

**APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026
CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant**

INTITULÉ DU PROJET			
Functional characterization of NAD⁺, a new regulator of stomatal signaling and drought response Caractérisation fonctionnelle du NAD⁺, un nouveau régulateur de la signalisation stomatique et de la réponse à la sécheresse			
1- Directrice ou directeur de thèse HDR			
NOM	COSTE	Prénom	Bertrand
Téléphone portable	(+33) 06 10 37 50 66	Courriel	Bertrand.COSTE@cea.fr
Unité de recherche (UR) de rattachement			
Code (acronyme et n°) de l'UR à AMU :		BIAM UMR7265	
Nom de l'UR :		BIAM - Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille - CEA/CNRS/AMU	
Directrice ou directeur de l'UR			
Nom	PIGNOL	Prénom	David

2- Codirectrice ou codirecteur de thèse, le cas échéant			
NOM	FEITOSA ARAUJO	Prénom	Elias
Téléphone portable	(+33) 07 88 16 79 59	Courriel	elias.feitosaaraujo@cea.fr
Unité de recherche (UR) de rattachement			
Code (acronyme et n°) de l'UR à AMU :		BIAM UMR7265	
Nom de l'UR :		BIAM - Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille - CEA/CNRS/AMU	
Directrice ou directeur de l'UR			
Nom	PIGNOL	Prénom	David

SPECIALITE :

Biologie du Développement / Biologie Végétale / Biotechnologie

SOUS JURY POUR LE CONCOURS : (Rayer les mentions inutiles)

JURY 1 : BIOLOGIE CELLULAIRE

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

ENGLISH VERSION

Project description

Drought limits agricultural productivity and threatens global food security, challenges that are exacerbated by the increasing frequency and severity of drought events due to climate change. Stomatal regulation is vital for plant water-use efficiency and drought resilience. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), a metabolic coenzyme, is emerging as an important regulator in this process, though its interaction with abscisic acid (ABA) - a key drought hormone - remains unclear in guard cell signaling. This project uses a targeted genetic approach to control the levels of NAD⁺ specifically in guard cells, isolating its role in stomatal regulation under normal and drought conditions. It will explore whether NAD⁺ acts independently or alongside ABA-mediated stomatal signaling and identify downstream effectors. Through transcriptomic, molecular, physiological, and metabolic analyses, the study aims to uncover targets for enhancing drought tolerance. Ultimately, this work aims to reveal novel signaling functions of NAD⁺ in guard cells, offering new possibilities for metabolic engineering within these cells to improve crop drought resilience.

Keywords

NAD⁺, redox, stomatal signaling, metabolism, drought, water use efficiency

Theme / Field / Context

Water scarcity in agriculture is projected to become increasingly severe in the coming decades, posing a major threat to global food security. Drought stress, driven by limited water availability, significantly impairs plant physiology, growth, development, and ultimately, crop productivity. As a result, there is a growing urgency in agricultural research to identify genetic, molecular, and physiological targets that can enhance plant resilience to drought and a better management of water-use by crops. The plant hormone abscisic acid (ABA) is a central regulator of drought responses, primarily by promoting the closure of stomata, tiny pores in the epidermis formed by pairs of guard cells that regulate water loss and gas exchange. By inducing stomatal closure in response to drought, ABA plays a critical role in minimizing water loss and maintain biomass production under drought conditions¹. Plant responses to drought involve complex regulatory networks, and recent evidence also suggests that the metabolic cofactor nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) contributes significantly to these responses. Alterations in NAD⁺ biosynthesis, distribution, and accumulation affect drought tolerance, suggesting that NAD⁺ may function as a potential signaling molecule in drought stress responses²⁻⁷. Both our research and that of others indicate a strong correlation between intracellular NAD⁺ levels and ABA accumulation and ABA signaling^{4,8}. More specifically, NAD⁺ metabolism appears to influence ABA hypersensitivity through reactive hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation. This process is mediated by SNF1-related protein kinase 2 (SnRK2) and the plasma membrane respiratory burst oxidase homolog protein F (RBOHF), key ABA signaling components in stomata⁴. In addition, the ABA-INSENSITIVE-4 (ABI4) transcription factor, required for downstream ABA signaling, directly represses the promoter of *QUINOLINATE SYNTHASE* (QS), a critical gene in the NAD⁺ biosynthesis pathway. This repression reduces NAD⁺ production, suggesting a feedback loop between NAD⁺ metabolism and ABA signaling. Notably, the ABA hypersensitivity of the *qs* mutant is rescued by exogenous NAD⁺ intermediates, including nicotinic acid (NA) and nicotinate mononucleotide (NaMN), further supporting their regulatory relationship. NAD⁺ biosynthesis also appears to play a protective role in guard cells against ABA-induced oxidative stress by regulating NMNAT activity. Consistently, NMNAT activity is markedly upregulated in guard cells upon ABA exposure, likely as a compensatory response to increased NAD⁺ degradation by NADases activated by ABA⁶. However, the precise role of NAD⁺ in stomatal regulation, particularly whether it acts through ABA dependent or independent pathways, remains unresolved. Recent studies linking NAD⁺ and ABA have focused on cell types other than guard cells, leaving a critical gap in our understanding of NAD⁺

