirnberger et al., 2017, Patino-Ramirez et al., 2019, Patino-Ramirez et al., 2021).
Third, when equipped with a user interface, these softwares are commercial or rely on a commercial programming language (Levin-Reisman 2014, Yoshida et al., 2019, Bär et al., 2020, Doncic et al., 2013). Since they are not free and open source, commercial programs cannot be improved by their users or other developers.

Fourth, apart from a few commercial programs (Yoshida et al., 2019, Bär et al., 2020), automated growth quantification programs suffer from a narrow range of output variables. To the best of our knowledge, the only free and open source programs having a wide inventory of output variables required to perform the analysis manually or using macros (e.g. ImageJ and Fiji, Schneider et al., 2012).
Fifth, no published software can be adjusted to a wide variety of lighting and coloring to adapt to different types of organisms and experimental conditions.
We developed Cellects to fill these gaps in the inventory of growth quantification programs. It is easy to install, and has a user-friendly interface that makes it easy to find the right settings in a broad range of color and lighting conditions, so that it can be easily applied to diverse conditions and taxa. It outputs a wide variety of geometry descriptors in addition to its raw results, and it also includes tools to review and validate the results.
Cellects has been tested on *Physarum polycephalum* plasmodia and a developing embryo of *Coturnix japonica*, but it has been designed to be useful for many other taxa, including Fungi, Bacteria, Myxomycota, and Plants.

This paper is organized as follows. Section I presents the Cellects' capabilities and the conditions in which it can be useful. Section II briefly describes the quantification methodology. Section III presents a validation in various biological and lighting conditions. The images used for validation and the codes are available in public repositories (see data availability). A complete algorithmic description of the software can be found in the Appendix 1 and the github repository includes a user manual.

Software capabilities

Cellects quantifies the growth and motion of one or several individuals, finding the region(s) occupied by them in every frame of a video (Figure 1a,b - video 1). These regions are the raw output of the software, which also computes derived variables

such as area (Figure 1c), perimeter, eccentricity (Figure 1d), convexity (Figure 1e), solidity (Figure 1e), and others (Table 1).

Cellects provides a time series of all the variables listed in Table 1, and outputs them as .csv files.

Cellects is easy to install and use. A stand-alone executable installs Cellects on Windows with a single click and no additional dependencies. Alternatively, it can be installed on any operating system as a Python package (See installation tutorial at S1). It has a user-friendly interface that helps the user select the optimal parameters for any condition (Figure 2 and its supplements), and also includes a tool to validate and correct mistakes (see the user manual).

Cellects has several features to increase its flexibility. First, it works on images or videos containing multiple arenas, which are automatically detected and can have a variety of shapes. Second, within each arena, Cellects can track one or several individuals, which may appear, disappear, grow, connect and disconnect with each other (Figure 1f-h). Third, it can sequentially analyze several folders. Fourth, while it requires an immobile background, it is prepared to work with videos where a drift-correction has been applied.

Finally, Cellects' main strength is to be able to detect the growth of the cells even when the contrast is relatively poor. It does this by combining two ingredients: a flexible interface where the user can find the most suitable parameters, and a powerful segmentation routine that uses the growth itself to help the segmentation of each frame, using dynamical information, and not only the information contained in each image. In the next section, we will see how this algorithm works.

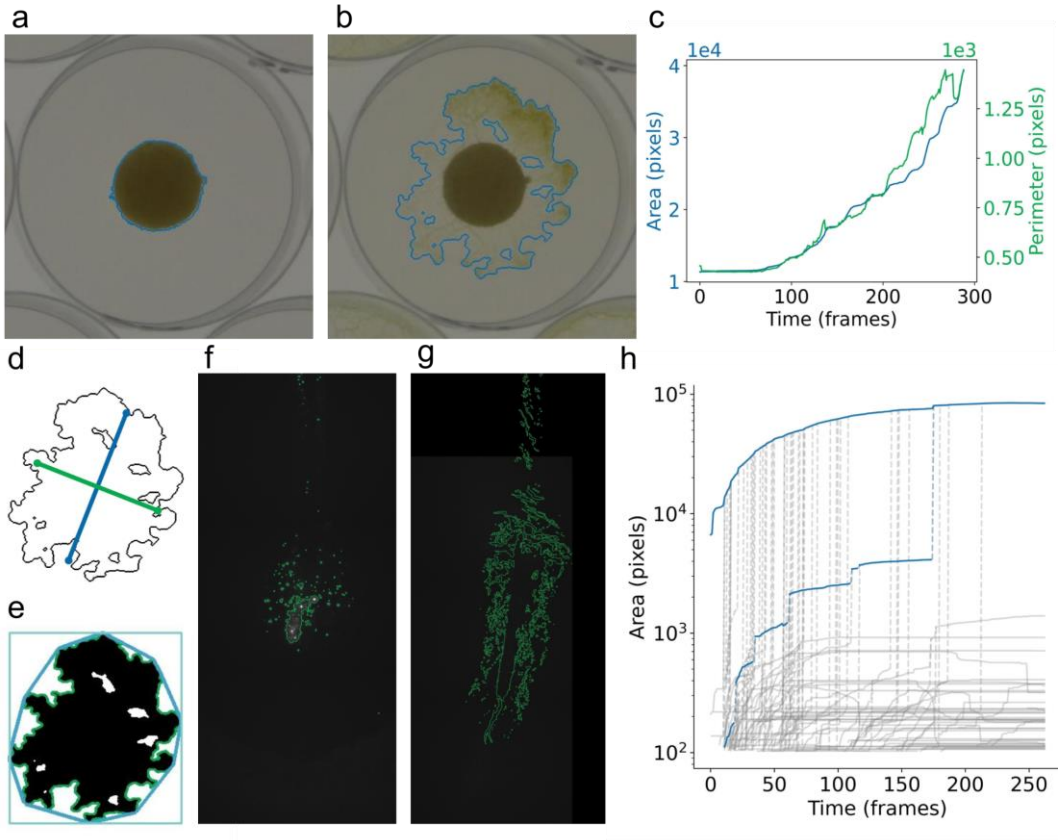


Figure 1: Cellects detects and analyzes growing or moving cells or colonies. **a)** Image of a giant unicellular organism (*P. polycephalum*), with cellect's initial segmentation (blue line). For a complete example see Figure 1 - video 1. **b)** Same as (a), but after 24h. **c)** Area and perimeter of the organism shown in boxes (a) and (b), over time. d) Directions for the major and minor axes of the shape detected in (b). Eccentricity measures the length difference between these two axes. e) Minimal convex hull (blue) and minimal bounding rectangle (green). Convexity compares the perimeter of the cell with that of the minimal convex hull, while solidity compares the areas. Rectangularity and circularity quantify the similarity of the cell with a rectangle and a circle, respectively. g) Image of cellular progenitors marked with GFP during the development of a quail embryo (*C. japonica*, caudal part of stage HH11, see Romanos et al., 2021)). Green lines show the segmentation. h) Same as (g), but for a later time step. **g)** and **h)** images of the segmentation of the growth and motion of cellular progenitors. **f)** Area against time of connected groups of the cells shown in (g), (h) Each vertical line is a fusion event between two groups of cellular progenitors. One of these fusions has been highlighted in blue for clarity.

Table 1: List and description of all descriptors Cellects can compute. We use the methods from Rocha et al. (2002) to compute the major and minor axes lengths and orientation.

Descriptor	Formula	Additional information
Surface	$\sum_0^{Pixel\ number} Sp$	With Sp, the surface of one pixel in mm
Perimeter	$\sum_0^{Contour\ pixel\ number} \mathrm{Sp}$	With Sp, the surface of one pixel in mm
Circulariry	$\frac{4 * \pi * Surface}{(Perimeter)^2}$	
Rectangularity	$\frac{Surface}{R_1 * R_2}$	With R_1 and R_2 the lengths of the sides of the smallest rectangle containing the cell(s)
Hole area	$\sum_0^{Holes\ pixel\ number} Sp$	With Sp, the surface of one pixel in mm
Solidity	$\frac{Surface}{Convex\ hull\ surface}$	The convex hull being the smallest convex (having only convex angles) shape containing the cell(s)
Convexity	$\frac{Convex\ hull\ perimeter}{Perimeter}$	
Eccentricity	$\sqrt{1 - \frac{Minor\ axis\ length}{Major\ axis\ length}}$	
Euler number	Connected shape number - Holes number	
Standard deviations	$sd_x\ and\ sd_y$	A mesure of variation over each axis
Skewness	$\frac{M_{3x}}{(sd_x)^3}$ and $\frac{M_{3y}}{(sd_y)^3}$	With M_{3x}, *and* M_{3y} the third central moment
Kurtosis	$\frac{M_{4x}}{(sd_x)^4}$ and $\frac{M_{4y}}{(sd_y)^4}$	With M_{4x}, *and* M_{4y} the fourth central moment
Major axis length	$\sqrt{6 * (C_{2x} + C_{2y} + \sqrt{(2 * C_{11})^2 + (C_{2x} - C_{2y})^2})}$	With C_{2x} *and* C_{2y} the second orders central moments with regard to x and y resp. And with C_{11} the first order central moment with regard to both x and y
Minor axis length	$\sqrt{6 * (C_{2x} + C_{2y} - \sqrt{(2 * C_{11})^2 + (C_{2x} - C_{2y})^2})}$	
Axes orientation angle	$0.5 * \arctan \frac{2 * C_{11}}{C_{2x} - C_{2y}}$	
Isotropic growth	Dilate original shape and compare with Surface	Determine if growth starts homogeneously in all directions
Digitated transition	When Solidity looses 5% of its original value	If there was an isotropic growth, check when it ceased
Oscillating clusters	Size and number	Of connected clusters oscillating synchronously

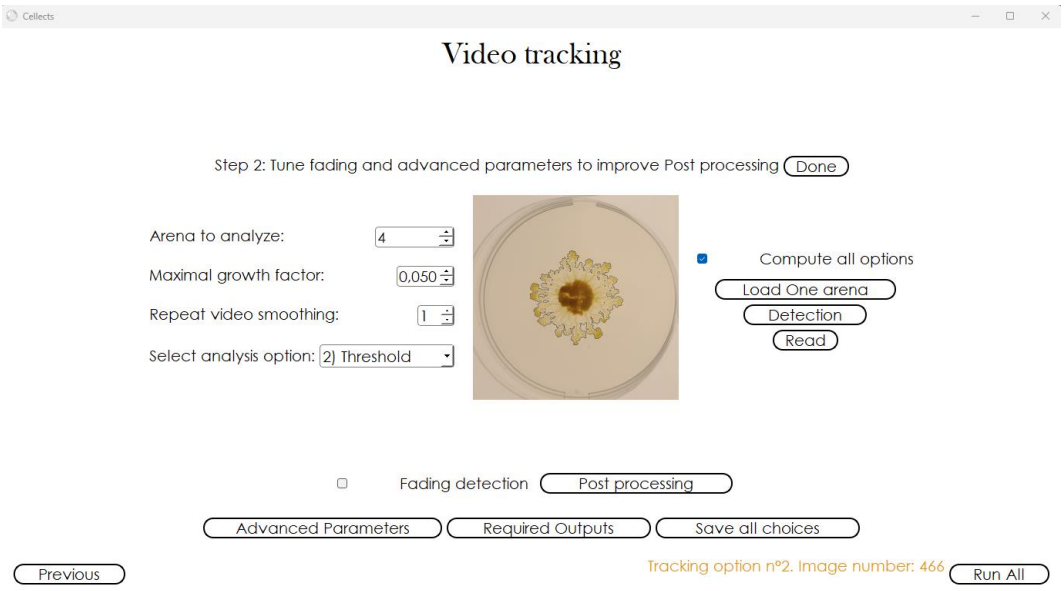


Figure 2: Snapshot of the user interface during the analysis of one arena. Find a complete user manual in the github repository.

Image analysis methodology

Cellects uses traditional computer vision algorithms, combining different techniques to enhance flexibility. An automatic algorithm selects the most promising method for each dataset, so that in most cases the user does not need to fine-tune any analysis parameters. The analysis proceeds in four steps: perform segmentation of the first image, delineate arenas, perform segmentation of the whole video, and improve that video segmentation.

The first step of the process converts the first image (Figure 3a) into a grayscale image that maximizes contrast between the specimens and the background (Figure 3b). To do this, Cellects uses linear combinations of several color channels, from different color spaces, and displays the resulting segmentation in the interface (Figure 3c in blue). The user can easily choose among several automatically generated combinations, selecting the one that provides the best segmentation (See S3.1 for more information). In the few cases in which none of them works well

enough, the user can fine tune them in three ways: With a drawing tool that tells the software where to find cell/background to improve its automatic training, by manually changing the parameters that determine the linear combination of the color spaces, or choosing a different segmentation algorithm (between Otsu thresholding and k-means). When selected, background subtraction occurs just before segmentation. This manual fine-tuning of the parameters typically takes a few minutes and greatly enhances the ability of Cellects to work with diverse specimens and experimental conditions.

Once the segmentation of the first frame is done, Cellects uses the initial position of the specimens to automatically detect all the arenas (whenever there is more than one; see details in S3.2). Arena detection can also be corrected manually if needed. Then, the images are cropped to analyze each arena separately, and from now on we will describe the process for a single arena.

The third step is the segmentation of all frames of each single-arena video. This segmentation will consist in transforming the grayscale video resulting from the color space combination conversion into a binary video of presence/absence. To do this, Cellects provides several different options to detect specimen motion and growth throughout the video (see a detailed description in S3.4): In simple datasets with strong contrast between specimens and background, Cellects can simply segment each image by thresholding. In more challenging conditions, the algorithm tracks the intensity of each pixel over time, using this dynamical information to determine when a pixel has been covered. This is done through an automatically determined threshold on the intensity (Figure 3d, blue) or on its derivative (Figure 3d, green). Additionally, Cellects can apply the logical operators AND or OR to these intensity and derivative thresholds. The default option is the dynamical intensity threshold and it works in many cases, but the user interface lets the user quickly check the results of different options and choose the best one by visual inspection of the segmentation result in different frames (Figure 3e).

The final step consists in improving the segmentation (see S3.5 for more information). Cellects will first apply several filters that consistently improve the results, such as checking that each detected pixel was also detected at least twice in the three previous frames, omitting images containing too many detected pixels, and performing morphological opening and closing. Optionally, the user can activate the detection of areas left by the cell (See S3.5.B for details).

Additionally, two optional algorithms correct particular types of errors. The first algorithm is useful when the substrate on which the cells are at the first image is of a different color than the substrate on which they will grow, expand or move. This color difference may produce holes in the segmentation and we developed an optional algorithm to correct this kind of error around the initial shape. The second algorithm should be used when each arena contains a single specimen, which should generate a single connected component. We can use this information to correct mistakes in models such as *P. polycephalum,* whose strong heterogeneity produces large variations of opacity. In these cases, segmentation may fail in the most transparent parts of the specimens and identify two disconnected components (Figure 3f,g). The correction algorithm merges these disconnecting components by finding the most likely pixels connecting them and the most likely times at which those pixels were covered during growth (Figure 3h).

Once the image analysis is finished, the software determines the value of each morphological descriptor at each time frame (Table 1). Finally, Cellects saves a new video for each arena with the original video next to the converted video displaying the segmentation result, so that the user can easily validate the result. If an arena shows a poor segmentation result, the user can re-analyze it, tuning all parameters for that specific arena.

To create Cellects and this paper, we used python 3.10 and the python packages numpy (Harris et al., 2020), opencv (Bradski 2000), pandas (McKinney et al., 2010), scipy (Virtanen et al., 2020) and matplotlib (Hunter 2007).

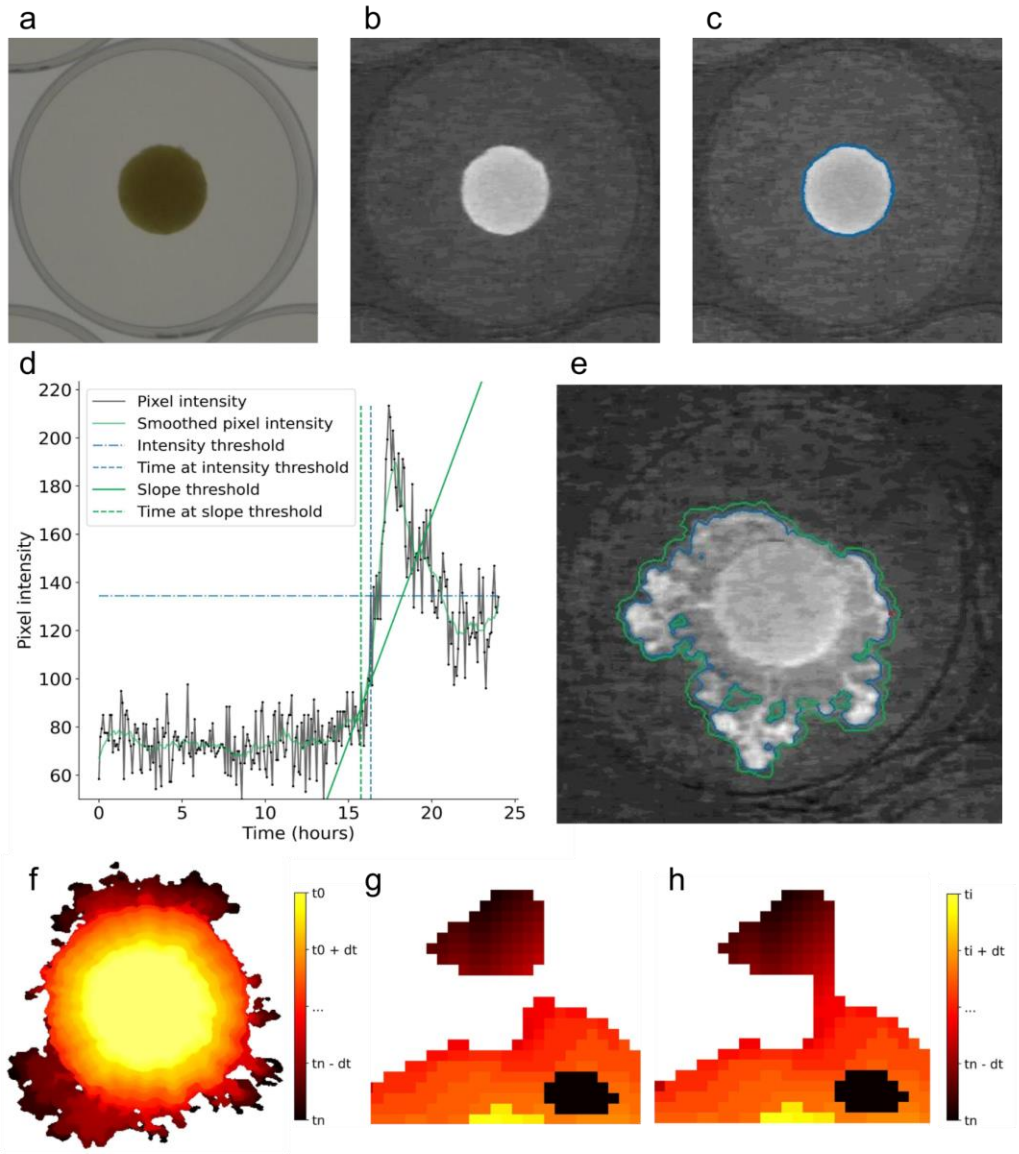


Figure 3: Specimens segmentation algorithms. a) First original image of one arena. **b)** Greyscale image of the same arena after conversion. **c)** Same as (b), showing the result of

segmentation (blue line). **d)** Intensity curve for one pixel (marked in red in box e). Blue horizontal dashed-dotted line: Intensity threshold. Blue vertical dashed line: Time at which the intensity threshold is reached. Green vertical dashed line: Time at which the derivative threshold (illustrated by the solid green line) is reached. In this example, the slope segmentation method detects the covering of the pixel before the threshold segmentation method. Because of that, the area within the green contour is larger than the area within the blue contour in e). **e)** Grayscale image at time t=16:40, showing two possible segmentations (intensity in blue, derivative in green). Red dot: Pixel whose time series is shown in (d).**f)** Segmentation of a cell, showing a small disconnected component in the bottom. **g)** Zoom on the upper part of (g), showing a disconnection. h) Dynamic fixing of the disconnection. Colors indicate the estimated time at which each pixel was covered. Ranges from t0=0:0 to the current time tn=21:20 with an arbitrary time step dt.

