

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 642

Ecole doctorale Végétal, Animal, Aliment, Mer, Environnement

Spécialité : biotechnologie

Par

Ivan CITAKOVIC

Improvement of Amphidinol 18 productivity in the dinoflagellate microalga *Amphidinium carterae* by random mutagenesis

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18.3.2026.

Unité de recherche : Unité PHYTOX, Laboratoire PHYSALG, IFREMER,

Rapporteurs avant soutenance :

Olivier Bernard	Directeur de recherche – Inria (France)
Claire Remacle	Professeure – Université de Liège (Belgique)

Composition du Jury :

Président :	Catherine Roullier	Professeure – Nantes Université (France)
Examineurs :	Claire Remacle	Professeure – Université de Liège (Belgique)
	Olivier Bernard	Directeur de recherche – Inria (France)
	Filipa Lopes	Professeure – CentraleSupélec, LGPM (France)
	Hubert Bonnefond	CEO – DarWin Evolution (France)
Dir. de thèse :	Mairet Francis	Chercheur – IFREMER (France)
Co-dir. de thèse :	Bougaran Gaël	Responsable du laboratoire PHYSALG – IFREMER (France)
Co-dir. de thèse :	Saint-Jean Bruno	Chercheur– IFREMER (France)

Invité(s)

Cyril El Khoury

CTO – Immunrise Biocontrol France (France)

Titre : Amélioration de la productivité de l'amphidinol 18 chez la microalgue dinoflagellée *Amphidinium carterae* par mutagenèse aléatoire

Mots clés : *Amphidinium carterae*, amphidinols, biocontrôle, amélioration de souches, culture de microalgues

Résumé : Face aux pressions croissantes visant à réduire les résidus de pesticides et l'accumulation de métaux lourds dans les sols agricoles, les microalgues marines suscitent un intérêt grandissant en tant que sources de biopesticides durables. Parmi ces microalgues, *Amphidinium carterae* est particulièrement reconnue pour sa production d'amphidinols (AMs), une famille de métabolites polykétidiques présentant une forte activité antimicrobienne contre des maladies fongiques dévastatrices des cultures. ImmunRise Biocontrol France (IBF) compte parmi les entreprises pionnières dans le développement de solutions de biocontrôle issues de micro-organismes marins. Ces dernières années, l'entreprise s'est concentrée sur la création de biopesticides à base d'amphidinols produits par *A. carterae*. Cependant, l'augmentation de la production d'amphidinols à l'échelle industrielle demeure complexe, en raison du manque de souches performantes ainsi que de connaissances limitées sur les facteurs environnementaux et physiologiques contrôlant la biosynthèse et l'excrétion des AMs. Ce manque de connaissances limite également l'optimisation des conditions de culture de *A. carterae* et l'identification des fenêtres de récolte optimales. Ce projet de thèse, mené dans le cadre d'un partenariat entre l'IFREMER et IBF, avait pour objectif principal d'améliorer la productivité de l'AM18 dans la souche industrielle ICC001. En parallèle, la démarche scientifique visait à identifier les facteurs clés régulant la production et les dynamiques d'excrétion des AMs chez *A. carterae*.

Pour répondre aux objectifs scientifiques, deux études expérimentales complémentaires ont été menées : la première a examiné l'accumulation des AMs au cours des phases de croissance sous conditions environnementales fixes ; la seconde a analysé les dynamiques intra- et extracellulaires des AMs sous différentes intensités lumineuses en phase stationnaire prolongée. Les résultats combinés des deux études ont montré que la productivité en amphidinols atteint son maximum entre la fin de la croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire, une augmentation de l'intensité lumineuse favorisant une récolte plus précoce dans cette période. De plus, les amphidinols ont été retrouvés quasi exclusivement dans les cellules algales, indiquant que la biomasse représente la principale source de récupération et de valorisation des AMs. Parallèlement, les efforts de mutagenèse et de criblage ont permis de sélectionner plusieurs souches améliorées présentant jusqu'à 2 fois plus d'AMs intracellulaires que la souche sauvage à certaines phases de croissance, ainsi qu'une augmentation allant jusqu'à 20 % de la vitesse de croissance maximale. Ces résultats démontrent que la stratégie d'amélioration de souches utilisée constitue une approche pertinente pour augmenter significativement la production d'amphidinols et les performances de croissance, améliorant ainsi la productivité globale des cultures de *A. carterae*. Ensemble, les travaux de cette thèse relient des connaissances fondamentales sur le métabolisme des amphidinols à des stratégies appliquées d'amélioration de souches et d'optimisation du moment de récolte, établissant une base solide pour l'exploitation industrielle de *A. carterae* comme plateforme durable de production de biopesticides d'origine marine.

Title : Improvement of Amphidinol 18 productivity in the dinoflagellate microalga *Amphidinium carterae* by random mutagenesis

Keywords : *Amphidinium carterae*, amphidinols, biocontrol, strain improvement, microalgae cultivation

Abstract : As agriculture faces increasing pressure to reduce pesticide residues and heavy metal accumulation in soil, marine microalgae are attracting growing interest as sustainable biopesticide sources. Among microalgae species, *Amphidinium carterae* is recognized for its production of amphidinols (AMs), a family of polyketide metabolites with strong antimicrobial activity against devastating crop fungal diseases. ImmunRise Biocontrol France (IBF) is one of the pioneer companies in developing biocontrol solutions derived from marine microorganisms. In recent years, it has focused on creating amphidinol-based biopesticides from *A. carterae*. However, scaling up amphidinol production remains challenging due to the lack of high performing industrial strains and limited knowledge of the environmental and physiological drivers of AM biosynthesis and excretion. Moreover, mentioned knowledge gap restricts optimization of *A. carterae* culture conditions and the identification of optimal harvesting windows. This PhD project, carried out through a partnership between IFREMER and IBF, aimed to improve the AM18 productivity in industrial strain ICC001 as a primary goal. In parallel, the scientific component of the project focused on elucidating the key factors regulating AM production and excretion dynamics in *A. carterae*. To address the core scientific objectives of the PhD, two complementary experimental studies were conducted. The first explored AM accumulation across growth phases under fixed environmental conditions, while the second examined the intra- and extracellular dynamics of AMs under varying light intensities during the period of prolonged stationary phase.

The combined results of two studies showed that amphidinol productivity has the highest peak in the period between linear growth and early stationary phase, with increased light intensity favoring earlier harvests within this period. Furthermore, AMs were found to be almost entirely retained within algal cells, indicating that biomass represents the primary source for AM recovery and valorization. In parallel, the mutagenesis and screening efforts led to the selection of several improved strains exhibiting up to 2 times higher intracellular amphidinol content compared to wild-type strain in certain growth phases and up to 20% higher maximal growth rates. These results highlighted the used strain improvement technique as a promising strategy to significantly enhance amphidinol production and growth performance, thereby boosting the overall productivity of *A. carterae* cultures. Together, thesis results connect fundamental insights into amphidinol metabolism with applied strategies for strain improvement and *A. carterae* harvesting timing optimization, establishing a strong foundation for the industrial exploitation of *A. carterae* as a sustainable marine microalgal platform for biopesticide production.