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

function specifically within guard cells. Recent findings show that targeted overexpression of NAD(P)H oxidases in stomatal precursor cells reduces stomatal density and conductance, improving drought tolerance⁷. This suggests that localized manipulation of NAD redox status could be a novel strategy to enhance drought resilience without broadly affecting development. These results build on prior work by the project proponent, which showed that intracellular NAD⁺ distribution across organelles strongly influences stomatal development and patterning in *Arabidopsis thaliana*⁸. Our preliminary data further reveal that: (I) NAD⁺ biosynthetic genes are more highly expressed in guard cells than in mesophyll cells⁸, indicating active NAD⁺ production in stomata; (II) Mutants of the *ASPARTATE OXIDASE* gene, which have lower NAD⁺ levels, show higher stomatal conductance under light compared to wild-type plants. This phenotype is fully reversed by genetic complementation that restores NAD⁺ levels; (III) Exogenous application of NAD⁺ to detached leaves induces stomatal closure in a dose-dependent manner, with significant effects observed at concentrations as low as 50 μ M; and (IV) To further investigate the role of NAD⁺ in guard cell signaling, we engineered a construct to drive its overproduction specifically in stomata by expressing *ASPARTATE OXIDASE* under the control of the guard cell specific promoter MYB60⁹ (pMYB60::AO). This targeted expression led to a reduction of more than 50% in stomatal conductance without any visible impairment in plant development, suggesting that NAD⁺ is an important regulator of stomatal aperture. **The goal of this project is to elucidate the role of NAD⁺ as a signaling molecule in guard cells, with the ultimate aim of enhancing drought resilience by metabolic engineering of guard cells.** While NAD⁺ is a well-known metabolic redox cofactor, its emerging signaling roles in guard cells, particularly its interaction with the ABA pathway remain largely unexplored. To investigate this, this project will employ guard cell-specific genetic modulation of NAD⁺ levels alongside transcriptomic analyses, physiological and biochemical assays, and real-time *in vivo* monitoring of physiological parameters using genetically encoded biosensors. By focusing on guard cells, we aim to reveal novel functions of NAD⁺ as a signaling molecule under both optimal and drought conditions. These insights will pave the way for agricultural innovation through targeted guard cell NAD⁺ metabolic engineering.

Method

Growth conditions: This project will primarily use *Arabidopsis thaliana* (Col-0) as the model system. Plants will be grown in controlled chambers with precise regulation of light, humidity, watering, CO₂, and fertilization. Seeds will be stratified at 4°C in the dark for 2 days, then grown under short-day conditions (8 h light/16 h dark) at 130 μ mol m⁻² s⁻¹ light intensity. Drought experiments will utilize chambers with automated control of light, humidity, irrigation, pot weight, transpiration, chlorophyll fluorescence, and leaf area. The genetic backgrounds used in this work will be detailed within each relevant methods section.

The thesis project is structured around three objectives with complementary outputs, and the methodologies are aligned with the specific aims of each objective.

Objective 1: Characterize NAD⁺ as a novel regulator of stomatal signaling and drought responses

1a. Is NAD⁺-mediated stomatal signaling specific to NAD⁺? The stomatal aperture responses of Col-0 plants to NAD⁺, NADH, NADP⁺, and NADPH treatments will be examined to determine whether NAD-mediated stomatal signaling is specifically associated with NAD⁺ or involves other redox forms. Epidermal peels will be treated with exogenous NAD(P)(H) compounds, and stomatal aperture will be measured.