Validation

We have validated Cellects on time-lapses of circular or square samples of the giant unicellular *P. polycephalum* (See the experimental procedures in S4). The structural heterogeneity of this cell gives it variations in transparency (Oettmeier et al., 2017), making it hard to detect, both with the naked eye and with a computer. Therefore, a program that can detect this cell should be able to detect more homogeneous specimens with less difficulty. We performed the validation in a wide range of conditions, in order to cover as many types of experiments as possible. In particular, our validation covered the following conditions:

a) High contrast, single color: LED's provided a bright, uniform and high-contrast background. The substrate underwent no significant desiccation, ensuring uniform imaging quality throughout the experiment, and image resolution was high (Fig 4a). This is our reference for optimal imaging conditions.
b) High contrast, multiple colors: good contrast but each arena contained a food patch in addition to the cells, adding another color to the immediate background (Fig 4b). Also, the absence of a protecting petri dish increased agar desiccation, which induced changes in the appearance of the cells and substrate as the experiment progressed.

c) Low contrast, dark and heterogeneous background, and significant desiccation (Fig 4c).
d) Lower contrast, bright homogeneous background, and no significant desiccation (Fig 4d).
e) Low contrast and low resolution: These experiments were performed on a non-transparent agar bridge, which decreases contrast with the cell, and the lowest resolution (Fig 4e).

We randomly selected 60 arenas per experiment to assess Cellects' accuracy. An ideal validation would compare Cellects' output with an independent annotation made by a human expert operator. However, this was not possible in our case: in our conditions contrast is often so low that, while it is easy to distinguish when a segmentation is clearly incorrect, in many cases there are several possible segmentations that seem correct (i.e. different expert operators, or even the same operator at different times, would choose different options). Because of this limitation, we first ran Cellects on our validation samples, and then reviewed all of them manually, tagging all cases in which the human operator was certain that there was a segmentation mistake. This method introduces a small bias in favor of Cellects, because the human operator might miss some mistakes or be too permissive in doubtful cases. However, the area covered by these doubtful regions is negligible in comparison with the areas affected by the clear mistakes that were unambiguously detected by the human operator, so we expect that a different validation with an independent ground truth would produce a virtually identical result.

Therefore, our validation procedure was as follows. First, we run Cellects on the videos of each of the experiments, following steps 1-4 described in section II: For each experiment, we selected the optimal option to create maximum-contrast grayscale images, made sure that all arenas were properly detected, selected the optimal option for the dynamical segmentation, and selected the optimal post-

processing options. This tuning took approximately 20 minutes for each experiment (see all parameters in Appendix 2 - table 1). Then, we run the program to perform automatic segmentation. It is important to note that we did not perform any correction after the automatic segmentation. As described in section II Cellects includes a tool to re-analyze defective arenas with different parameters, but we did not use it to validate the software.

For each experiment, we loaded the result of the segmentation of each arena (blue lines in Figure 4a-e, bottom) in image J (Schneider et al., 2012) and we manually corrected all detectable errors (red lines in Figure 4a-e, bottom). We then compared Cellects segmentations with the corrected images to get the proportion of the cell that has been accurately detected (cell accuracy = true positives / (true positives + false negatives)) and the proportion of the background that has been accurately detected (Background accuracy = true negatives / (true negatives + false positives)). For each experiment, we averaged these two accuracies to estimate the overall accuracy (Figure 4f).

In the best case scenario (experiment a, with high contrast, high resolution, uniform background, and weak desiccation), Cellects accurately detected both the cells and the background (99.76% average accuracy).

Experiments b and c still achieved maximum accuracy in the detection of the cells, but the more complex background and the desiccation of the agar made it more challenging to correctly identify the background. These challenges decreased the accuracy of the background detection only slightly, down to 97.74% in b and 97.50% in c. Experiment d had very poor contrast and significant desiccation, causing a slight decrease in accuracy both in the detection of the cells (down to 98.74%) and of the background (down to 96.86%). The poor resolution of experiment d produced similarly small drops in accuracy (97.66% for the cells and

97.56% for the background). In sum, Cellects showed excellent performance, with an accuracy higher than 97% even in the most challenging condition.

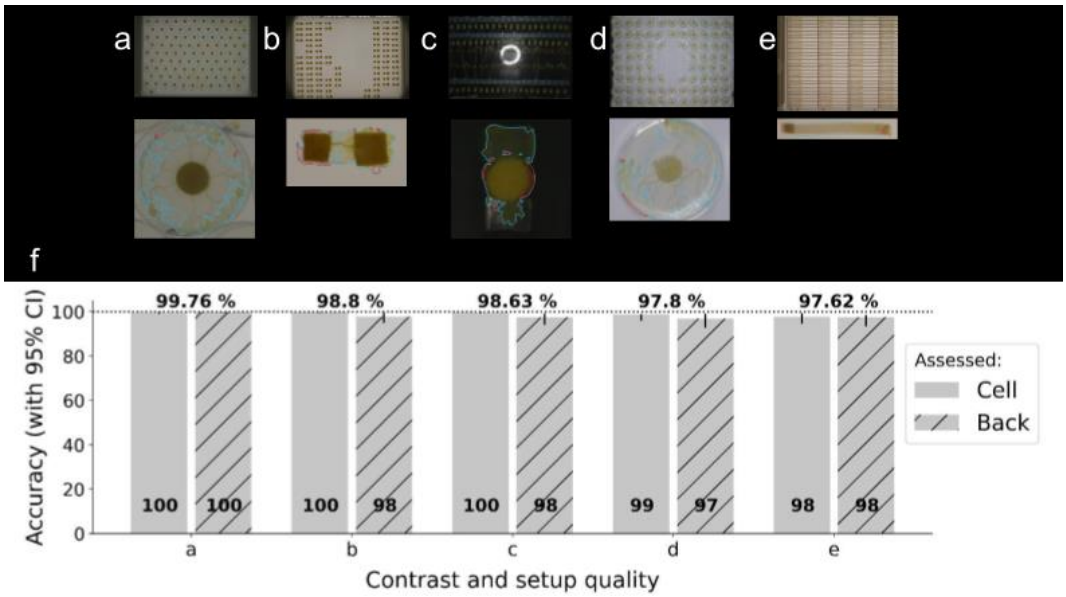


Figure 4: Accuracy of Cellects in 5 conditions with different types of backgrounds and arenas. **a-e)** Snapshots of the five conditions. The upper image contains the complete setup and the lower one is a zoom on one particular arena where we found segmentation mistakes. Cellects segmentation is in blue and manual correction is in red. **a)** High contrast and optimal setup. **b)** High contrast, heterogeneous colors. **c)** Low contrast and setup prone to desiccation. **d)** Low contrast and optimal setup. **e)** Low resolution. **f)** Barplot of the corresponding accuracies for each of the 5 conditions. The accuracy of Cellects to detect cellular material is in solid gray. The accuracy of Cellects to detect the background is in hatched gray. The average of these two accuracies (named overall accuracy) is written above each condition in black.

Discussion

Cellects is an image analysis software to study the growth or exploratory behavior of cells or cell colonies. It provides a wide range of dynamical and morphological descriptors to do so, and it is designed and validated to work in a wide range of conditions.

Cellects may be applied to many different studies. It may be used to test specific predictions by measuring one specific variable. For example, we know that the oscillatory dynamics of *P. polycephalum* play a role in the chemotactic behavior of this organism (Durham & Ridgway 1976). Cellects could be a good tool to improve our understanding of this causal link by highlighting the effect of oscillatory variables on morphological or speed-related variables. Future versions of Cellects may have additional features to improve this analysis, such as methods to extract *P. polycephalum*'s tubular network, quantify its oscillations, and compute its fractal dimension. It may also be used to study correlations or causations between various factors. In this context, its applications can range from the effects of pollutants on living organisms to research for gene pleiotropic effects.

Cellects uses traditional image analysis techniques, combining several of them to increase its flexibility. Its strength lies in a combination of automatic algorithms to select the best analysis technique for each dataset, coupled with a user-friendly interface that facilitates parameter tuning for difficult datasets.

Quantifying cells automatically allows transparent and reproducible analysis while reducing the observer bias. Since Cellects can be used in various conditions and to study various biological models, it can be a valid tool for studying context-dependent factors as well as interspecific comparisons.

Appendix 1

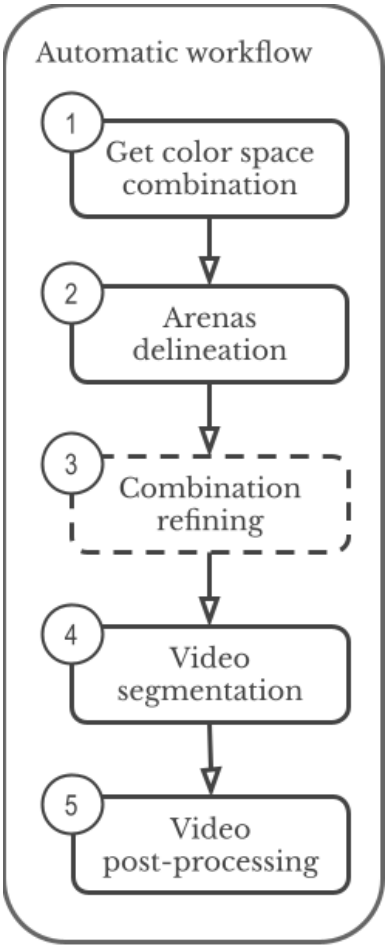
Developer-oriented description of the software

Foreword

We present a description of Cellects from a developer point of view. An important note is that user-friendliness and versatility are at the core of Cellects' development. Henceforth, the general workflow (as detailed in the next section) is in fact, a user-

assisted workflow. Appendix 1 - figure 1 shows how every step of the general workflow can be fine-tuned by the user to cope with various imaging conditions. At every step, automatic algorithms suggest options to help the user to find the best parameters. The following detailed workflow section explains how these automatic algorithms work.

First, we start by detailing how Cellects analyze one image in order to get a color space combination maximizing the contrast between the specimens and the background. Second, we explain how Cellects automatically delineate each arena. Third, we complete the information of the main document on the five quantification options of Cellects. Fourth, we describe the video post-processing algorithms that improve the segmentation.



Appendix 1 - figure 1: Workflow of Cellects. Automatic workflow sums up the chronological steps of growth and motion analysis by Cellects. The numbers refer to the corresponding sections in this document detailing each step. Dashed box is optional.

Detailed workflow

i) Determination of optimal segmentation parameters

This section describes how Cellects transforms the color images into grayscale images in a way that maximizes the contrast between the specimens and the background.

An image can be coded in different color spaces, such as RGB, HSV, etc. These color spaces code the color of each pixel as three numbers, ranging from 0 to 255. Our aim is to find a combination of these three numbers that provides a single intensity value for each pixel, and which maximizes the contrast between the organism and the background. To increase the flexibility of our algorithm, we use more than one color space to look for these combinations. In particular, we use the RGB, LAB, HSV, LUV, HLS and YUV color spaces. What we call a color space combination is a transformation combining several channels of one or more color spaces.

To find the optimal color space combination, Cellects uses one image (which we will call “seed image”). The software selects by default the first image of the sequence as seed image, but the user can select a different image where the cells are more visible.

Cellects has a fully automatic algorithm to select a good color space combination, which proceeds in four steps:

First, it screens every channel of every color space. For instance, it converts the image into grayscale using the second channel of the color space HSV, and segments that grayscale image using Otsu thresholding. Once a binary image is

computed from every channel, Cellects only keep the channels for which the number of connected components is lower than 10000, and the total area detected is higher than 100 pixels but lower than 0.75 times the total size of the image. By doing so, we eliminate the channels that produce the most noise.

In the second step, Cellects uses all the channels that pass the first filter and tests all possible pairwise combinations. Cellects combines channels by summing their intensities and re-scaling the result between 0 and 255. It then performs the segmentation on these combinations, and filters them with the same criteria as in the first step.

The third step uses the previously selected channels and combinations that produce the highest and lowest detected surface to make logical operations between them. It applies the AND operator between the two results having the highest surface, and the OR operator between the two results having the lowest surface. It thus generates another two candidate segmentations, which are added to the ones obtained in the previous steps.

In the fourth step, Cellects works under the assumption that the image contains multiple similar arenas containing a collection of objects with similar size and shape, and keeps the segmentations whose standard error of the area is smaller than ten times the smallest area standard error across all segmentations. To account for cases in which the experimental setup induces segmentation errors in one particular direction, Cellects also keeps the segmentation with minimal width standard error across all segmentations, and the one with minimal height standard error across all segmentations. All retained segmentations are shown to the user, who can then select the best one.

If this automatic procedure does not produce good enough results, the user can manually label some areas of the picture as “cell” or “background” to help find a

better color space combination. This is particularly useful when the background is heterogeneous, and Cellects can use this information in two ways: First; it can simply ignore the parts labeled as background (e.g. objects or manual writings). Second, it can use the manual annotation to train a more sophisticated segmentation method: A k-means algorithm to split the image into as many categories as necessary and use the "Cell" labelling to infer to what category the specimens are related to.

Then, Cellects will take into account the user's input as follows: For each of the segmentations created in the previous steps, it will count the amount of pixels labeled as specimens by the user that were correctly labeled as cell in the segmentation, and will select the segmentation that achieves the highest number. Then, it will do the same thing for the pixels labeled as background. Then, it will use the AND operator between the two results having the best match with the areas labeled as specimens, the AND operator between the two results having the best match with the areas labeled as background, and the OR operator between the result having the best match with the areas labeled as specimens and the result having the best match with the areas labeled as background. Therefore, this optional labeling adds three new segmentations that take into account the user-labeled regions. If the results are still unsatisfactory, the user can continue labeling more areas until one of the segmentations matches their expectations.

ii) Delineation of arenas

Arenas can be delimited automatically or manually. Cellects includes two automatic algorithms: A fast one to be used when arenas are symmetric around the initial position of the specimens or sufficiently far from each other, and a slower one to be used otherwise. These automatic algorithms work even if the arenas are not detectable in the images, but only work when there is a single individual in each arena. In the case of manual delimitation, the user draws each arena by holding

down the mouse button. The following paragraphs describe the two automatic algorithms.

The fast algorithm computes each arena coordinate using the distances between the components detected in the seed image after step 1. For each component, Cellects finds its nearest neighbor and uses its distance as the side of the square, centered on the component, giving the x and y limits of the arena.

If the initial position of the cells do not provide good estimates of the center of each arena, Cellects can use the slower algorithm to find them. Because Cellects is intended to be very general, it cannot use specific characteristics of a particular arena to find its edges. Instead, it uses the motion and/or growth of the cell to infer the position of each arena. To do so, Cellects segments a sample of 5 images (equally spaced in time) using the same algorithm as for the seed image. Even if this segmentation is not accurate, the following algorithm finds the arenas robustly. First, it finds a rough estimate of the expected position of the cell. To do this, it dilates the cell in the first frame, until the edge of the dilated image is closer to the nearest centroid of other cells than to its own centroid. Then, it moves to the second image, and also dilates it in order to link together different disconnected components that may result from an inaccurate segmentation. Then, it performs an AND operation between these two dilated images and dilates the result so that it remains one component per arena. By doing this to all cells, we get an estimate of their shape in the second frame, and we can compute their centroids. We then repeat this procedure, for each pair of consecutive frames. Finally, Cellects computes the bounding boxes that contain the cells detected in the 5 frames for each arena, and uses them to estimate each arena coordinate.

In some experiments, all cells are located at one edge of the arena and move roughly in the same direction. Cellects includes an option to take advantage of this regularity and improve the accuracy of arena detection: Once the centroids of a frame have been estimated (as described above), Cellects finds the centroid with highest displacement with respect to the previous frame, and applies the same displacement to all centroids.

iii) Refining the color combinations with the last image

As an optional step, Cellects can refine the choice of color space combination, using the last image of the sequence instead of the seed image. In order to increase the diversity of combinations explored, this optional analysis is performed in a different way than for the seed image. Also, this refining can use information from the segmentation of the seed frame and from the geometry of the arenas to rank the quality of the segmentation emerging from each color space combination. To generate these combinations, Cellects follows four steps.
The first step is identical to the first step of the previously described automatic algorithm (in section 1) and starts by screening every possible channel and color space.

The second step aims to find combinations that consider many channels, rather than those with only one or two. To do that, it creates combinations that consist of the sum of all channels except one. It then filters these combinations in the same way as for the previous step. Then, all surviving combinations are retained, and also undergo the same process in which one more channel is excluded, and the process continues until reaching single-channel combinations. This process thus creates new combinations that include any number of channels.

The third step filters these segmentations, keeping those that fulfill the following criteria: (1) The number of connected components is higher than the number of arenas and lower than 10000. (2) The detected area covers less than 99% of the image. (2) Less than 1% of the detected area falls outside the arenas. (4) Each connected component of the detected area covers less than 75% of the image.

Finally, the fourth step ranks the remaining segmentations using the following criteria: If the user labeled any areas as “cell”, the ranking will reflect the amount

of cell pixels in common between the segmentation and the user labels. If the user did not label any areas as cells but labeled areas as background, the ranking will reflect the number of background pixels in common. Otherwise, the ranking will reflect the number of pixels in common with the segmentation of the first image.

iv) Video segmentation

At this point, arenas have been delimited and each can be analyzed separately. The following describes what happens during the analysis of one arena. Also, while Cellects can work with either one or several cells in each arena, we will describe the algorithm for a single cell, making clarifications whenever anything changes for multiple cells.

Cellects starts by reading and converting the video of each arena into grayscale, using the selected color space combination. Then, it processes it through the following steps.

iv)a. Determination of first frame

First, Cellects finds the frame in which the cell is visible for the first time in each arena. When the seed image is the first image, then all cells are visible from the beginning. Otherwise, it will apply the same segmentation as for the seed image to the first, second, third images, etc. until the cell appears in one of them.

iv)b. Video segmentation

The video segmentation transforms a grayscale video into a binary one. For Cellects to be as versatile as possible, the user can select across five segmentation strategies.

- The first option is the simplest: It starts at the frame in which the cell is visible for the first time and segments the video frame by frame, using the same method as when analyzing only one image (as described in sections 1

and 2). The only difference is an optional background subtraction algorithm, which subtracts the first image to all others.

- The second option segments each frame by intensity thresholding. The threshold changes over time to adapt to changes in the background over time. To estimate the optimal threshold for each frame, Cellects proceeds as follows: It first estimates the typical background intensity of each frame as an intensity higher than the first decile of all pixels in the frame. Then, it defines an initial threshold for each frame at a fixed distance above this decile. This fixed distance is initially low, so that the initial segmentation is an overestimation of the actual area covered by the specimen. Then, it performs segmentation of all frames. If any frame presents a growth greater than a user-set threshold (whose default value is 5% of the area), all thresholds are diminished by 10%. Then the segmentation is performed again, and this process continues until no frame presents excessive growth. This description refers to cases in which the background is darker than the specimen. Cellects automatically detects if contrast is reversed, and adapts the method accordingly. Finally, Cellects segments the whole video with these adjusted intensity thresholds.
- The third option uses the change in intensity over time: For each pixel, it considers the evolution in time of its intensity, and considers that the cell covers the pixel when the slope of this intensity over time exceeds a threshold (Fig 3d in the main text). For each frame, Cellects computes each frame's threshold with the similar procedure as in the second option, except for the following. As the value of the slope of a derivative is highly sensitive to noise, Cellects first smooths the intensity curves using a moving average with a window length adapted to the typical time it takes for the cell to cover each pixel. Cellects tries to compute this typical time using the dynamics of a subset of pixels whose intensity varies strongly at the beginning of the growth (see the code for further details), and uses a default value of 10 frames when this computation fails. Cellects also uses this subset of pixels

to get the reference slope threshold. Finally, it progressively modifies this reference until the video segmentation matches the required growth ratio, as in the second step.

The two next options are combinations of the two first ones.

- The fourth is a logical OR between the intensity value and the intensity slope segmentations. It provides a very permissive segmentation, which is useful when parts of the cells are very hard to detect.
- The fifth is the logical AND between the intensity value and the intensity slope segmentations. It provides a more restrictive segmentation that can be useful when both the value and the slope segmentations detect areas that are not covered by the cell.

v) Video post-processing

Video post-processing improves the resulting binary video obtained through segmentation.

v)a. Basic post-processing

This process improves the raw segmentation. It includes algorithms to filter out aberrant frames, remove small artifacts and holes, and to detect when the specimens leave pixels. First, it checks that every pixel was detected at least twice in the three previous frames. Second, it excludes frames containing too many newly detected pixels, according to the maximal growth ratio per frame (as defined in section 3B). For these frames, the previous segmentation is kept, making the analysis robust to events producing a sharp variation in the brightness of a few images in the video (for example, when an enclosed device is temporarily opened or a light is switched on or off). Third, it removes potential small artifacts and holes by performing morphological opening followed by morphological closing.

v)b. Cell leaving detection

This optional algorithm detects when areas are left by the specimens. It is useful when the cells not only grow but also move, so they can leave pixels that were covered before. When a pixel is covered, Cellects saves the intensity it had before being covered, computed as the median of the pixel's intensity over a time window before it was covered. The length of this time window matches the typical time it takes for the cell to cover each pixel (computed as described in section 4.B, third segmentation strategy). Then, pixels at the border of the cell whose intensity fall below the saved intensity, rescaled by a user-defined multiplier (set by default at 1) are considered to be left by the cell. When there should be only one cell in the arena, Cellects tries to remove each component one by one, accepting this removal only when it does not break the connectivity of all parts of the cell.

v)c. Special error correction algorithms

At the time of writing, Cellects contains two post-processing algorithms adapted to two specific situations. The first one is useful when there should be only one specimen per arena and when Cellects fails to detect its distant parts because their connections are not sufficiently visible. The second one is useful when Cellects fails to detect small areas around the initial shape, for example due to reflections near the edges. The following explains how these optional algorithms work.

Connect distant components:

This algorithm automatically and progressively adds distant shapes to the main one. This correcting process occurs in three steps. First, it selects which distant component should get connected to the main one. The user can adjust this selection process according to the distance of the distant components with the main shape, and the minimal and maximal size of these components. Second, for each distant component, it computes and creates the shortest connection with the main shape. The width of that connection depends on the size of the distant shape where the

connection occurs. Third, it uses an algorithm similar to the one used to correct errors around initial shape to estimate how quickly the gaps should be filled. This algorithm uses distance and timing vectors to create a dynamic connection between these two shapes (Figure 3f-h in the main text).

Correct errors around initial shape:

This correcting process occurs in two steps. The first one scans the formation of holes around the initial segmentation during the beginning of the growth. The second one finds out when and how these holes are to be filled. To determine how the holes should be covered, Cellects uses the same algorithm as the one used to connect distant components. Computing the speed at which growth occurs from the initial position allows Cellects to fill the holes at the same speed, and therefore to correct these errors.

Appendix 2

Biological material and validation

Software capabilities

The data used in Figure 1fgh come from cellular progenitors marked with GFP during the development of a quail embryo. *C. japonica*, caudal part of stage HH11, see Romanos et al. (2021).

Validation

Experimental procedure for the five conditions:

After being cut to the desired shape from its rearing substrate (agar 1% mixed with blended oat flake 10%), *P. polycephalum* regenerates and begins to explore the

arena around it or the bridge next to it (in our case, for 24h). We used agar 1% to create a circular (Figure 3 a) and b)) or bridge-shaped (Figure 3 c), d) and e)) environment. In the experiment illustrated in Figure 3 c), we put a square of agar mixed with blended oat flakes at the opposite of the agar bridge to attract *P. polycephalum*. In the experiment illustrated in Figure 3 e), the bridge itself contains blended oat flakes 5%.

Appendix 2 - table 1: Cellects' settings to analyze the five conditions

Setting	a	b	c	d	e
Images prefix	IM	IM	IM	IM	IM
Images extension	.jpg	.jpg	.jpg	.jpg	.jpg
Sample size	100	92	60	80	104
Scale with	Cell width	Image width	Image width	Image width	Cell width
Scale size	15 mm	700 mm	700 mm	700 mm	5 mm
Cropping	Checked	Checked	Checked	Checked	Checked
Subtract background	Unchecked	Unchecked	Unchecked	Checked	Unchecked
Ring correction	Checked	Checked	Unchecked	Checked	Unchecked
Connect distant shapes	Dist: 2; min: 30; max: 300	Unchecked	Unchecked	Dist: 1, min: 30; max; 300	Unchecked
Arena shape	Circle	Rectangle	Rectangle	Circle	Rectangle
Spot shape	Circle	Rectangle	Circle	Circle	Rectangle
Select and draw	Lower background	Background	Background	Background	Background and 3 cells
1st image color space	lab(0,0,1), luv(0,0,1)	hls(0,0,1) Or lab(0,1,0)	luv(0,01)	lab(0,0,1), yuv(0,2,0)	lab(2,0,0), bgr(1,0,0)
Starting != growing	Checked	Checked	Unchecked	Checked	Unchecked

Video color space	lab(0,0,1), luv(0,0,1)	lab(0,0,1)	luv(0,01)	yuv(0,1,1)	lab(0,0,2), luv(0,0,1)
Max growth rate	0,1	0,05	0,05	0,1	0,01
Smoothin	2	1	1	1	1
Detection option	Threshold	Frame	T or S	Frame	Slope
Fading	Unchecked	0	-0,2	-0,3	-0,35

Procedure and results of a second analysis:

The save one result option allows the user to redo the analysis for defective arenas. For clarity, we did not present these results in the main document. However, a second analysis on the same data improved the accuracy of 8 arenas in c and 2 arenas in d. In particular, we improved the accuracy of experiment c by using Frame detection and no fading on arenas 31 to 38, and of experiment d by using Threshold detection on arena 9 and by using T or S detection, twice smoothings and no fading on arena 45. By doing so, we increased Cellects overall accuracy from 98.63% to 99.12% in the third (Figure 3c) condition and from 97.80% to 98.30% in the fourth (Figure 3d) condition.

Data availability

The data and the code to replicate the analyses can be found at: https://datadryad.org/stash/share/nCvWIZoZ8-Wnxm0CjnPbbznUPw90RYdo1YVJEQkfLIY.

In addition, this repository contains an executable and a zip file to install Cellects on windows and a python wheel file to install it on macOs or Linux. The github repository of Cellects, available at https://github.com/Aurele-B/Cellects, contains its source code and a complete user manual, at: https://github.com/Aurele-B/Cellects/blob/main/UserManual.md

Boussard, Aurèle; Arrufat, Patrick; Dussutour, Audrey; Pérez-Escudero, Alfonso (2023). Cellects, a software to quantify cell expansion and motion [Software]. Zenodo. https://doi.org/10.5281/zenodo.8184830

Boussard, Aurèle; Arrufat, Patrick; Dussutour, Audrey; Pérez-Escudero, Alfonso (2023). Cellects, a software to quantify cell expansion and motion [Dataset]. Dryad. https://doi.org/10.5061/dryad.7wm37pvzp

Article and author information

Author details

Aurèle Boussard

Research Centre on Animal Cognition (CRCA), Centre for Integrative Biology (CBI-CNRS), Toulouse, France

Contribution: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Ressources, Data curation, Writing – original draft preparation, Writing – review & editing, Visualization, Project administration

For correspondence: aurele.boussard@gmail.com

Competing interests: No competing interests declared

0000-0002-6083-4272

Patrick Arrufat

Research Centre on Animal Cognition (CRCA), Centre for Integrative Biology (CBI-CNRS), Toulouse, France

Contribution: Conceptualization, Methodology, Resources, Supervision

Competing interests: No competing interests declared

0000-0002-2073-3725

Audrey Dussutour

Research Centre on Animal Cognition (CRCA), Centre for Integrative Biology (CBI-CNRS), Toulouse, France

Contribution: Conceptualization, Investigation, Resources, Supervision, Funding acquisition

For correspondence: aurele.boussard@gmail.com

Competing interests: No competing interests declared

0000-0002-1377-3550

Alfonso Pérez-Escudero

Research Centre on Animal Cognition (CRCA), Centre for Integrative Biology (CBI-CNRS), Toulouse, France

Contribution: Conceptualization, Ressources, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition

For correspondence: aurele.boussard@gmail.com

Competing interests: No competing interests declared

0000-0002-4782-6139

Funding

A.B. was supported by a grant from the 'Agence Nationale de la recherche' (ANR), reference no. ANR-17-CE02- 0019-01-SMARTCELL (PI A.D.). A.D. acknowledges support by the CNRS. APE acknowledges support from a CNRS Momentum grant and an ANR JCJC grant (ANR-22-CE02-0002, ForAnInstant).
The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Acknowledgements

We thank Audrey Bizet for her work on the experiment of Figure 4a, Charlotte Dupont and Paul-Antoine Badon for the experiment of Figure 4b, Nirosha Murugan for her help with the experiment of Figure 4d, Ana Lucía Morán Hernández for her help with the experiment of Figure 4e, and Florent Le Moël and Remi Giorno dit Journo for their help during software development.

Copyright

© 2023, Boussard et al.
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Discussion

Discussion

Apports de la thèse

Physarum polycephalum est un organisme unicellulaire géant capable d'ajuster ses déplacements en fonction de la lumière (Häder & Schreckenbach 1984; Marwan 2001), la température (Wolf et al. 1997), la gravité (Block et al. 1986), ou encore, de nombreux stimuli chimiques (Ueda et al. 1975; Durham & Ridgway 1976). Au cours de cette thèse, nous avons développé de nouvelles méthodes de quantification de ces ajustements et avons mis en lumière de nouvelles conditions de mémorisation de l'habituation à un stimulus chimique.

Le chapitre 1 illustre la façon avec laquelle *P. polycephalum* ajuste ses comportements en fonction de stimuli chimiques. Ces expériences consistaient à comparer une situation où *P. polycephalum* était directement en contact avec un stimulus chimique avec une situation où il devait percevoir ce stimulus à distance. Lorsque le stimulus était éloigné, il pouvait le détecter pour s'en éloigner (substrat aversif) ou s'en rapprocher (substrat nutritif) par chimiotaxie. Alors que cette capacité agissait sur sa direction, elle ne modifiait ni ses autres caractéristiques de déplacement ni sa morphologie. En fait, la chimiotaxie à elle seule ne changeait que très peu les comportements mesurés. A l'inverse, lorsqu'il se déplaçait directement sur un substrat nutritif ou aversif, sa morphologie et certaines caractéristiques de son déplacement changeaient. Quand le substrat était nutritif, il se déplaçait lentement et de manière isotrope -i.e. couvrant le plus de surface possible avec des fronts de migration formant de larges arcs de cercles. En revanche, quand le substrat était aversif, il déployait lentement des pseudopodes fins tout en réalisant des va-et-vient lui permettant d'augmenter l'épaisseur de la couche de mucus le séparant du substrat. *P. polycephalum* ajuste ses comportements en fonction des stimuli chimiques qu'il rencontre et de la façon avec laquelle ils sont répartis dans l'espace. Au cours de cette thèse, nous avons testé l'effet de 14 substances chimiques

supplémentaires et avons systématiquement trouvé une dose permettant d'induire un changement comportemental. Cet organisme est capable de détecter des molécules très variées et pourrait même trahir leur nature à travers ses comportements.

Le chapitre 2 s'intéresse à des conditions où *P. polycephalum* perd -tout ou partie de- son aversion envers une substance chimique. Lorsqu'il est exposé de manière prolongée à un substrat aversif, ses comportements peuvent changer. S'ils ressemblent de plus en plus aux comportements observés en condition contrôle, si cela est spécifique à ce substrat, et si l'aversion initiale peut être retrouvée, on parle d'habituation (Boisseau et al. 2016). Lorsque réalisé avec du sel, cette forme simple d'apprentissage peut être transmise d'un individu entraîné à un individu naïf, par fusion du cytoplasme (Vogel & Dussutour 2016). Cette possibilité de transmission nous a mené à penser que quelque chose dans le cytoplasme des individus habitués devait contenir la mémoire de cette habituation. En premier lieu, nous avons découvert que les plasmodes pouvaient s'habituer au sel en étant en contact simultané avec la nourriture et le sel. Pour la première fois, nous avons ajouté à la quantification manuelle de l'habituation, une quantification automatique réalisée par un logiciel informatique qui deviendra, quelques années plus tard, l'objet du chapitre 4. En second lieu, nous avons découvert que l'habituation était conservée lors d'une phase de dormance appelée sclérote. Même après plusieurs mois, *P. polycephalum* restait habitué au sel. Le passage par la phase sclérote ne suffisait donc pas à altérer cette mémoire. Le sel est constitué d'ions sodium et chlorure qui ne peuvent pas être totalement éliminés de l'intérieur de la cellule au cours du processus de sclérotisation (de la phase plasmode à la phase sclérote). Ces résultats concordent avec l'idée que le sel puisse être le support de la mémoire de l'habituation au sel. Alors, nous avons testé si les plasmodes et les sclérotes habitués contenaient plus de sel et si une simple injection de sel suffisait à produire le phénomène d'habituation. D'une part, les analyses de ces expériences ont bien montré une corrélation positive entre l'habituation et la concentration intracytoplasmique en sodium. D'autre part, il suffisait en effet de déposer une goutte d'eau salée pour provoquer un comportement typique de l'habituation chez

P. polycephalum. Puisque le sodium se trouve dans la cellule après habituation et que son injection agit sur le comportement comme le ferait l'habituation, il semble y avoir un lien fort entre la concentration intracytoplasmique en sodium et l'habituation au sel. Ce lien ne nous a pas permis d'élucider l'entièreté du mécanisme permettant l'habituation mais a apporté des informations fascinantes sur cette capacité. Pour résumer, ce mécanisme permet à *P. polycephalum* de conserver une forme de mémoire pendant de très longues périodes de dormance et peut être déclenché en quelques heures, par une simple injection topique.

Le chapitre 3 fait état des phénomènes oscillatoires de *P. polycephalum* et établit les rôles potentiels de ces phénomènes sur ses capacités d'apprentissage. Cet être unicellulaire génère deux phénomènes oscillatoires principaux: le premier permet à tous ses noyaux de se diviser toutes les 8 heures de façon synchrone, le second provoque un mouvement oscillatoire de son cytoplasme. Comme ces oscillations cytoplasmiques sont à l'origine de la majorité des variations morphologiques et motrices de *P. polycephalum,* elles jouent un rôle dans la mise en place des changements comportementaux ayant lieu au cours de l'habituation. Pour étudier une capacité comme l'habituation, on peut s'employer à comprendre comment les stimuli sont détectés, comment cette information est traitée, ou encore comment les comportements sont exécutés. Comme précisé plus haut, les phénomènes oscillatoires ont un rôle bien établi dans la façon avec laquelle les comportements sont exécutés. Mais nous faisons aussi l'hypothèse que ces oscillations pourraient agir sur les capacités qu'a *P. polycephalum* à détecter et à traiter les stimuli. En effet, un stimulus peut être codé par la modification d'une oscillation. Cette modification peut être un ajustement en fréquence, en amplitude ou en phase d'un ou plusieurs oscillateurs cytoplasmiques, par exemple : des molécules cytoplasmiques dont la concentration varie en oscillant. Ensuite, le traitement du stimulus peut se faire à travers le couplage de certains de ces oscillateurs. En fait, d'après Bechtel & Abrahamsen (2012), la plupart des mécanismes biologiques peuvent être pensés comme des réseaux comprenant des oscillateurs plus ou moins couplés entre eux. Ce couplage, et les interactions entre molécules cytoplasmiques, forme un réseau biochimique qui a le potentiel de

réaliser certaines des tâches réalisées par les réseaux de neurones et la plasticité synaptique. Nous avons donc des raisons de penser que des formes d'apprentissage très variées existent, même chez des organismes unicellulaires comme *P. polycephalum*.