1b. How does NAD⁺ contribute to stomatal behavior? To assess the contribution of NAD⁺ to stomatal behavior, stomatal dynamics will be characterized in Col-0, *ao-1* and *ao-3* (lines producing low levels of NAD⁺ systemically) and Col-0-pMYB60::AO lines, which are expected to exhibit elevated NAD⁺ levels specifically in guard cells. Responses will be analyzed under step changes in vapor pressure deficit (VPD), light and CO₂, during light-to-dark transitions, and following ABA-induced stomatal closure. These

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

responses will be quantified using a combination of complementary techniques: stomatal dynamics will be measured using a portable photosynthesis system (LI-COR 6800), while stomatal aperture will be assessed by light microscopy. Additionally, stomatal conductance in *ao-1*-pMYB60::AO and *ao-3*-pMYB60::AO lines will be evaluated to test if NAD⁺ production in guard cells rescues their elevated stomatal conductance phenotype. *The genetic lines necessary to complete this section are currently available and accessible.*

1c. Is NAD⁺-mediated stomatal regulation driven by redox and/or pH changes? Genetically encoded biosensors to monitor real-time dynamics of key redox couples NADH/NAD⁺ (Peredox-mCherry)¹⁰, NADPH/NADP⁺ (NAPstars)¹¹, and H₂O₂ (roGFP2-ORP1)¹², and intracellular pH (cyt-cpYFP)¹³ in the cytosol of guard cells of Col-0-pMYB60::AO stably expressing these biosensors will be used. The aim is to clarify whether the stomatal aperture mediated by NAD arise directly from changes in NAD⁺ levels or from broader alterations in redox status and/or intracellular pH. This distinction will help identifying potential downstream targets of NAD⁺ and guide efforts to elucidate the mechanism underlying NAD⁺-mediated stomatal signaling. Col0-pMYB60::AO lines expressing biosensors are currently being generated.

1d. What is the impact of NAD⁺-mediated stomatal signaling on plant performance and drought resilience? Whole-plant growth performance - including biomass accumulation and seed yield - in Col0 and Col-0 pMYB60::AO lines under both well-watered and drought conditions will be evaluated. Drought experiments will be conducted using the IMAPLANT phenotyping facility at our institute (BIAM), which enables automated, real-time monitoring and control of light, humidity, irrigation, pot weight, transpiration, chlorophyll fluorescence, and leaf area. In parallel, samples will be collected at selected time points for guard cell metabolite profiling, as well as quantification of ABA and NAD(P)(H) levels.

Objective 2: Determine the contribution of ABA to NAD⁺-mediated stomatal signaling

Does NAD⁺-mediated stomatal signaling depend on ABA? Given the emerging link between NAD⁺ metabolism and ABA signaling, we propose to investigate the crosstalk between NAD⁺ and ABA in guard cell signaling. This interaction represents our primary candidate for testing whether NAD⁺-mediated regulation of stomatal function operates through an ABA-dependent mechanism. Stomatal movement assays will be conducted as in (1a) on ABA-deficient (*aba3*) and ABA-insensitive (*ost2-2D*, *abi4*, *rbohF*) mutants carrying the pMYB60::AO construct. Stomatal conductance measurements will be used to assess whether NAD⁺ can induce stomatal closure independently of ABA content and signaling pathways. In parallel, dose-response analyses of ABA-induced stomatal closure in the NAD⁺-deficient mutant lines *ao-1* and *ao-3* will be performed. These complementary approaches aim to shed light on the relationship between NAD⁺ and ABA signaling pathways in regulating stomatal behavior, exploring whether NAD⁺ acts upstream, downstream, or through independent mechanisms. *Genetic lines have already been generated and are in T3 generation.*

Objective 3: Identify NAD⁺-regulated gene expression in guard cells and uncover candidate ABA-independent pathways

How does NAD⁺ influence gene expression during stomatal opening? To capture gene expression dynamics underlying stomatal opening, bulk RNA sequencing will be conducted on isolated guard cells from Col-0 and Col-0-pMYB60::AO lines collected during the dark-to-light transition. This strategy will provide a comprehensive profile of NAD⁺-dependent transcriptional responses in guard cells, uncovering both ABA-dependent and ABA-independent pathways. Differential expression analysis will identify candidate genes that may mediate NAD⁺-regulated stomatal function. The most promising candidates will undergo functional validation via genetic approaches to elucidate their roles in guard cell signaling.