Le chapitre 4 complète cette thèse avec un logiciel d'analyse automatique de la forme, des mouvements et des comportements oscillatoires de *P. polycephalum*. Ce chapitre présente Cellects, un logiciel libre et ouvert permettant d'améliorer la précision de nos analyses comportementales, d'en diminuer les biais, et de quantifier des comportement que l'œil humain a du mal à observer. C'est le cas notamment des oscillations cytoplasmiques évoquées au chapitre 3. En effet, cet outil devrait permettre de mieux décrire la façon avec laquelle les dynamiques oscillatoires changent la morphologie et le déplacement du plasmode au cours d'une expérience d'habituation. De plus et d'un point de vue plus général, il devrait permettre de mieux comprendre le répertoire comportemental de tous les organismes que l'on peut filmer sur une surface plate et immobile. C'est le cas des Myxomycètes mais aussi des colonies de bactéries ou de champignons. En résumé, cet outil permet de quantifier facilement les comportements de ces organismes dans des conditions aussi variées que possible.

L'habituation, une capacité plastique

On dit d'une capacité qu'elle est plastique quand elle permet à l'organisme qui l'utilise d'ajuster ses comportements à davantage de variations environnementales. Dans quelle mesure, l'habituation chez *P. polycephalum*, est une capacité plastique ? Une façon de répondre à cette question consiste à tester sa capacité d'habituation dans des environnements olfactifs plus complexes. Selon notre définition de l'habituation, cette capacité permet d'ajuster un comportement lors d'une exposition répétée à un stimulus, tout en restant sensible à d'autres stimuli. Cette dernière caractéristique s'appelle la spécificité de l'habituation, elle a été démontrée par Boisseau et al. 2016. Nous nous sommes demandés si cette spécificité était toujours vraie avec deux substances très semblables. Ainsi, nous

avons voulu comparer l'habituation au NaCl avec des habituations au KCl, au NaNO3 et au KNO3. Ces expériences n'ont pas donné de réponse à cette question puisque *P. polycephalum* ne s'habituait pas aux trois nouvelles substances aussi clairement qu'avec le NaCl. D'autres substances, peut-être plus proches de la composition chimique d'un sol de forêt, seraient mieux adaptées à cet organisme et permettraient de répondre à cette question. C'est le cas du sel (NaCl) et c'est ce stimulus que nous avons choisi d'utiliser dans la plupart des expériences réalisées lors de cette thèse. C'est d'ailleurs avec ce stimulus que nous avons continué à étudier la plasticité de l'habituation chez *P. polycephalum*.

Certaines de nos expériences non publiées montrent une variation dans la capacité qu'a *P. polycephalum* à s'habituer au sel. Lors de travaux précédents, notre équipe de recherche est parvenue à obtenir une habituation en faisant traverser des ponts (de 1 cm de côté) à des plasmodes circulaires de 1,5 cm de diamètre et, au cours de cette thèse, en mélangeant la substance aversive avec le substrat nutritif dans des arènes de 14,5cm de diamètre. Dans une autre expérience, nous avons essayé un dispositif intermédiaire dans lequel des plasmodes (en demi-cercle de 14,5 cm de diamètre) devaient traverser des ponts salés de 1 à 2 cm de largeur et de 14,5 cm de longueur pour atteindre un autre demi-cercle (de 14,5 cm de diamètre) contenant de la nourriture. Cette manière d'entraîner les plasmodes les mettait en contact avec une plus petite quantité de sel et n'a pas permis de les y habituer. Le rapport entre la taille du plasmode et la quantité de NaCl serait déterminant pour pouvoir observer de l'habituation. Dans ces expériences, la quantité de sel était insuffisante pour observer de l'habituation mais nous avons tout de même observé de l'aversion au sel. Nous pensons qu'il y a un seuil à partir duquel nous pouvons observer de l'aversion et un seuil à partir duquel nous pouvons observer de l'habituation. Ces expériences non publiées nous indiquent que, à taille de plasmode égale, le seuil (en quantité de sel) pour l'habituation doit être plus élevé que le seuil pour l'aversion. Chez les animaux, le nombre de neurones olfactifs conditionne la concentration minimale à partir de laquelle une substance olfactive est détectée. Ce nombre de neurones explique, par exemple, la différence d'efficacité entre les chiens et les humains pour suivre une piste olfactive : plus il a de neurones olfactifs,

plus l'animal est performant. *P. polycephalum* n'a pas de neurones olfactifs mais il possède des structures membranaires lui permettant de détecter le sel. En fait, s'il l'on connaissait tous les moyens qu'il a pour détecter le NaCl, on pourrait étudier et même prédire son seuil de détection pour cette substance. Les ions chlorures et sodiums composants le sel sont détectés et transportés à travers la membrane plasmique via des complexes protéiques appelés canaux. Théoriquement, il existe une grande variété de canaux pouvant transporter ou échanger ces ions. Seulement deux d'entre eux ont été identifiés chez *P. polycephalum* : l'échangeur Na+ / Ca2+ et la pompe Na+ / K+ ATPase (Schaap et al 2015). L'utilisation des bloqueurs de ces canaux (respectivement la SEA0400 et l'Ouabaïne) permettrait, dans un premier temps, de confirmer leur potentiel rôle dans la chimiotaxie et dans l'habituation. Ensuite, certaines méthodes d'électrophysiologie permettraient d'en découvrir d'autres et d'en connaître la densité membranaire. Si l'on connaissait tous ces canaux et leur densité membranaire, nous pourrions construire un modèle prédictif de l'aversion au sel chez *P. polycephalum*. Nous pourrions, par exemple, prédire les valeurs seuils évoquées plus haut et les comparer avec des expériences permettant de les obtenir. Ainsi, nous aurions une représentation plus complète d'une partie du mécanisme de l'habituation chez *P. polycephalum*: celle qui lui permet la détection du stimulus aversif et son ajustement. Observer un ajustement de la façon avec laquelle il détecte le sel au cours d'une habituation permettrait d'expliquer une partie de cette plasticité comportementale.

Existence, mécanisme, et fonction de l'habituation

Les résultats de cette thèse et les nouveaux axes de recherche que nous proposons s'inscrivent dans la recherche en éthologie, le domaine d'étude des comportements. Cette recherche se fait selon trois approches complémentaires : la phénoménologie, l'étude des causes proximales et l'étude des causes ultimes. La phénoménologie consiste à démontrer l'existence d'un comportement, l'étude des causes proximales recherche le mécanisme développemental ou effectif à l'origine du comportement, et l'étude des causes ultimes recherche la fonction et l'évolution

du comportement. Nous aborderons chacune de ces approches, appliquées à l'habituation chez *P. polycephalum*, dans les paragraphes suivants.

A travers le développement d'un logiciel d'analyse automatique, le dernier chapitre de cette thèse ouvre une fenêtre sur la complexité du répertoire comportemental de *P. polycephalum* (et d'autres organismes similaires). Cependant, être capable de quantifier précisément toutes les métriques rendues disponibles par ce logiciel ne suffit pas à mieux comprendre ses formes d'intelligence. Pour cela, il faut commencer par identifier et prouver l'existence d'une capacité considérée comme intelligente. Dans le chapitre 2, nous avons montré que *P. polycephalum* pouvait conserver la mémoire de l'habituation au sel à travers le passage par une phase de dormance. Ce faisant, nous avons démontré l'existence d'une nouvelle capacité chez cet organisme. Avant cette thèse, Boisseau et al. (2016) ont démontré l'existence de l'habituation chez *P. polycephalum* selon trois critères. Ils parlaient d'habituation parce qu'ils ont observé une diminution de la réponse comportementale face à un stimulus aversif, que cette diminution était spécifique à ce stimulus, et qu'elle était réversible. Ces critères sont les plus importants mais les chercheurs à l'avoir étudié (à l'origine, chez des organismes neuraux) en ont défini sept autres (Rankin et al. 2009). Étudier ces autres critères chez *P. polycephalum* nous renseignerait sur les différences potentielles entre cet organisme et ceux pour lesquels la définition la plus complète de l'habituation a été énoncée originellement. Hormis le premier critère qui est la diminution de la réponse aversive elle-même, ces critères peuvent être vus comme des fonctions supplémentaires ajoutées à la capacité de base. Au-delà de répondre d'une définition plus stricte, la présence ou l'absence de ces fonctions apporte des pistes pour étudier les causes mécanistiques, développementales et évolutives de cette capacité cognitive. Selon Dussutour (2021), l'habituation "stricte" pourrait avoir évoluée à partir d'autres formes moins strictes comme l'adaptation ou la fatigue sensorielle, la tolérance ou la réponse au stress. Alors que ces potentiels états ancestraux à l'habituation sont facilement attribués à des organismes aneuraux, le terme d'habituation est généralement réservé aux organismes neuraux. Une description du mécanisme explicatif de l'habituation chez un organisme comme *P.*

polycephalum nous offrirait le moyen de le comparer avec celui de l'habituation chez un organisme neural comme l'aplysie (Glanzman 2009). Cette différence mécanistique serait peut-être liée à une différence fonctionnelle. En particulier, si le mécanisme le plus simple implique une plasticité réduite de la capacité d'habituation, on s'attend à ce que l'habituation chez les organismes aneuraux remplisse moins de fonctions que l'habituation chez des organismes neuraux.

La recherche d'une explication mécanistique des comportements s'intéresse à la façon avec laquelle les interactions entre les composants internes d'un organisme conditionnent les interactions à une échelle supérieure, celles entre l'organisme et son environnement. La stratégie de laboratoire consiste à simplifier l'environnement à l'extrême pour identifier ces interactions internes. C'est une approche classique pour compléter la compréhension d'un phénomène, c'est encore le cas, par exemple, du comportement chimiotactique des bactéries (Karmakar, 2021), ou de certains résultats de cette thèse. D'une part, dans le chapitre 2, nous avons démontré un lien fort entre la concentration intracellulaire en sel et l'habituation au sel chez *P. polycephalum*. D'autre part, nous avons vu plus haut que la quantité de sel dans l'environnement devait être déterminante pour déclencher les comportements d'aversion et d'habituation. C'est en accumulant ce type de résultat et en poursuivant les pistes de recherche évoquées plus haut que l'on pourra compléter notre compréhension du mécanisme à l'origine de l'habituation chez *P. polycephalum*.

Comprendre une capacité ne se résume pas à comprendre son mécanisme, on peut aussi s'intéresser à la raison pour laquelle cette capacité perdure : quelle fonction cette capacité remplit-elle pour l'organisme qui l'utilise ? Pour répondre à cette question, il faut étudier son utilité dans un environnement naturel. En biologie évolutive, cette utilité peut être quantifiée par une mesure comme celle de l'aptitude phénotypique. Pour réaliser cette mesure, il faut d'abord pouvoir quantifier l'utilisation de cette capacité à l'échelle d'une population naturelle. La taille (d'une dizaine de micromètres à plusieurs mètres carrés) et la durée de vie (d'un instant après sa naissance à presque un siècle et potentiellement davantage en laboratoire) des Myxomycètes sont extrêmement variables. Il faudrait aussi pouvoir identifier

les individus et les espèces de Myxomycètes présentes dans l'environnement étudié. Or, ces organismes sont capables de se séparer mais aussi de fusionner avec des individus génétiquement différents ou encore de se reproduire avec des espèces (censées être) différentes. Les notions bien définies que nous avons de l'individu et de l'espèce n'ont pas le même sens avec les Myxomycètes: elles sont plus dynamiques. Tous ces éléments apportent une complexité qui n'existe pas chez les animaux et qu'il nous faudrait étudier pour comprendre pourquoi une capacité comme l'habituation a évolué chez cet être unicellulaire. Bien que représentant un avantage évolutif évident, la capacité à apprendre peut impliquer un coût évolutif trop important en l'absence de système nerveux. Même si l'apparition de cette capacité pourrait apporter un meilleur succès reproducteur à un moment donné dans un environnement donné, sa persistance à l'échelle des temps évolutifs pourrait être compromise par son coût développemental et de maintenance (pour une introduction sur les coûts et limites à la plasticité phénotypique, voir DeWitt et al. 1998). En d'autres mots, si la plasticité apportée par une capacité d'apprentissage apporte moins d'avantages que de coûts évolutifs, elle devrait être contre-sélectionnée et disparaître.

Des systèmes complexes imbriqués à l'origine des capacités cognitives

La complexité se retrouve à toutes les échelles du vivant. La façon avec laquelle un individu interagit avec son environnement nous renseigne sur la fonction de ses capacités et la façon avec laquelle ses composants internes interagissent nous renseignent sur leur mise en place. Selon le type d'organisme que l'on étudie, les types d'apprentissage sont multiples (Zentall et al. 2008) et leurs mécanismes ne sont que rarement identifiables dans leur entièreté. Cela est vrai pour une fonction exécutée à l'échelle de la cellule entière (e.g. l'habituation) mais cela est aussi vrai à l'échelle des composants internes à la cellule. Par exemple, certains éléments composant un mécanisme à l'origine de la capacité à s'habituer peuvent exister sous différentes formes. C'est le cas des systèmes oscillatoires évoqués dans le Chapitre 3. Chacun d'entre eux pourrait avoir un rôle plus ou moins

déterminant dans la mise en place de la fonction d'habituation. A chaque fois que l'on ajoute un niveau d'étude, ce type de multiplicité s'ajoute à la complexité de la fonction que l'on cherche à étudier.

On peut voir chacun de ces niveaux comme autant de systèmes auto-organisés desquels émergent les propriétés du niveau supérieur. Selon Palacios et al. (2020), un ensemble de cellules formant un organisme pluricellulaire peut être considéré comme une couverture de Markov. Une couverture de Markov est un réseau d'interaction délimité par une barrière (à travers laquelle les interactions sont moins fortes qu'à l'intérieur de chaque cellule). Ce point de vue rejoint l'autopoïèse telle que définie par Varela et al. (1974). Le vivant serait un ensemble de systèmes complexes auto-organisés et imbriqués de telle sorte qu'ils constituent un autre système à l'échelle supérieure. Ainsi, on peut décrire un plasmode de *P. polycephalum* comme un ensemble de noyaux auto-organisés (Gerber et al. 2021), un cerveau comme un ensemble de neurones et de cellules gliales, ou encore une société comme un ensemble d'animaux dont certaines capacités émergent de leurs interactions. En représentant ces systèmes dans leur complexité, on peut les comprendre et même les comparer. Leur compréhension permet la découverte des structures nécessaires à une capacité et leur comparaison à d'autres systèmes nous renseigne sur le niveau de généralisation de cette capacité. Comme l'habituation existe chez des systèmes très différents, à quel point cette capacité est-elle universelle dans le vivant? Quelles en sont ses variations?

Cognition unicellulaire et cognition neurale

Le mécanisme par lequel un organisme s'habitue est limité par les systèmes qui le constituent. Nous avons vu dans le chapitre 3 que les oscillations pouvaient avoir un rôle à jouer dans ce mécanisme. Ces dynamiques oscillatoires ont en commun avec tout processus biologique de reposer sur des interactions biochimiques et c'est aussi le cas de l'habituation. Les interactions biochimiques à l'origine de cette capacité pourraient avoir lieu au sein de son cytosquelette, des dynamiques de réaction-diffusion de son cytoplasme, de l'expression génétique ou

de la régulation épigénétique de celle-ci (Ginsburg & Jablonka, 2009 ; Baluska & Levin, 2016). Chacun de ces systèmes a un potentiel computationnel que nous allons tenter de comparer avec celui du système nerveux des animaux.

Dans un système nerveux, les processus d'apprentissage non associatifs comme l'habituation ou la sensibilisation peuvent avoir lieu au sein d'une synapse: le lieu de connexion des neurones. Précisément, les synapses peuvent renforcer ou amoindrir leur connectivité suite à une exposition répétée à un même stimulus. Comme une seule synapse peut être influencée par plusieurs entrées neuronales, plusieurs neurones peuvent agir et réguler l'habituation ou la sensibilisation. De plus, dans un système nerveux, les synapses sont très nombreuses et les axones qui les atteignent peuvent être très longs. Ces caractéristiques confèrent au système nerveux une utilisation spécifique, rapide et ciblée de capacités comme l'apprentissage (Ginsburg & Jablonka, 2021). Seulement, les fonctions du système nerveux ne se limitent pas à la capacité à apprendre, celui-ci permet notamment la précision et la vitesse de transport d'un signal d'une région très ciblée à une autre. Par exemple, le caractère ciblé et précis du signal nerveux est à l'origine de la coordination entre la détection d'une proie (ou d'un prédateur) et le mouvement vers celle-ci (ou à l'opposé de celui-ci). D'ailleurs, la vitesse de ce type de coordination semble avoir été maximisée au cours de l'histoire évolutive des premiers animaux (Wan & Jékely 2021). L'élément le plus important d'une capacité d'apprentissage n'est pas sa vitesse mais sa plasticité. A la plasticité apportée par l'organisation en réseau des neurones du cerveau s'ajoute la plasticité offerte par les interactions biochimiques, électriques et vésiculaires ayant lieu au sein de chaque synapse. Nous pouvons donc nous attendre à ce que l'apprentissage chez un être unicellulaire soit contraint par l'absence de tous ces avantages du système nerveux. On s'attend à ce que ces limitations structurelles soient à l'origine d'une limitation de la plasticité de cette capacité et c'est ce que nous avons observé au cours de cette thèse. Continuer ces recherches et les étendre à d'autres organismes permettrait d'identifier les structures et les mécanismes clés qui agissent sur la plasticité comportementale et l'apprentissage.

L'être humain semble posséder des structures et des atouts qu'un organisme unicellulaire comme *P. polycephalum* ne possède pas, et pourtant ce dernier nous inspire. Cet organisme est capable de distinguer des variations fines de concentration lorsqu'il est soumis à des choix (Dussutour et al. 2010; Reid et al. 2016) ou de mesurer des différences de concentration simultanément dans l'espace. Pour ce faire, il n'a pas besoin d'échantillonner l'espace en déplaçant un unique organe olfactif comme le ferait un animal. Ses récepteurs sont répartis sur l'ensemble de sa membrane, qu'elle mesure 1 mm² ou 10 m². En plus de pouvoir détecter et comparer différentes sources olfactives, *P. polycephalum* peut exploiter différentes sources de nourriture simultanément. Lorsqu'il explore son environnement, le plasmode peut relier les différentes sources de nourriture entre elles et les exploiter (Nakagaki et al. 2004). Dans cette situation, son système circulatoire intracytoplasmique est bien visible, il forme un réseau de larges tubes reliant les différentes sources de nourriture. En 2010, Tero et al. ont étudié le réseau qu'un plasmode développait lorsqu'il exploite des sources de nourritures disposées dans une configuration particulière : celle des stations du réseau ferroviaire de Tokyo. Ils ont découvert que les caractéristiques du réseau ainsi créé était similaire au réseau tel qu'il a été construit. Ils ont créé un modèle mathématique, inspiré des réseaux de *P. polycephalum*, permettant de concevoir des réseaux auto-organisés, applicables aux télécommunications pour améliorer l'efficacité de transport tout en minimisant les coûts (via le nombre de connexions) et les pannes (via l'effet de la perte d'une connexion sur l'efficacité de transport). Depuis ces travaux, ces réseaux vivants continuent à inspirer les algorithmes utilisés pour optimiser les réseaux humains (Zhang et al. 2016).

En plus de nous inspirer, les Myxomycètes possèdent des caractéristiques très différentes des nôtres. D'abord, ils n'ont pas la même place au sein d'un réseau trophique, l'un est détritivore et l'autre est omnivore. Ensuite, compte tenu de l'âge de leur potentiel ancêtre commun, environ 1 milliard d'années, ils ont une histoire évolutive très différente. Selon Ersnt Haeckel, "l'ontogenèse résume la phylogénèse". En d'autres mots, les étapes de développement des organismes permettent souvent de déduire leur distance phylogénétique. Cela signifie que les

étapes les plus précoces du développement peuvent être similaires pour des organismes très éloignés. Cela fonctionne très bien pour comparer des animaux entre eux mais beaucoup moins bien pour comparer des organismes aussi éloignés que les humains et les Myxomycètes. De fait, leur développement et même leur cycle de vie sont très différents. On peut s'en rendre compte en utilisant la complexité comme moyen de comparaison. Définissons la complexité comme étant la somme des interactions entre les composants d'un système. Si l'on observe la Figure 3 de l'introduction de cette thèse, on se rends immédiatement compte que *P. polycephalum* a un cycle de vie plus complexe que celui d'*Homo sapiens* (qui ne comprend qu'un stade diploïde capable de produire des gamètes haploïdes). En revanche, le développement d'un ovule fécondé à un être humain adulte est plus complexe que le développement d'un plasmode de *P. polycephalum*, dont la plupart des composants se forment très rapidement. Ces organismes ont emprunté des chemins évolutifs très différents, leur permettant d'occuper des niches écologiques différentes et de coexister dans un système complexe d'interdépendance : la biosphère. Survivre et prospérer dans un tel système nécessite d'employer une stratégie. La stratégie des Myxomycètes n'a plus à faire ses preuves puisqu'elle ne semble pas avoir changé depuis des centaines de millions d'années. En revanche, certaines caractéristiques de la stratégie des êtres humains ne sont apparues que très récemment et s'accompagnent de nombreuses incertitudes quant à la capacité de cette espèce à survivre et à prospérer.

Prenons par exemple la capacité humaine à l'origine de toute l'accumulation de savoir dont témoignent les civilisations : l'apprentissage social. La majorité des constructions, des savoirs et des systèmes de fonctionnements que nous réalisons, utilisons et étudions n'existeraient pas si l'on ne pouvait apprendre qu'individuellement (Henrich & McElreath 2003). Cette émergence est tellement développée chez l'être humain que la seule description de structure ou d'activité neuronale n'est pas suffisante pour en expliquer les conséquences prodigieuses. Elle nécessite, en plus de caractéristiques morphologiques, un ensemble de capacités cognitives (comme le langage) et de mécanismes d'hérédité culturelle. Aujourd'hui, une des conséquences de cette émergence est la sixième extinction de

masse de la planète Terre. Cette émergence, aussi formidable soit-elle, risque de nous guider dans un piège écologique menant à notre extinction. L'espèce humaine présente aussi une émergence qui pourrait offrir le moyen d'éviter ce piège écologique. Au même titre que l'apprentissage social, l'expérience humaine de la conscience peut être vue comme une émergence. Ce phénomène est si mal compris que les chercheurs qui s'y intéressent lui accordent un "hard problem" : le problème difficile de la conscience (Chalmers 1995). Il s'agit de la recherche d'une explication de la part subjective des états mentaux. D'autres chercheurs (en cognition aneurale, voir Baluska & Levin (2016)), généralement neuroscientifiques, pensent que ce problème se réduira à mesure que l'on comprendra le fonctionnement du cerveau, jusqu'à disparition de celui-ci. Quelle que soit la solution de ce "hard problem", toutes les définitions de la conscience s'accordent sur le fait qu'elle apporte la possibilité d'avoir un regard soi, une réflexion sur son passé et sur son futur. Là où l'évolution est un processus aveugle, la conscience procure une vision. La conscience a donc le potentiel de réaliser ce que l'évolution n'a pas pu faire: permettre à une espèce de choisir une stratégie et de façonner elle-même son chemin évolutif.

Conclusion

Les êtres vivants, même les plus simples, ont un répertoire comportemental complexe. Cette thèse a été l'occasion de créer un outil pour quantifier une partie de cette complexité et de mieux comprendre la capacité d'habituation de *P. polycephalum*. En particulier, nous avons remis en question la temporalité de l'habituation telle qu'elle était décrite par Boisseau et al. (2016) et Vogel et al. (2016). Premièrement, les plasmodes n'ont pas besoin d'alterner entre un substrat nutritif et un substrat aversif pour s'habituer à ce dernier, l'exposition simultanée à ces substrats fonctionne aussi. Deuxièmement, l'habituation au sel peut être conservée plusieurs mois si les plasmodes deviennent des sclérotes juste après avoir été habitués. Troisièmement, le comportement typique de l'habituation, une diminution de la réponse aversive, peut être obtenu après une simple injection

topique de la substance aversive. Quatrièmement, l'habituation au sel semble s'expliquer en grande partie d'une manière très simple : si la cellule contient du sel, elle y est habituée. La simplicité de cette explication ne peut toutefois pas réduire la complexité réelle de cette cellule et de l'environnement dans lequel elle évolue, il reste encore beaucoup à découvrir sur cette capacité.

Le concept d'apprentissage est utilisé dans de nombreux domaines et des systèmes très variés parviennent à en faire preuve. De ce fait, nous pensons que ce concept doit avoir une définition qui englobe cette pluralité. Utiliser une telle définition ne signifie pas nier une différence évidente entre les capacités d'apprentissage humaines et celles de *P. polycephalum*. Au contraire, c'est un moyen de faire communiquer des domaines scientifiques parfois très différents mais qui ont beaucoup à gagner à adopter une approche intégrative. Les études portant sur la capacité à apprendre chez des organismes aneuraux sont récentes, discutées et rares. Le fait qu'elles soient récentes peut peut-être s'expliquer par l'aspect sociologique des "révolutions scientifiques" (Kuhn 1940). Il se peut que le développement d'un programme de recherche étudiant les capacités d'apprentissage des organismes aneuraux n'ai pu avoir lieu que dans le contexte scientifique actuel. Ce domaine étant émergent, la discussion de ses résultats devrait éclaircir et affiner ses théories avant de parvenir à des consensus. Il s'agit de déterminer si la rareté de ces résultats provient de cette explication sociologique ou si elle provient d'une réelle rareté de ces capacités.

Bibliographie

Abrams, D. M. & Strogatz, S. H. 2004. Chimera states for coupled oscillators. Physical review letters, 93, 174102.

Adamatzky, A. 2007. Physarum machines: encapsulating reaction-diffusion to compute spanning tree. Naturwissenschaften, 94, 975–980.

Adamatzky, A. 2010a. Routing Physarum with repellents. The European Physical Journal E, 31, 403–410.

Adamatzky, A. 2010b. Physarum machines: computers from slime mould. World Scientific.

Adamatzky, A. 2012. Slime mold solves maze in one pass, assisted by gradient of chemo-attractants. IEEE transactions on nanobioscience, 11, 131–134.

Adamatzky, A. 2016. Advances in Physarum machines: Sensing and computing with slime mould. Springer.

Adamatzky, A. 2017. Thirty seven things to do with live slime mould. In: Advances in unconventional computing, pp. 709–738. Springer.

Adamatzky, A. & Jones, J. 2008. Towards Physarum robots: computing and manipulating on water surface. Journal of Bionic Engineering, 5, 348–357.

Adamatzky, A., Martinez, G. J., Chapa-Vergara, S. V., Asomoza-Palacio, R. & Stephens, C. R. 2011. Approximating Mexican highways with slime mould. Natural Computing, 10, 1195–1214.

Adler, J. 1966. Chemotaxis in bacteria. Science, 153, 708–716.

Aldrich, H. 1982. Cell biology of Physarum and Didymium V1: organisms, nucleus, and cell cycle. Elsevier.

Alim, K. 2018. Fluid flows shaping organism morphology. Phil. Trans. R. Soc. B, 373, 20170112.

Alim, K., Amselem, G., Peaudecerf, F., Brenner, M. P. & Pringle, A. 2013. Random network peristalsis in *Physarum polycephalum* organizes fluid flows across an individual. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110, 13306–11.

Alim, K., Andrew, N., Pringle, A. & Brenner, M. P. 2017. Mechanism of signal propagation in *Physarum polycephalum*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114, 5136–5141.

Alonso, S., Strachauer, U., Radszuweit, M., Bär, M. & Hauser, M. J. 2016. Oscillations and uniaxial mechanochemical waves in a model of an active poroelastic medium: Application to deformation patterns in protoplasmic droplets of *Physarum polycephalum*. Physica D: Nonlinear Phenomena, 318, 58–69.

Aman, A. & Piotrowski, T. 2010. Cell migration during morphogenesis. Developmental biology, 341, 20–33.

Anderson, J. M., Clegg, T. M., Véras, L. V. & Holland, K. N. 2017. Insight into shark magnetic field perception from empirical observations. Scientific reports, 7, 1–15.

Aon, M. A., Cortassa, S. & O'Rourke, B. 2008. Mitochondrial oscillations in physiology and pathophysiology. Cellular Oscillatory Mechanisms, 98–117.

Arata, Y. & Takagi, H. 2019. Quantitative studies for cell-division cycle control. Frontiers in physiology, 10, 1022.

Asgari, M. & Henney Jr, H. 1977. Inhibition of growth and cell wall morphogenesis of Bacillus subtilis by extracellular slime produced by Physarum flavicomum. Cytobios, 20, 163–177.

Avena-Koenigsberger, A., Misic, B. & Sporns, O. 2018. Communication dynamics in complex brain networks. Nature Reviews Neuroscience, 19, 17–33.

Avsievich, T., Frolov, S. & Proskurin, S. 2017. Interrelation between respiratory and contractile activity of *Physarum polycephalum*. Journal of Physics D: Applied Physics, 50, 224003.

Ball, P. 1999. The self-made tapestry: pattern formation in nature. Oxford University Press, Inc.

Baluška, F. & Levin, M. 2016. On having no head: cognition throughout biological systems. Frontiers in psychology, 7, 902.

Baluška, F. & Mancuso, S. 2021. Individuality, self and sociality of vascular plants. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376, 20190760.

Baluška, F., Mancuso, S., Volkmann, D. & Barlow, P. 2009. The "root-brain"hypothesis of Charles and Francis Darwin: revival after more than 125 years. Plant signaling & behavior, 4, 1121–1127.

Bär, J., Boumasmoud, M., Kouyos, R.D., Zinkernagel, A.S. & Vulin, C. (2020). Efficient microbial colony growth dynamics quantification with ColTapp, an automated image analysis application. Scientific reports, 10, 16084.

Barton, K. & Barton, M. K. 2015. Package “MuMIn.”Version, 1, 18.

Bates, D., Sarkar, D., Bates, M. D. & Matrix, L. 2007. The lme4 package. R package version, 2, 74.

Bäuerle, F. K., Karpitschka, S. & Alim, K. 2020. Living system adapts harmonics of peristaltic wave for cost-efficient optimization of pumping performance. Physical review letters, 124, 098102.

Baumgarten, W. & Hauser, M. J. 2013. Functional organization of the vascular network of *Physarum polycephalum*. Physical biology, 10, 026003.

Baumgarten, W. & Hauser, M. J. 2014. Dynamics of frontal extension of an amoeboid cell. EPL (Europhysics Letters), 108, 50010.

Bechtel, W. & Abrahamsen, A. A. 2013. Thinking dynamically about biological mechanisms: Networks of coupled oscillators. Foundations of Science, 18, 707–723.

Bechtel, W. & Bich, L. 2021. Grounding cognition: heterarchical control mechanisms in biology. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376, 20190751.

Behar, M. & Hoffmann, A. 2010. Understanding the temporal codes of intra-cellular signals. Current opinion in genetics & development, 20, 684–693.

Berryman, A. A. 1992. The origins and evolution of predator-prey theory. Ecology, 73, 1530–1535.

Bitbol, M. & Luisi, P. L. 2004. Autopoiesis with or without cognition: defining life at its edge. Journal of the Royal Society Interface, 1, 99–107.

Block, I., Briegleb, W., Sobick, V. & Wohlfarth-Bottermann, K. 1986. Confirmation of gravisensitivity in the slime mold *Physarum polycephalum* under near weightlessness. Advances in Space Research, 6, 143–150.

Block, I., Wolke, A. & Briegleb, W. 1994. Gravitational response of the slime mold Physarum. Advances in Space Research, 14, 21–34.

Blumwald, E. 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. Current opinion in cell biology, 12, 431–434.

Boisseau, R. P., Vogel, D. & Dussutour, A. 2016. Habituation in non-neural organisms: evidence from slime moulds. Proc. R. Soc. B, 283, 20160446.

Bonabeau, E., Dorigo, M. & Théraulaz, G. 1999. Swarm intelligence: from natural to artificial systems. Oxford university press.

Bonduriansky, R. 2012. Rethinking heredity, again. Trends in ecology & evolution, 27, 330–6.

Bornholdt, S. & Rohlf, T. 2000. Topological evolution of dynamical networks: Global criticality from local dynamics. Physical Review Letters, 84, 6114.

Bourgine, P. & Stewart, J. 2004. Autopoiesis and cognition. Artificial life, 10, 327–345.

Boussard, A., Delescluse, J., Pérez-Escudero, A. & Dussutour, A. 2019. Memory inception and preservation in slime moulds: the quest for a common mechanism. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 374, 20180368.

Boussard, A., Fessel, A., Oettmeier, C., Briard, L., Döbereiner, H. G., & Dussutour, A. (2021). Adaptive behaviour and learning in slime moulds: the role of oscillations. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376(1820), 20190757.

Bradski, G. 2000. The opencv library. Dr Dobb's J. Software Tools, 25, 120–125.

Brenner, E. D., Stahlberg, R., Mancuso, S., Vivanco, J., Baluska, F. & Van Volkenburgh, E. 2006. Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. Trends in plant science, 11, 413–419.

Briard, L., Goujarde, C., Bousquet, C. & Dussutour, A. 2020. Stress signalling in acellular slime moulds and its detection by conspecifics. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 375, 20190470.

Buzsaki, G. 2006. Rhythms of the Brain. Oxford university press.

Buzsáki, G., Logothetis, N. & Singer, W. 2013. Scaling brain size, keeping timing: evolutionary preservation of brain rhythms. Neuron, 80, 751–764.

Cabral, J., Hugues, E., Sporns, O. & Deco, G. 2011. Role of local network oscillations in resting-state functional connectivity. NeuroImage, 57, 130–9.

Calvo Garzón, P. & Keijzer, F. 2011. Plants: Adaptive behavior, root-brains, and minimal cognition. Adaptive Behavior, 19, 155–171.

Camazine, S., Deneubourg, J.-L., Franks, N. R., Sneyd, J., Theraula, G. & Bonabeau, E. 2020. Self-organization in biological systems. Princeton university press.

Carlile, M. 1970. Nutrition and chemotaxis in the myxomycete *Physarum polycephalum*: the effect of carbohydrates on the plasmodium. Microbiology, 63, 221–226.

Caudron, F. & Barral, Y. 2013. A super-assembly of Whi3 encodes memory of deceptive encounters by single cells during yeast courtship. Cell, 155, 1244–57.

Chalut, K. J. & Paluch, E. K. 2016. The actin cortex: a bridge between cell shape and function. Developmental cell, 38, 571–573.

Charras, G. & Sahai, E. 2014. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. Nature reviews Molecular cell biology, 15, 813–824.

Cienkowski, L. 1863. Das Plasmodium.

Coggin, S. J. & Pazun, J. L. 1996. Dynamic complexity in *Physarum polycephalum* shuttle streaming. Protoplasma, 194, 243–249.

Colin, R. & Sourjik, V. 2017. Emergent properties of bacterial chemotaxis pathway. Current opinion in microbiology, 39, 24–33.

Couzin, I. D. 2009. Collective cognition in animal groups. Trends in cognitive sciences, 13, 36–43.

Csaba, G. & Porod, W. 2020. Coupled oscillators for computing: A review and perspective. Applied Physics Reviews, 7, 011302.

D'Urso, A. & Brickner, J. H. 2014. Mechanisms of epigenetic memory. Trends in genetics, 30, 230–236.

Daniel, J. W. & Baldwin, H. H. 1964. Methods of culture for plasmodial myxomycetes. In: Methods in cell biology, Vol 1 pp. 9–41. Elsevier.

Darwin, C. 2004. On the origin of species, 1859. Routledge.

Dasgupta, D. 1993. An overview of artificial immune systems and their applications. Artificial immune systems and their applications, 3–21.

Day, J. J. & Sweatt, J. D. 2011. Epigenetic mechanisms in cognition. Neuron, 70, 813–829.

De Palo, G., Yi, D. & Endres, R. G. 2017. A critical-like collective state leads to long-range cell communication in *Dictyostelium discoideum* aggregation. PLoS biology, 15, e1002602.

De Wiljes, O. O., van Elburg, R. & Keijzer, F. A. 2017. Modelling the effects of short and random proto-neural elongations. Journal of The Royal Society Interface, 14, 20170399.

Demis, E. C., Aguilera, R., Sillin, H. O., Scharnhorst, K., Sandouk, E. J., Aono, M., Stieg, A. Z. & Gimzewski, J. K. 2015. Atomic switch networks—nanoarchitectonic design of a complex system for natural computing. Nanotechnology, 26, 204003.