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

Expected results

This project will investigate a novel role for NAD⁺ in stomatal signaling and plant drought responses, aiming to uncover previously unrecognized NAD⁺-mediated regulatory pathways. By combining physiological, molecular, and metabolic analyses, we expect to reveal how NAD⁺ controls stomatal behavior, photosynthesis, and water use efficiency under drought stress. These findings have the potential to advance fundamental understanding of plant stress physiology and are anticipated to lead to a high-impact publication in a top-tier international journal, establishing NAD⁺ as a promising target for improving crop drought tolerance.

Références bibliographiques

1. Wei, Y. S., Javed, T., Liu, T. T., Ali, A., & Gao, S. J. (2025). Mechanisms of Absciscic acid (ABA)-mediated plant defense responses: An updated review. *Plant Stress*, 15, 100724.
2. Ahmad, Z., Bashir, K., Matsui, A., Tanaka, M., Sasaki, R., Oikawa, A., ... & Seki, M. (2021). Overexpression of nicotinamidase 3 (NIC3) gene and the exogenous application of nicotinic acid (NA) enhance drought tolerance and increase biomass in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 107(1), 63-84.
3. Wang, X., Li, B. B., Ma, T. T., Sun, L. Y., Tai, L., Hu, C. H., ... & Chen, K. M. (2020). The NAD kinase OsNADK1 affects the intracellular redox balance and enhances the tolerance of rice to drought. *BMC Plant Biology*, 20, 1-19.
4. Hong, Y., Wang, Z., Shi, H., Yao, J., Liu, X., Wang, F., ... & Zhu, J. K. (2020). Reciprocal regulation between nicotinamide adenine dinucleotide metabolism and abscisic acid and stress response pathways in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 16(6), e1008892.
5. Sun, L., Li, Y., Miao, W., Piao, T., Hao, Y., & Hao, F. S. (2017). NADK2 positively modulates abscisic acid-induced stomatal closure by affecting accumulation of H₂O₂, Ca²⁺ and nitric oxide in Arabidopsis guard cells. *Plant Science*, 262, 81-90.
6. Hashida, S. N., Itami, T., Takahashi, H., Takahara, K., Nagano, M., Kawai-Yamada, M., ... & Uchimiya, H. (2010). Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 61(13), 3813-3825.
7. Bouvier, J. W., & Kelly, S. (2025). Metabolic engineering of stomatal precursor cells enhances photosynthetic water-use efficiency and vegetative growth under water-deficit conditions in Arabidopsis thaliana. *Plant Biotechnology Journal*.
8. Feitosa-Araujo, E., da Fonseca-Pereira, P., Pena, M. M., Medeiros, D. B., Perez de Souza, L., Yoshida, T., ... & Nunes-Nesi, A. (2020). Changes in intracellular NAD status affect stomatal development in an abscisic acid-dependent manner. *The Plant Journal*, 104(5), 1149-1168.
9. Rusconi, F., Simeoni, F., Francia, P., Cominelli, E., Conti, L., Riboni, M., ... & Galbiati, M. (2013). The Arabidopsis thaliana MYB60 promoter provides a tool for the spatio-temporal control of gene expression in stomatal guard cells. *Journal of experimental botany*, 64(11), 3361-3371.
10. Steinbeck, J., Fuchs, P., Negroni, Y. L., Elsässer, M., Lichtenauer, S., Stockdreher, Y., ... & Schwarzländer, M. (2020). In vivo NADH/NAD⁺ biosensing reveals the dynamics of cytosolic redox metabolism in plants. *Plant Cell*, 32(10), 3324-3345.
11. Scherschel, M., Niemeier, J. O., Jacobs, L. J., Hoffmann, M. D., Diederich, A., Bell, C., ... & Morgan, B. (2024). A family of NADPH/NADP⁺ biosensors reveals in vivo dynamics of central redox metabolism across eukaryotes. *Nature communications*, 15(1), 10704.
12. Nietzel, T., Elsässer, M., Ruberti, C., Steinbeck, J., Ugalde, J. M., Fuchs, P., ... & Schwarzländer, M. (2019). The fluorescent protein sensor ro GFP 2-Orp1 monitors in vivo H₂O₂ and thiol redox integration and elucidates intracellular H₂O₂ dynamics during elicitor-induced oxidative burst in Arabidopsis. *New Phytologist*, 221(3), 1649-1664.
13. Schwarzländer, M., Wagner, S., Ermakova, Y. G., Belousov, V. V., Radi, R., Beckman, J. S., ... & Murphy, M. P. (2014). The 'mitoflash'probe cpYFP does not respond to superoxide. *Nature*, 514(7523), E12-E14.