Denbo, J. R. & Miller, D. M. 1976. Factors affecting the movement of slime mold plasmodia. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 55, 5–12.

DeWitt, T. J., Sih, A. & Wilson, D. S. 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity. Trends in ecology & evolution, 13, 77–81.

Dexter, J. P., Prabakaran, S. & Gunawardena, J. 2019. A complex hierarchy of avoidance behaviors in a single-cell eukaryote. Current Biology, 29, 4323–4329.

Dhanachandra, N., Manglem, K. & Chanu, Y. J. 2015. Image segmentation using K-means clustering algorithm and subtractive clustering algorithm. Procedia Computer Science, 54, 764–771.

Diamond, M. E., Von Heimendahl, M., Knutsen, P. M., Kleinfeld, D. & Ahissar, E. 2008. "Where"and'what'in the whisker sensorimotor system. Nature Reviews Neuroscience, 9, 601–612.

Diggle, S. P., Crusz, S. A. & Cámara, M. 2007. Quorum sensing. Current Biology, 17, R907–R910.

Dinet, C., Michelot, A., Herrou, J. & Mignot, T. 2021. Linking single-cell decisions to collective behaviours in social bacteria. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376, 20190755.

Dirnberger, M., Mehlhorn, K. & Mehlhorn, T. (2017). Introducing the slime mold graph repository. Journal of Physics D: Applied Physics, 50, 264001.

Doncic, A., Eser, U., Atay, O. & Skotheim, J.M. (2013). An algorithm to automate yeast segmentation and tracking. PLoS one, 8, e57970.

Drebitz, E., Haag, M., Grothe, I., Mandon, S. & Kreiter, A. K. 2018. Attention configures synchronization within local neuronal networks for processing of the behaviorally relevant stimulus. Frontiers in neural circuits, 12, 71.

Driscoll, M. K., McCann, C., Kopace, R., Homan, T., Fourkas, J. T., Parent, C. & Losert, W. 2012. Cell shape dynamics: from waves to migration. PLoS computational biology, 8, e1002392.

Dukas, R. 2004. Evolutionary biology of animal cognition. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 35, 347–374.

Dukas, R. 2009. Learning: Mechanisms, Ecology, and Evolution. In: Cognitive ecology II, pp. 7–26. University of Chicago Press.

Durham, A. & Ridgway, E. 1976. Control of chemotaxis in *Physarum polycephalum*. The Journal of Cell Biology, 69, 218–223.

Dussutour, A. 2021. Learning in single cell organisms. Biochemical and Biophysical Research Communications,

Dussutour, A., Latty, T., Beekman, M. & Simpson, S. J. 2010. Amoeboid organism solves complex nutritional challenges. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 4607–4611.

Dussutour, A., Ma, Q. & Sumpter, D. 2019. Phenotypic variability predicts decision accuracy in unicellular organisms. Proceedings of the Royal Society B, 286, 20182825.

Dörfler, F., Chertkov, M. & Bullo, F. 2013. Synchronization in complex oscillator networks and smart grids. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110, 2005–2010.

Emes, R. D. & Grant, S. G. 2012. Evolution of synapse complexity and diversity. Annual review of neuroscience, 35, 111–131.

Engelmann, T. W. 1881. Pflüger's Arch. Gesammte Physiol, 25, 285–292.

Ernebjerg, M. & Kishony, R. (2012). Distinct growth strategies of soil bacteria as revealed by large-scale colony tracking. Applied and environmental microbiology, 78, 1345–1352.

Faisal, A. A., Selen, L. P. & Wolpert, D. M. 2008. Noise in the nervous system. Nature reviews neuroscience, 9, 292–303.

Falconnet, D., Niemistö, A., Taylor, R., Ricicova, M., Galitski, T., Shmulevich, I. & Hansen, C.L. (2011). High-throughput tracking of single yeast cells in a microfluidic imaging matrix. Lab on a Chip, 11, 466–473.

Farmer, J. D., Packard, N. H. & Perelson, A. S. 1986. The immune system, adaptation, and machine learning. Physica D: Nonlinear Phenomena, 22, 187–204.

Farr, D., Amster, H. & Horisberger, M. 1972. Composition and partial structure of the extracellular polysaccharide of *Physarum polycephalum*. Carbohyd Res,

Faubel, R., Westendorf, C., Bodenschatz, E. & Eichele, G. 2016. Cilia-based flow network in the brain ventricles. Science, 353, 176–178.

Faumont, S., Lindsay, T. & Lockery, S. 2012. Neuronal microcircuits for decision making in C. elegans. Current opinion in neurobiology, 22, 580–591.

Felekis, D., Muntwyler, S., Vogler, H., Beyeler, F., Grossniklaus, U. & Nelson, B.J. (2011). Quantifying growth mechanics of living, growing plant cells in situ using microrobotics. Micro \& Nano Letters, 6, 311–316.

Fell, J. & Axmacher, N. 2011. The role of phase synchronization in memory processes. Nature reviews neuroscience, 12, 105–118.

Fengler, E., Totz, J. F., Kaluza, P. & Engel, H. 2019. Directed adaptation of synchronization levels in oscillator communities. Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science, 29, 063101.

Fernando, C. T., Liekens, A. M., Bingle, L. E., Beck, C., Lenser, T., Stekel, D. J. & Rowe, J. E. 2009. Molecular circuits for associative learning in single-celled organisms. Journal of the Royal Society Interface, 6, 463–469.

Ferrell Jr, J. E., Tsai, T. Y.-C. & Yang, Q. 2011. Modeling the cell cycle: why do certain circuits oscillate? Cell, 144, 874–885.

Fessel, A., Oettmeier, C., Bernitt, E., Gauthier, N. C. & Döbereiner, H.-G. 2012. *Physarum polycephalum* percolation as a paradigm for topological phase transitions in transportation networks. Physical review letters, 109, 078103.

Flatt, T. & Heyland, A. 2011. Mechanisms of life history evolution: the genetics and physiology of life history traits and trade-offs. OUP Oxford.

Fleig, P., Kramar, M., Wilczek, M. & Alim, K. 2020. Emergence of behavior in a self-organized living matter network. bioRxiv,

Fontenele, A. J., de Vasconcelos, N. A., Feliciano, T., Aguiar, L. A., Soares-Cunha, C., Coimbra, B., Dalla Porta, L., Ribeiro, S., Rodrigues, A. J., Sousa, N. & others. 2019. Criticality between cortical states. Physical review letters, 122, 208101.

French, A., Ubeda-Tomás, S., Holman, T.J., Bennett, M.J. & Pridmore, T. (2009). High-throughput quantification of root growth using a novel image-analysis tool. Plant physiology, 150, 1784–1795.

Friedl, P. & Wolf, K. 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. Journal of Cell Biology, 188, 11–19.

Fultz, N. E., Bonmassar, G., Setsompop, K., Stickgold, R. A., Rosen, B. R., Polimeni, J. R. & Lewis, L. D. 2019. Coupled electrophysiological, hemodynamic, and cerebrospinal fluid oscillations in human sleep. Science, 366, 628–631.

Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. Journal of bacteriology, 176, 269–275.

Gagliano, M., Renton, M., Depczynski, M. & Mancuso, S. 2014. Experience teaches plants to learn faster and forget slower in environments where it matters. Oecologia, 175, 63–72.

Gagliano, M., Abramson, C. I. & Depczynski, M. 2018. Plants learn and remember: lets get used to it. Oecologia, 186, 29–31.

Gao, C., Liu, C., Schenz, D., Li, X., Zhang, Z., Jusup, M., Wang, Z., Beekman, M. & Nakagaki, T. 2018. Does being multi-headed make you better at solving problems? A survey of Physarum-based models and computations. Physics of life reviews,

Garcia, O. C. 2011. Principles of minimal cognition in smart slime molds and social bacteria. Pensamiento, 67, 787–797.

Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y. & Waterman, C. M. 2010. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. Annual review of cell and developmental biology, 26, 315–333.

Garnier, S., Gautrais, J. & Theraulaz, G. 2007. The biological principles of swarm intelligence. Swarm intelligence, 1, 3–31.

Gehenio, P. 1944. Longevity of the sclerotia of Mycetozoa. Biodynamica, 4, 359–368.

Gérard, C., Tyson, J. J., Coudreuse, D. & Novák, B. 2015. Cell cycle control by a minimal Cdk network. PLoS computational biology, 11, e1004056.

Gerber, T., Loureiro, C., Schramma, N., Chen, S., Jain, A., Weber, A., Weigert, A., Santel, M., Alim, K., Treutlein, B. & others. 2021. Nuclei are mobile processors enabling specialization in a gigantic single-celled syncytium. bioRxiv,

Ginsburg, S. & Jablonka, E. 2009. Epigenetic learning in non-neural organisms. Journal of biosciences, 34, 633–646.

Glanzman, D. L. 2009. Habituation in Aplysia: the Cheshire cat of neurobiology. Neurobiology of learning and memory, 92, 147–154.

Godfrey-Smith, P. 2002. Environmental complexity and the evolution of cognition. The evolution of intelligence, 233–249.

Godfrey-Smith, P. 2016. Individuality, subjectivity, and minimal cognition. Biology & Philosophy, 31, 775–796.

Goldt, S. & Seifert, U. 2017. Stochastic thermodynamics of learning. Physical review letters, 118, 010601.

Goodwin, B. C. 1989. Unicellular morphogenesis. Cell Shape Determ Regul Regul Role, 365–91.

Guttes, E. & Guttes, S. 1964. Mitotic synchrony in the plasmodia of *Physarum polycephalum* and mitotic synchronization by coalescence of microplasmodia. In: Methods in Cell Biology, Vol 1 pp. 43–54. Elsevier.

Göhde, R., Naumann, B., Laundon, D., Imig, C., McDonald, K., Cooper, B. H., Varoqueaux, F., Fasshauer, D. & Burkhardt, P. 2021. Choanoflagellates and the ancestry of neurosecretory vesicles. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376, 20190759.

Häder, D.-P. & Schreckenbach, T. 1984. Phototactic orientation in plasmodia of the acellular slime mold, *Physarum polycephalum*. Plant and cell physiology, 25, 55–61.

Halvorsrud, R. & Wagner, G. 1998. Growth patterns of the slime mold Physarum on a nonuniform substrate. Physical Review E, 57, 941.

Hamilton, T. C., Thompson, J. M. & Eisenstein, E. 1974. Quantitative analysis of ciliary and contractile responses during habituation training in *Spirostomum ambiguum*. Behavioral biology, 12, 393–407.

Haney, S.M., Thompson, P.M., Cloughesy, T.F., Alger, J.R. & Toga, A.W. (2001). Tracking tumor growth rates in patients with malignant gliomas: A test of two algorithms. American Journal of Neuroradiology, 22, 73–82.

Hanson, A. 2021. Spontaneous electrical low-frequency oscillations: a possible role in Hydra and all living systems. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376, 20190763.

Harris, C. R., Millman, K. J., van der Walt, S. J., Gommers, R., Virtanen, P., Cournapeau, D., Wieser, E., Taylor, J., Berg, S., Smith, N. J. & others. 2020. Array programming with NumPy. Nature, 585, 357–362.

Hasegawa, T., Nayak, A., Ohno, T., Terabe, K., Tsuruoka, T., Gimzewski, J. K. & Aono, M. 2011. Memristive operations demonstrated by gap-type atomic switches. Applied Physics A, 102, 811–815.

Haskins, E. F. & Hinchee, A. A. 1974. Light-and ultra-microscopical observations on the surface structure of the protoplasmodium, aphanoplasmodium, and phaneroplasmodium (Myxomycètes). Canadian Journal of Botany, 52, 1835–1839.

Headley, D. B. & Paré, D. 2017. Common oscillatory mechanisms across multiple memory systems. npj Science of Learning, 2, 1–8.

Hebb, D. 1949. The organization of behavior.

Hennessey, T. M., Rucker, W. B. & McDiarmid, C. G. 1979. Classical conditioning in paramecia. Animal learning & behavior, 7, 417–423.

Henrich, J. & McElreath, R. 2003. The evolution of cultural evolution. Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews: Issues, News, and Reviews, 12, 123–135.

Hernandez, P. J. & Abel, T. 2008. The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. Neurobiology of learning and memory, 89, 293–311.

Hesse, J. & Gross, T. 2014. Self-organized criticality as a fundamental property of neural systems. Frontiers in systems neuroscience, 8, 166.

Hind, L. E., Vincent, W. J. & Huttenlocher, A. 2016. Leading from the back: the role of the uropod in neutrophil polarization and migration. Developmental cell, 38, 161–169.

Hird, J.N., Kariyeva, J. & McDermid, G.J. (2021). Satellite Time Series and Google Earth Engine Democratize the Process of Forest-Recovery Monitoring over Large Areas. Remote Sensing, 13, 4745.

Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. 1952a. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. The Journal of physiology, 117, 500–544.

Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. 1952b. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. The Journal of physiology, 116, 449–472.

Hunter, J.D. (2007). Matplotlib: A 2D graphics environment. Computing in science & engineering, 9, 90–95.

Iglesias, P. A. & Devreotes, P. N. 2008. Navigating through models of chemotaxis. Current opinion in cell biology, 20, 35–40.

Ildefonso, M., Bringas, C., Malaina, I., Fedetz, M., Carrasco-Pujante, J., Morales, M., Knafo, S., Martinez, L., Pérez-Samartin, A., López, J. I. & others. 2019. Evidence of conditioned behavior in amoebae. Nature communications, 10, 1–12.

Inagaki, N. & Katsuno, H. 2017. Actin waves: origin of cell polarization and migration? Trends in cell biology, 27, 515–526.

Isenberg, G. & Wohlfarth-Bottermann, K. 1976. Transformation of cytoplasmic actin importance for the organization of the contractile gel reticulum and the contraction—relaxation cycle of cytoplasmic actomyosin. Cell and tissue research, 173, 495–528.

Isomura, A. & Kageyama, R. 2014. Ultradian oscillations and pulses: coordinating cellular responses and cell fate decisions. Development, 141, 3627–3636.

Iwatsuki, K. 1992. Stentor coeruleus shows positive photokinesis. Photochemistry and photobiology, 55, 469–471.

Jacob, E. B., Becker, I., Shapira, Y. & Levine, H. 2004. Bacterial linguistic communication and social intelligence. TRENDS in Microbiology, 12, 366–372.

Jékely, G. 2021. The chemical brain hypothesis for the origin of nervous systems. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376, 20190761.

Jékely, G., Godfrey-Smith, P. & Keijzer, F. 2021. Reafference and the origin of the self in early nervous system evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376, 20190764.

Jennings, H. S. 1906. Behavior of the lower organisms. Columbia University Press, The Macmillan Company, agents.

Johnson, C.H., Knight, M.R., Kondo, T., Masson, P., Sedbrook, J., Haley, A. and Trewavas, A., 1995. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. Science, 269(5232), 1863-1865.

Jones, J. 2010. Characteristics of pattern formation and evolution in approximations of Physarum transport networks. Artificial life, 16, 127–153.

Julien, J.-D. & Alim, K. 2018. Oscillatory fluid flow drives scaling of contraction wave with system size. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115, 10612–10617.

Jyothi, M., Nagarajan, V. & Chandiramouli, R. (2020). Investigation on adsorption properties of HCN and ClCN blood agents on θ-phosphorene nanosheets-A first-principles insight. Chemical Physics, 538, 110896.

Kaluza, P. & Mikhailov, A. S. 2014. Autonomous learning by simple dynamical systems with delayed feedback. Physical Review E, 90, 030901.

Kamiya, N. 1940. The control of protoplasmic streaming. Science, 92, 462–463.

Kanders, K., Lorimer, T. & Stoop, R. 2017. Avalanche and edge-of-chaos criticality do not necessarily co-occur in neural networks. Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science, 27, 047408.

Kanungo, T., Mount, D. M., Netanyahu, N. S., Piatko, C. D., Silverman, R. & Wu, A. Y. 2002. An efficient k-means clustering algorithm: Analysis and implementation. IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence, 24, 881–892.

Karmakar, R. 2021. State of the art of bacterial chemotaxis. Journal of Basic Microbiology, 61, 366–379.

Kauffman, S. & Wille, J. J. 1975. The mitotic oscillator in *Physarum polycephalum*. Journal of theoretical biology, 55, 47–93.

Kelly Jr, J. L. 2011. A new interpretation of information rate. In: The Kelly capital growth investment criterion: theory and practice, pp. 25–34. World Scientific.

Kessler, D. 1982. Plasmodial structure and motility. Cell biology of Physarum and Didymium/edited by Henry C. Aldrich, John W. Daniel,

Kessler, D., Eisenlohr, L., Lathwell, M., Huang, J., Taylor, H., Godfrey, S. & Spady, M. 1980. Physarum myosin light chain binds calcium. Cell motility, 1, 63–71.

Kim, M. K., Ingremeau, F., Zhao, A., Bassler, B. L. & Stone, H. A. 2016. Local and global consequences of flow on bacterial quorum sensing. Nature microbiology, 1, 1–5.

King, J. S. & Insall, R. H. 2009. Chemotaxis: finding the way forward with Dictyostelium. Trends in cell biology, 19, 523–530.

Knowles, D. J. & Carlile, M. J. 1978. The chemotactic response of plasmodia of the myxomycete *Physarum polycephalum* to sugars and related compounds. Microbiology, 108, 17–25.

Kobayashi, R., Tero, A. & Nakagaki, T. 2006. Mathematical model for rhythmic protoplasmic movement in the true slime mold. Journal of mathematical biology, 53, 273–286.

Koch, R.A., Harmel, C., Alber, M. & Bahn, E. (2021). A framework for automated time-resolved analysis of cell colony growth after irradiation. Physics in Medicine \& Biology, 66, 035017.

Kohama, K. 2016. Calcium inhibition as an intracellular signal for actin-myosin interaction. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 92, 478–498.

Korohoda, W., Shraideh, Z., Baranowski, Z. & Wohlfarth-Bottermann, K. 1983. Energy metabolic regulation of oscillatory contraction activity in *Physarum polycephalum*. Cell and tissue research, 231, 675–691.

Koseska, A. & Bastiaens, P. I. 2017. Cell signaling as a cognitive process. The EMBO journal, 36, 568–582.

Kramar, M. & Alim, K. 2021. Encoding memory in tube diameter hierarchy of living flow network. Proceedings of the National Academy of Sciences, 118,

Kristan, WB. 2016. Early evolution of neurons. Current Biology, 26, R949–R954.

Kuhn, T. S. 1987. What are scientific revolutions. Cambridge: MIT.

Kumar, K. V., Bois, J. S., Jülicher, F. & Grill, S. W. 2014. Pulsatory patterns in active fluids. Physical Review Letters, 112, 208101.

Kunita, I., Sato, S., Saigusa, T. & Nakagaki, T. 2013. Ethological Response to Periodic Stimulation in Chara and Blepharisma. In: Natural Computing and Beyond, pp. 3–13. Springer.

Kunita, I., Yamaguchi, T., Tero, A., Akiyama, M., Kuroda, S. & Nakagaki, T. 2016. A ciliate memorizes the geometry of a swimming arena. Journal of the Royal Society interface, 13, 20160155.

Kuroda, R. & Kuroda, H. 1982. Relation of cytoplasmic calcium to contractility in *Physarum polycephalum*. Journal of cell science, 53, 37–48.

Kuroda, S., Takagi, S., Nakagaki, T. & Ueda, T. 2015. Allometry in Physarum plasmodium during free locomotion: size versus shape, speed and rhythm. Journal of experimental biology, 218, 3729–3738.

Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., Christensen, R. H. B. & others. 2015. Package "lmertest."R package version, 2,

Lancaster, N. 1994. Dune morphology and dynamics. In: Geomorphology of desert environments, pp. 474–505. Springer.

Larsen, S. H., Reader, R. W., Kort, E. N., Tso, W.-W. & Adler, J. 1974a. Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in Escherichia coli. Nature, 249, 74.

Larsen, S. H., Adler, J., Gargus, J. J. & Hogg, R. W. 1974b. Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences, 71, 1239–1243.

Latty, T. & Beekman, M. 2009. Food quality affects search strategy in the acellular slime mould, *Physarum polycephalum*. Behavioral Ecology, 20, 1160–1167.

Latty, T. & Beekman, M. 2010. Food quality and the risk of light exposure affect patch-choice decisions in the slime mold *Physarum polycephalum*. Ecology, 91, 22–27.

Latty, T. & Beekman, M. 2015. Slime moulds use heuristics based on within-patch experience to decide when to leave. The Journal of experimental biology, 218, 1175–1179.

Lenz, P. & Søgaard-Andersen, L. 2011. Temporal and spatial oscillations in bacteria. Nature Reviews Microbiology, 9, 565–577.

Leontyev, D. V. & Schnittler, M. 2017. The Phylogeny of Myxomycetes. In: Myxomycetes, pp. 83–106. Elsevier.

Leontyev, D. V., Schnittler, M., Stephenson, S. L., Novozhilov, Y. K. & Shchepin, O. N. 2019. Towards a phylogenetic classification of the Myxomycetes. Phytotaxa, 399, 209–238.

Levin, M., Keijzer, F., Lyon, P. & Arendt, D. 2021. Uncovering cognitive similarities and differences, conservation and innovation.

Levine, J. H., Lin, Y. & Elowitz, M. B. 2013. Functional roles of pulsing in genetic circuits. Science, 342, 1193–1200.

Levin-Reisman, I., Fridman, O. & Balaban, N.Q. (2014). ScanLag: high-throughput quantification of colony growth and lag time. Journal of visualized experiments: JoVE.

Lewis, O. L., Zhang, S., Guy, R. D. & Del Alamo, J. C. 2015. Coordination of contractility, adhesion and flow in migrating Physarum amoebae. Journal of The Royal Society Interface, 12, 20141359.

Leys, S. & Meech, R. 2006. Physiology of coordination in sponges. Canadian journal of zoology, 84, 288–306.

Li, X. & Zhang, W. 2008. Salt-avoidance tropism in Arabidopsis thaliana. Plant signaling & behavior, 3, 351–3.

Li, Y., Wang, Z., Midya, R., Xia, Q. & Yang, J. J. 2018. Review of memristor devices in neuromorphic computing: materials sciences and device challenges. Journal of Physics D: Applied Physics, 51, 503002.

Liebeskind, B. J., Hillis, D. M. & Zakon, H. H. 2011. Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 9154–9159.

Lyon, P. 2006. The biogenic approach to cognition. Cognitive Processing, 7, 11–29.

Lyon, P. 2015. The cognitive cell: bacterial behavior reconsidered. Frontiers in microbiology, 6, 264.

Lyon, P. 2019. Of what is “minimal cognition” the half-baked version? Adaptive Behavior, 1059712319871360.

Lyon, P. & Kuchling, F. 2021. Valuing what happens: a biogenic approach to valence and (potentially) affect. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376, 20190752.

Lyon, P., Keijzer, F., Arendt, D. & Levin, M. 2021. Reframing cognition: getting down to biological basics.

Mackie, G. O. 1970. Neuroid conduction and the evolution of conducting tissues. The Quarterly review of biology, 45, 319–332.

Macnab, R. M. & Koshland, D. E. 1972. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 69, 2509–2512.

Mainen, Z. F. & Sejnowski, T. J. 1995. Reliability of spike timing in neocortical neurons. Science, 268, 1503–1506.

Manicka, S. & Levin, M. 2019. The Cognitive Lens: a primer on conceptual tools for analysing information processing in developmental and regenerative morphogenesis. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 374, 20180369.

Marr, D. 1982. Vision: A computational investigation into the human representation and processing of visual information, henry holt and co. Inc., New York, NY, 2,

Marwan, W. 2001. Photomovement and photomorphogenesis in Physarum polycephalum: targeting of cytoskeleton and gene expression by light. In: Comprehensive Series in Photosciences, Vol 1 pp. 561–587. Elsevier.

Matsumoto, K., Ueda, T. & Kobatake, Y. 1986. Propagation of phase wave in relation to tactic responses by the plasmodium of *Physarum polycephalum*. Journal of Theoretical Biology, 122, 339–345.

Matsumoto, K., Takagi, S. & Nakagaki, T. 2008. Locomotive mechanism of Physarum plasmodia based on spatiotemporal analysis of protoplasmic streaming. Biophysical journal, 94, 2492–504.

Maturana, H. R. & Varela, F. J. 1980. Autopoiesis and cognition: The realization of the living. Springer Science & Business Media.

Matveeva, N., Teplov, V. & Beylina, S. 2010. Suppression of the auto-oscillatory contractile activity of *Physarum polycephalum* plasmodium by the inhibitor of the IP 3-Induced Ca 2+ release, 2-aminoethoxydiphenyl borate. Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 4, 70–76.

Mayne, R. 2016. Biology of the *Physarum polycephalum* plasmodium: preliminaries for unconventional computing. In: Advances in Physarum machines, pp. 3–22. Springer.

Mayorova, T. D., Smith, C. L., Hammar, K., Winters, C. A., Pivovarova, N. B., Aronova, M. A., Leapman, R. D. & Reese, T. S. 2018. Cells containing aragonite crystals mediate responses to gravity in *Trichoplax adhaerens* (Placozoa), an animal lacking neurons and synapses. PloS one, 13, e0190905.

McCormick, J. J., Blomquist, J. C. & Rusch, H. P. 1970. Isolation and characterization of a galactosamine wall from spores and spherules of *Physarum polycephalum*. Journal of bacteriology, 104, 1119–1125.

McGregor, S., Vasas, V., Husbands, P. & Fernando, C. 2012. Evolution of associative learning in chemical networks. PLoS computational biology, 8, e1002739.

McKinney, W. & others. 2010. Data structures for statistical computing in python. In: Proceedings of the 9th Python in Science Conference, Vol 445 pp. 51–56.

Meisel, C., Olbrich, E., Shriki, O. & Achermann, P. 2013. Fading signatures of critical brain dynamics during sustained wakefulness in humans. Journal of Neuroscience, 33, 17363–17372.

Miller, D. M., Anderson, J. D. & Abbot, B. C. 1968. Potentials and ionic exchange in slime mold plasmodia. Comparative biochemistry and physiology, 27, 633–646.

Miyake, Y., Tada, H., Yano, M. & Shimizu, H. 1994. Relationship between intracellular period modulation and external environment change in Physarum plasmodium. Cell structure and function, 19, 363–370.

Mogre, S. S., Brown, A. I. & Koslover, E. F. 2020. Getting around the cell: physical transport in the intracellular world. Physical Biology, 17, 061003.

Moller, S., Kristensen, C.S., Poulsen, L.K., Carstensen, J.M. & Molin, S. (1995). Bacterial growth on surfaces: automated image analysis for quantification of growth rate-related parameters. Applied and Environmental Microbiology, 61, 741–748.

Moore, B. R. 2004. The evolution of learning. Biological Reviews, 79, 301–335.

Moran, Y., Barzilai, M. G., Liebeskind, B. J. & Zakon, H. H. 2015. Evolution of voltage-gated ion channels at the emergence of Metazoa. Journal of Experimental Biology, 218, 515–525.

Mori, T. & Kai, S. 2002. Noise-induced entrainment and stochastic resonance in human brain waves. Physical review letters, 88, 218101.

Mori, Y., Ueda, T. & Kobatake, Y. 1987. NAD(P)H oscillation in relation to the rhythmic contraction in the *Physarum* plasmodium. Protoplasma, 139, 141–144.

Moroz, L. L., Romanova, D. Y. & Kohn, A. B. 2021. Neural versus alternative integrative systems: molecular insights into origins of neurotransmitters. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376, 20190762.

Mosadegh, B., Kuo, C.-H., Tung, Y.-C., Torisawa, Y., Bersano-Begey, T., Tavana, H. & Takayama, S. 2010. Integrated elastomeric components for autonomous regulation of sequential and oscillatory flow switching in microfluidic devices. Nature physics, 6, 433–437.

Mseka, T., Bamburg, J. R. & Cramer, L. P. 2007. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization. Journal of cell science, 120, 4332–4344.

Müller, U. & Hartung, K. 1990. Properties of three different ion channels in the plasma membrane of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1026, 204–212.

Murugan, N., Kaltman, D., Jin, H., Chien, M., Flores, R., Nguyen, C., Tuzoff, D., Minabutdinov, A., Kane, A., Novak, R. & others. 2020. Mechanosensation Mediates Long-Range Spatial Decision-Making in an Aneural Organism. bioRxiv,

Nakagaki, T. & Guy, R. D. 2008. Intelligent behaviors of amoeboid movement based on complex dynamics of soft matter. Soft Matter, 4, 57–67.

Nakagaki, T., Yamada, H. & Tóth, Á. 2000a. Intelligence: Maze-solving by an amoeboid organism. Nature, 407, 470.

Nakagaki, T., Yamada, H. & Ueda, T. 2000b. Interaction between cell shape and contraction pattern in the Physarum plasmodium. Biophysical chemistry, 84, 195–204.

Nakagaki, T., Kobayashi, R., Nishiura, Y. & Ueda, T. 2004a. Obtaining multiple separate food sources: behavioural intelligence in the Physarum plasmodium. Proceedings. Biological sciences / The Royal Society, 271, 2305–10.

Nakagaki, T., Yamada, H. & Hara, M. 2004b. Smart network solutions in an amoeboid organism. Biophysical chemistry, 107, 1–5.

Nakamura, A. & Kohama, K. 1999. Calcium regulation of the actin-myosin interaction of *Physarum polycephalum*. International review of cytology, 191, 53–98.

Nakamura, S., Yoshimoto, Y. & Kamiya, N. 1982. Oscillation in surface pH of the Physarum plasmodium. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 58, 270–273.

Nakaoka, Y. & Iwatsuki, K. 1992. Hyperpolarization-activated inward current associated with the frequency increase in ciliary beating of Paramecium. Journal of Comparative Physiology A, 170, 723–727.

Natsume, K., Miyake, Y., Yano, M. & Shimizu, H. 1992. Development of spatio-temporal pattern of Ca 2+ on the chemotactic behaviour of *Physarum* plasmodium. Protoplasma, 166, 55–60.

Nwodo, U. U., Green, E. & Okoh, A. I. 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. International journal of molecular sciences, 13, 14002–14015.

Oettmeier, C. & Döbereiner, H.-G. 2019a. A lumped parameter model of endoplasm flow in *Physarum polycephalum* explains migration and polarization-induced asymmetry during the onset of locomotion. PloS one, 14, e0215622.

Oettmeier, C. & Döbereiner, H.-G. 2019b. Mitochondrial numbers increase during glucose deprivation in the slime mold *Physarum polycephalum*. Protoplasma, 256, 1647–1655.

Oettmeier, C., Brix, K. & Döbereiner, H.-G. 2017. *Physarum polycephalum*—A new take on a classic model system. Journal of Physics D: Applied Physics, 50, 413001.

Oettmeier, C., Lee, J. & Döbereiner, H.-G. 2018. Form follows function: ultrastructure of different morphotypes of *Physarum polycephalum*. Journal of Physics D: Applied Physics, 51, 134006.

Oh, K. W., Lee, K., Ahn, B. & Furlani, E. P. 2012. Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy. Lab on a Chip, 12, 515–545.

Olshausen, B. A., Anderson, C. H. & Van Essen, D. C. 1993. A neurobiological model of visual attention and invariant pattern recognition based on dynamic routing of information. Journal of Neuroscience, 13, 4700–4719.

Osborn, D., Blair, H. J., Thomas, J. & Eisenstein, E. 1973. The effects of vibratory and electrical stimulation on habituation in the ciliated protozoan, Spirostomum ambiguum. Behavioral biology, 8, 655–664.

Palacios, E. R., Razi, A., Parr, T., Kirchhoff, M. & Friston, K. 2020. On Markov blankets and hierarchical self-organization. Journal of theoretical biology, 486, 110089.

Pandey, S., Park, Y., Ankita, A. & Phillips, G.J. (2021). Scan4CFU: Low-cost, open-source bacterial colony tracking over large areas and extended incubation times. HardwareX, 10, e00249.

Pasteur, L. 1879. Studies on fermentation: the diseases of beer, their causes, and the means of preventing them. Macmillan & Company.

Patino-Ramirez, F., Arson, C. & Dussutour, A. (2021). Substrate and cell fusion influence on slime mold network dynamics. Scientific reports, 11, 1–20.

Patino-Ramirez, F., Boussard, A., Arson, C. & Dussutour, A. (2019). Substrate composition directs slime molds behavior. Scientific Reports, 9, 1–14.

Paweletz, N. 2001. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. Nature reviews Molecular cell biology, 2, 72–75.

Pershin, Y. V. & Di Ventra, M. 2013. Self-organization and solution of shortest-path optimization problems with memristive networks. Physical Review E, 88, 013305.

Pershin, Y. V., La Fontaine, S. & Di Ventra, M. 2009. Memristive model of amoeba learning. Physical Review E, 80, 021926.

Pizoli, C. E., Shah, M. N., Snyder, A. Z., Shimony, J. S., Limbrick, D. D., Raichle, M. E., Schlaggar, B. L. & Smyth, M. D. 2011. Resting-state activity in development and maintenance of normal brain function. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 11638–11643.

Prindle, A., Liu, J., Asally, M., Garcia-Ojalvo, J. & Süel, G. M. 2015. Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. Nature, 527, 59–63.

Purvis, J. E. & Lahav, G. 2013. Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. Cell, 152, 945–956.

Pyragas, K. 1992. Continuous control of chaos by self-controlling feedback. Physics letters A, 170, 421–428.

Radszuweit, M., Engel, H. & Bär, M. 2010. A model for oscillations and pattern formation in protoplasmic droplets of *Physarum polycephalum*. The European Physical Journal Special Topics, 191, 159–172.

Radszuweit, M., Alonso, S., Engel, H. & Bär, M. 2013. Intracellular mechanochemical waves in an active poroelastic model. Physical review letters, 110, 138102.

Radszuweit, M., Engel, H. & Bär, M. 2014. An active poroelastic model for mechanochemical patterns in protoplasmic droplets of *Physarum polycephalum*. PloS one, 9, e99220.

Rajagopalan, V., Scott, J., Habas, P.A., Kim, K., Corbett-Detig, J., Rousseau, F., Barkovich, A.J., Glenn, O.A. and Studholme, C. (2011). Local tissue growth patterns underlying normal fetal human brain gyrification quantified in utero. Journal of neuroscience, 31(8), 2878-2887.

Rakoczy, L. 1973. The myxomycete Physarum nudum as a model organism for photobiological studies. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 86, 141–164.

Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Coppola, G., Geyer, M. A., Glanzman, D. L., Marsland, S., McSweeney, F. K., Wilson, D. A., Wu, C.-F. & Thompson, R. F. 2009. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. Neurobiology of learning and memory, 92, 135–8.

Raser, J. M. & O'Shea, E. K. 2005. Noise in gene expression: origins, consequences, and control. Science (New York, N.Y.), 309, 2010–3.

Ray, S. K., Valentini, G., Shah, P., Haque, A., Reid, C. R., Weber, G. F. & Garnier, S. 2019. Information Transfer During Food Choice in the Slime Mold *Physarum polycephalum*. Frontiers in Ecology and Evolution, 7, 67.

Redi, F. 1668. Esperienze intorno alla generazione degl'insetti. All'insegna della Stella.

Reid, C. R. & Beekman, M. 2013. Solving the Towers of Hanoi-how an amoeboid organism efficiently constructs transport networks. Journal of Experimental Biology, 216, 1546–1551.

Reid, C. R. & Latty, T. 2016. Collective behaviour and swarm intelligence in slime moulds. FEMS microbiology reviews, 40, 798–806.

Reid, C. R., Latty, T., Dussutour, A. & Beekman, M. 2012. Slime mold uses an externalized spatial "memory" to navigate in complex environments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, 17490–4.

Reid, C. R., Beekman, M., Latty, T. & Dussutour, A. 2013. Amoeboid organism uses extracellular secretions to make smart foraging decisions. Behavioral Ecology, 24, 812–818.

Reid, C. R., Garnier, S., Beekman, M. & Latty, T. 2015. Information integration and multiattribute decision making in non-neuronal organisms. Animal behaviour, 100, 44–50.

Reid, C. R., MacDonald, H., Mann, R. P., Marshall, J. A., Latty, T. & Garnier, S. 2016. Decision-making without a brain: how an amoeboid organism solves the two-armed bandit. Journal of The Royal Society Interface, 13, 20160030.

Reig, G., Pulgar, E. & Concha, M. L. 2014. Cell migration: from tissue culture to embryos. Development, 141, 1999–2013.

Reynierse, J. H. & Walsh, G. L. 1967. Behavior modification in the protozoan Stentor re-examined. The Psychological record, 17, 161–165.

Ridgway, E. & Durham, A. 1976. Oscillations of calcium ion concentrations in *Physarum polycephalum*. The Journal of cell biology, 69, 223–226.

Rietkerk, M. & van de Koppel, J. 2008. Regular pattern formation in real ecosystems. Trends in Ecology & Evolution, 23, 169–175.

Roach, J. P., Pidde, A., Katz, E., Wu, J., Ognjanovski, N., Aton, S. J. & Zochowski, M. R. 2018. Resonance with subthreshold oscillatory drive organizes activity and optimizes learning in neural networks. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115, E3017–E3025.

Rocha, L., Velho, L. & Carvalho, P. C. P. (2002). Image moments-based structuring and tracking of objects. In Proceedings. XV Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing (pp. 99–105).

Rodiek, B. & Hauser, M. 2015. Migratory behaviour of *Physarum polycephalum* microplasmodia. The European Physical Journal Special Topics, 224, 1199–1214.

Rodiek, B., Takagi, S., Ueda, T. & Hauser, M. J. 2015. Patterns of cell thickness oscillations during directional migration of *Physarum polycephalum*. European Biophysics Journal, 44, 349–358.

Rodrigues, F. A., Peron, T. K. D., Ji, P. & Kurths, J. 2016. The Kuramoto model in complex networks. Physics Reports, 610, 1–98.

Rojas, C. & Stephenson, S. L. 2017. Myxomycetes: biology, systematics, biogeography and ecology. Academic Press.

Romanos, M., Allio, G., Roussigné, M., Combres, L., Escalas, N., Soula, C., Médevielle, F., Steventon, B., Trescases, A. & Bénazéraf, B. (2021). Cell-to-cell heterogeneity in Sox2 and Bra expression guides progenitor motility and destiny. ELife, 10, e66588.

Rusch, H. P., Sachsenmaier, W., Behrens, K. & Gruter, V. 1966. Synchronization of mitosis by the fusion of the plasmodia of *Physarum polycephalum*. The Journal of cell biology, 31, 204–9.

Sackett, M. J., Armitage, J. P., Sherwood, E. E. & Pitta, T. P. 1997. Photoresponses of the purple nonsulfur bacteria *Rhodospirillum centenum* and *Rhodobacter sphaeroides*. Journal of bacteriology, 179, 6764–6768.

Saigusa, T., Tero, A., Nakagaki, T. & Kuramoto, Y. 2008. Amoebae anticipate periodic events. Physical review letters, 100, 018101.

Salbreux, G., Charras, G. & Paluch, E. 2012. Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. Trends in cell biology, 22, 536–545.

Saranak, J. & Foster, K. W. 1997. Rhodopsin guides fungal phototaxis. Nature, 387, 465–466.

Satoh, H., Ueda, T. & Kobatake, Y. 1982. Primary oscillator of contractional rhythm in the plasmodium of *Physarum polycephalum*: role of mitochondria. Cell Structure and Function, 7, 275–283.

Sauer, H. W. 1978. Regulation of gene expression in the cell cycle of Physarum. Cell cycle regulation, 149–166.

Schaap, P., Barrantes, I., Minx, P., Sasaki, N., Anderson, R. W., Bénard, M., Biggar, K. K., Buchler, N. E., Bundschuh, R., Chen, X. & others. 2015. The *Physarum polycephalum* genome reveals extensive use of prokaryotic two-component and metazoan-type tyrosine kinase signaling. Genome biology and evolution, 8, 109–125.

Schenz, D., Nishigami, Y., Sato, K. & Nakagaki, T. 2019. Uni-cellular integration of complex spatial information in slime moulds and ciliates. Current Opinion in Genetics & Development, 57, 78–83.

Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature methods, 9, 671–675.

Schumann, A. & Adamatzky, A. 2011. Physarum spatial logic. New Mathematics and Natural Computation, 7, 483–498.

Sesaki, H. & Ogihara, S. 1997. Secretion of slime, the extracellular matrix of the plasmodium, as visualized with a fluorescent probe and its correlation with locomotion on the substratum. Cell structure and function, 22, 279–289.

Shen-Miller, J. & Gordon, S. A. 1966. Hormonal relations in the phototropic response: III. The movement of C14-labeled and endogenous indoleacetic acid in phototropically stimulated Zea coleoptiles. Plant physiology, 41, 59–65.

Shitan, N. & Yazaki, K. 2007. Accumulation and membrane transport of plant alkaloids. Current pharmaceutical biotechnology, 8, 244–252.

Simon, H. L. & Henney Jr, H. R. 1970. Chemical composition of slime from three species of myxomycetes. FEBS letters, 7, 80–82.

Smith, D. A. & Saldana, R. 1992. Model of the Ca2+ oscillator for shuttle streaming in *Physarum polycephalum*. Biophysical journal, 61, 368–80.

Sorek, M., Balaban, N. Q. & Loewenstein, Y. 2013. Stochasticity, bistability and the wisdom of crowds: a model for associative learning in genetic regulatory networks. PLoS computational biology, 9, e1003179.

Spedalieri, G., Piersimoni, L., Laurino, O., Braunstein, S.L. & Pirandola, S. (2020). Detecting and tracking bacteria with quantum light. Physical Review Research, 2, 043260.

Stahlberg, R. 2006. Historical overview on plant neurobiology. Plant Signaling & Behavior, 1, 6–8.

Stephenson, S. L. & Schnittler, M. 2017. Myxomycetes. Handb Protists, 1405–31.

Stieg, A. Z., Avizienis, A. V., Sillin, H. O., Martin-Olmos, C., Aono, M. & Gimzewski, J. K. 2012. Emergent criticality in complex Turing b-type atomic switch networks.

Strasburger, E. 1880. Zellbildung und zelltheilung. Fischer.

Sudbery, P. & Grant, W. 1976. The control of mitosis in *Physarum polycephalum*: the effect of delaying mitosis and evidence for the operation of the control mechanism in the absence of growth. Journal of cell science, 22, 59–65.

Svitkina, T. 2018. The actin cytoskeleton and actin-based motility. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 10, a018267.

Szymanski, J. R. & Yuste, R. 2019. Mapping the whole-body muscle activity of Hydra vulgaris. Current Biology, 29, 1807–1817.

Takagi, S. & Ueda, T. 2008. Emergence and transitions of dynamic patterns of thickness oscillation of the plasmodium of the true slime mold *Physarum polycephalum*. Physica D: Nonlinear Phenomena, 237, 420–427.

Takahashi, H. & Scott, T. K. 1993. Intensity of hydrostimulation for the induction of root hydrotropism and its sensing by the root cap. Plant, cell & environment, 16, 99–103.

Takamatsu, A., Fujii, T. & Endo, I. 2000. Time delay effect in a living coupled oscillator system with the plasmodium of *Physarum polycephalum*. Physical Review Letters, 85, 2026.

Takamatsu, A., Tanaka, R., Yamada, H., Nakagaki, T., Fujii, T. & Endo, I. 2001. Spatiotemporal symmetry in rings of coupled biological oscillators of Physarum plasmodial slime mold. Physical Review Letters, 87, 078102.

Takamatsu, A., Takaba, E. & Takizawa, G. 2009. Environment-dependent morphology in plasmodium of true slime mold *Physarum polycephalum* and a network growth model. Journal of theoretical biology, 256, 29–44.

Tamayo, P., Slonim, D., Mesirov, J., Zhu, Q., Kitareewan, S., Dmitrovsky, E., Lander, E. S. & Golub, T. R. 1999. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 2907–2912.

Tanaka, G., Yamane, T., Héroux, J. B., Nakane, R., Kanazawa, N., Takeda, S., Numata, H., Nakano, D. & Hirose, A. 2019. Recent advances in physical reservoir computing: A review. Neural Networks, 115, 100–123.

Tang, S. K. & Marshall, W. F. 2018. Cell learning. Current Biology, 28, R1180–R1184.

Teague, B. P., Guye, P. & Weiss, R. 2016. Synthetic morphogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 8, a023929.

Teplov, V. A. 2017. Role of mechanics in the appearance of oscillatory instability and standing waves of the mechanochemical activity in the *Physarum polycephalum* plasmodium. Journal of Physics D: Applied Physics, 50, 213002.

Terayama, K., Ueda, T., Kurihara, K. & Kobatake, Y. 1977. Effect of sugars on salt reception in true slime mold *Physarum polycephalum*. The Journal of membrane biology, 34, 369–381.

Tero, A., Kobayashi, R. & Nakagaki, T. 2006. Physarum solver: A biologically inspired method of road-network navigation. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications, 363, 115–119.

Tero, A., Kobayashi, R. & Nakagaki, T. 2007. A mathematical model for adaptive transport network in path finding by true slime mold. Journal of theoretical biology, 244, 553–564.

Tero, A., Takagi, S., Saigusa, T., Ito, K., Bebber, D. P., Fricker, M. D., Yumiki, K., Kobayashi, R. & Nakagaki, T. 2010. Rules for biologically inspired adaptive network design. Science, 327, 439–442.

Tester, M. & Davenport, R. 2003. Na+ tolerance and Na+ transport in higher plants. Annals of botany, 91, 503–527.

Theraulaz, G., Gautrais, J., Camazine, S. & Deneubourg, J.-L. 2003. The formation of spatial patterns in social insects: from simple behaviours to complex structures. Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences, 361, 1263–82.

Therneau, T. M. & Therneau, M. T. M. 2015. Package “coxme.”R package version, 2,

Thomas, J. A., Moss, C. F. & Vater, M. 2004. Echolocation in bats and dolphins. University of Chicago press.

Thompson, R. F. 2009. Habituation: a history. Neurobiology of learning and memory, 92, 127.

Thompson, R. F. & Spencer, W. A. 1966. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. Psychological review, 73, 16.

Totz, J. F., Rode, J., Tinsley, M. R., Showalter, K. & Engel, H. 2018. Spiral wave chimera states in large populations of coupled chemical oscillators. Nature Physics, 14, 282–285.

Tran, H., Stephenson, S. & Pollock, E. 2015. Evaluation of *Physarum polycephalum* plasmodial growth and lipid production using rice bran as a carbon source. BMC biotechnology, 15, 1–7.

Trewavas A. 2003. Aspects of plant intelligence. Annals of botany. 92(1), 1-20.

Trewavas, A. 2017. The foundations of plant intelligence. Interface focus, 7, 20160098.

Tsai, T. Y.-C., Choi, Y. S., Ma, W., Pomerening, J. R., Tang, C. & Ferrell, J. E. 2008. Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops. Science, 321, 126–129.

Tsuda, S. & Jones, J. 2011. The emergence of synchronization behavior in *Physarum polycephalum* and its particle approximation. Bio Systems, 103, 331–41.

Tyson, J. & Kauffman, S. 1975. Control of mitosis by a continuous biochemical oscillation: synchronization; spatially inhomogeneous oscillations. Journal of Mathematical Biology, 1, 289–310.

Ueda, T. 1993. Pattern dynamics in cellular perception. Phase Transitions: A Multinational Journal, 45, 93–104.

Ueda, T., Terayama, K., Kurihara, K. & Kobatake, Y. 1975. Threshold phenomena in chemoreception and taxis in slime mold *Physarum polycephalum*. The Journal of general physiology, 65, 223–234.

Ueda, T., Hirose, T. & Kobatake, Y. 1980. Membrane biophysics of chemoreception and taxis in the plasmodium of *Physarum polycephalum*. Biophysical chemistry, 11, 461–473.

Ueda, T., Matsumoto, K., Akitaya, T. & Kobatake, Y. 1986. Spatial and temporal organization of intracellular adenine nucleotides and cyclic nucleotides in relation to rhythmic motility in Physarum plasmodium. Experimental cell research, 162, 486–494.

Ueda, T., Mori, Y. & Kobatake, Y. 1987. Patterns in the distribution of intracellular ATP concentration in relation to coordination of amoeboid cell behavior in *Physarum polycephalum*. Experimental cell research, 169, 191–201.

Ueda, K.-I., Takagi, S., Nishiura, Y. & Nakagaki, T. 2011. Mathematical model for contemplative amoeboid locomotion. Physical Review E, 83, 021916.

Umedachi, T., Takeda, K., Nakagaki, T., Kobayashi, R. & Ishiguro, A. 2010. Fully decentralized control of a soft-bodied robot inspired by true slime mold. Biological cybernetics, 102, 261–269.

Vallverdú, J., Castro, O., Mayne, R., Talanov, M., Levin, M., Baluska, F., Gunji, Y., Dussutour, A., Zenil, H. & Adamatzky, A. 2018. Slime mould: the fundamental mechanisms of biological cognition. Biosystems, 165, 57–70.

Van Duijn, M. 2017. Phylogenetic origins of biological cognition: convergent patterns in the early evolution of learning. Interface Focus, 7, 20160158.

Van Duijn, M., Keijzer, F. & Franken, D. 2006. Principles of minimal cognition: Casting cognition as sensorimotor coordination. Adaptive Behavior, 14, 157–170.

Van Helvert, S., Storm, C. & Friedl, P. 2018. Mechanoreciprocity in cell migration. Nature cell biology, 20, 8–20.

Van Valen, L. 1965. Morphological variation and width of ecological niche. The American Naturalist, 99, 377–390.

Varela, F. G., Maturana, H. R. & Uribe, R. 1974. Autopoiesis: The organization of living systems, its characterization and a model. Biosystems, 5, 187–196.

Vázquez-Rodriguez, B., Avena-Koenigsberger, A., Sporns, O., Griffa, A., Hagmann, P. & Larralde, H. 2017. Stochastic resonance at criticality in a network model of the human cortex. Scientific reports, 7, 1–12.

Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E. & others. 2008. Plant ABC proteins-a unified nomenclature and updated inventory. Trends in plant science, 13, 151–159.

Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T.E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J. & others. (2020). SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. Nature methods, 17, 261–272.

Vogel, D., Nicolis, S. C., Perez-Escudero, A., Nanjundiah, V., Sumpter, D. J. & Dussutour, A. 2015. Phenotypic variability in unicellular organisms: from calcium signalling to social behaviour. Proc. R. Soc. B, 282, 20152322.

Vogel, D. & Dussutour, A. 2016. Direct transfer of learned behaviour via cell fusion in non-neural organisms. Proc. R. Soc. B, 283, 20162382.

Vogel, D., Gautrais, J., Perna, A., Sumpter, D. J., Deneubourg, J. L., & Dussutour, A. (2016). Transition from isotropic to digitated growth modulates network formation in *Physarum polycephalum*. Journal of Physics D: Applied Physics, 50(1), 014002.

Vogel, D., Dussutour, A. & Deneubourg, J.-L. 2018. Symmetry breaking and inter-clonal behavioural variability in a slime mould. Biology Letters, 14, 20180504.

Von Schweinitz, L. D. 1822. Schriften der Naturforschenden Gesellschaft zu Leipzig. bei Johann Ambrosius Berth.

Von Uexküll, J. 1934. Streifzüge durch die Umwelten von Tieren und Menschen [A Foray into the Worlds of Animals and Humans]. Berlin, Germany: Verlag von Julius Springer,

Wan, K. Y. & Jékely, G. 2021. Origins of eukaryotic excitability. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 376, 20190758.

Watanabe, S., Tero, A., Takamatsu, A. & Nakagaki, T. 2011. Traffic optimization in railroad networks using an algorithm mimicking an amoeba-like organism, Physarum plasmodium. Biosystems, 105, 225–232.

Watson, B. O. & Buzsáki, G. 2015. Sleep, memory & brain rhythms. Daedalus, 144, 67–82.

Westerhoff, H. V., Brooks, A. N., Simeonidis, E., Garcia-Contreras, R., He, F., Boogerd, F. C., Jackson, V. J., Goncharuk, V. & Kolodkin, A. 2014. Macromolecular networks and intelligence in microorganisms. Frontiers in microbiology, 5, 379.

Wilting, J. & Priesemann, V. 2018. Inferring collective dynamical states from widely unobserved systems. Nature communications, 9, 1–7.

Wohlfarth-Bottermann, K. E. 1979. Oscillatory contraction activity in Physarum. The Journal of experimental biology, 81, 15–32.

Wolf, R., Niemuth, J. & Sauer, H. 1997. Thermotaxis and protoplasmic oscillations in *Physarum* plasmodia analyzed in a novel device generating stable linear temperature gradients. Protoplasma, 197, 121–131.

Wood, D. C. 1988. Habituation in Stentor: a response-dependent process. Journal of Neuroscience, 8, 2248–2253.

Wood, D. & Squire, L. 1992. Learning and adaptive plasticity in unicellular organisms. Encyclopedia of learning and memory, 623–624.

Wunderlich, T., Kungl, A. F., Müller, E., Hartel, A., Stradmann, Y., Aamir, S. A., Grübl, A., Heimbrecht, A., Schreiber, K., Stöckel, D. & others. 2019. Demonstrating advantages of neuromorphic computation: a pilot study. Frontiers in neuroscience, 13, 260.

Xing, F., Xie, Y., Su, H., Liu, F. & Yang, L. 2017. Deep learning in microscopy image analysis: A survey. IEEE transactions on neural networks and learning systems, 29, 4550–4568.

Yamada, K. M. & Mayor, R. 2016. Cell dynamics in development, tissue remodelling, and cancer. Current opinion in cell biology, 42, iv.

Yamada, H., Nakagaki, T. & Ito, M. 1999. Pattern formation of a reaction-diffusion system with self-consistent flow in the amoeboid organism *Physarum* plasmodium. Physical Review E, 59, 1009.

Yoshida, K., Okada, M., Nagasaka, R., Sasaki, H., Okada, M., Kanie, K. & Kato, R. (2019). Time-course colony tracking analysis for evaluating induced pluripotent stem cell culture processes. Journal of bioscience and bioengineering, 128, 209–217.

Yoshimoto, Y. & Kamiya, N. 1984. ATP- and calcium-controlled contraction in a saponin model of *Physarum polycephalum*. Cell structure and function, 9, 135–141.

Yoshimoto, Y., Matsumura, F. & Kamiya, N. 1981. Simultaneous oscillations of Ca2+ efflux and tension generation in the permealized plasmodial strand of *Physarum*. Cell motility, 1, 433–443.

Yoshiyama, S., Ishigami, M., Nakamura, A. & Kohama, K. 2010. Calcium wave for cytoplasmic streaming of *Physarum polycephalum*. Cell biology international, 34, 35–40.

Young, M. W. & Kay, S. A. 2001. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. Nature Reviews Genetics, 2, 702–715.

Yu, J. Y., Kanai, M. I., Demir, E., Jefferis, G. S. X. E. & Dickson, B. J. 2010. Cellular organization of the neural circuit that drives Drosophila courtship behavior. Current biology : CB, 20, 1602–14.

Zamir, M. 2016. Hemo-dynamics. Springer.

Zentall, T. R., Wasserman, E. A., Lazareva, O. F., Thompson, R. K. & Rattermann, M. J. 2008. Concept learning in animals. Comparative Cognition & Behavior Reviews,

Zhang, X., Gao, C., Deng, Y. & Zhang, Z. 2016. Slime mould inspired applications on graph-optimization problems. In: Advances in Physarum Machines, pp. 519–562. Springer.