Scientific, material, and financial conditions of the research project

The PhD project will be carried out at BIAM (CEA Cadarache), which offers state-of-the-art experimental infrastructures. The institute provides controlled growth chambers to simulate water stress under precisely regulated temperature, light, humidity, and CO₂ conditions. Specialized equipment is available for phenotyping and gas exchange analyses (e.g., LICOR systems, infrared imaging), as well as for biochemical and molecular analyses, including metabolite quantification and gene expression studies. All experiments will be conducted under established safety protocols, with appropriate technical training and support ensuring secure and efficient project implementation. The hosting laboratory possesses all the necessary financial resources to fully support the development and successful completion of the project thesis.

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

Profil et compétences recherchées - Profile and skills required

To successfully carry out this PhD project, we are seeking a highly motivated candidate with a strong interest in plant science, particularly plant physiology, metabolism, and mechanisms of drought tolerance. The ideal candidate will have a solid background in plant biology, complemented by knowledge of plant genetics, molecular techniques, plant metabolism, and stomatal signaling.

Required skills include:

1. Experience in plant physiology techniques, particularly gas exchange measurements, photosynthesis, stomatal regulation, and metabolic analyses under drought conditions.
2. Experience in molecular biology, including RNA/DNA extraction, PCR, qPCR, and gene expression analysis.
3. Strong analytical abilities, with competence in biological data analysis, bioinformatics, and statistics.
4. Ability to work independently, while effectively communicating scientific results.

The successful candidate should be conscientious, highly motivated, and able to collaborate effectively within a multidisciplinary team.

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

VERSION FRANÇAISE

Description de la problématique de recherche

La sécheresse limite la productivité agricole et menace la sécurité alimentaire mondiale, des défis qui sont aggravés par l'augmentation de la fréquence et de la gravité des épisodes de sécheresse due au changement climatique. La régulation stomatique est essentielle pour l'efficacité d'utilisation de l'eau chez les plantes et leur résilience face à la sécheresse. Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺), un coenzyme métabolique, apparaît comme un régulateur important dans ce processus, bien que son interaction avec l'acide abscissique (ABA), une hormone clé de la réponse à la sécheresse, demeure encore mal comprise dans la signalisation des cellules de garde. Ce projet utilise une approche génétique ciblée afin de contrôler les niveaux de NAD⁺ spécifiquement dans les cellules de garde, permettant d'isoler son rôle dans la régulation stomatique en conditions normales et en situation de sécheresse. Il examinera si le NAD⁺ agit indépendamment ou en interaction avec la signalisation stomatique médiée par l'ABA, et identifiera les effecteurs en aval. Grâce à des analyses transcriptomiques, moléculaires, physiologiques et métaboliques, cette étude vise à mettre en évidence des cibles permettant d'améliorer la tolérance à la sécheresse. Ce travail ambitionne de révéler de nouvelles fonctions de signalisation du NAD⁺ dans les cellules de garde, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour l'ingénierie métabolique de ces cellules afin d'améliorer la résilience des cultures face à la sécheresse.

Mots clés

NAD⁺, redox, signalisation stomatique, métabolisme, sécheresse, efficacité d'utilisation de l'eau

Thématique / Domaine / Contexte

La raréfaction de l'eau en agriculture devrait devenir de plus en plus sévère au cours des prochaines décennies, constituant une menace majeure pour la sécurité alimentaire mondiale. Le stress hydrique, provoqué par une disponibilité limitée en eau, altère significativement la physiologie, la croissance, le développement des plantes et, en fin de compte, la productivité des cultures. Par conséquent, il devient urgent, en recherche agronomique, d'identifier des cibles génétiques, moléculaires et physiologiques capables d'améliorer la résilience des plantes à la sécheresse ainsi que la gestion de l'utilisation de l'eau par les cultures. L'hormone végétale acide abscissique (ABA) est un régulateur central des réponses à la sécheresse, principalement en favorisant la fermeture des stomates, de minuscules pores de l'épiderme formés par des paires de cellules de garde qui régulent la perte d'eau et les échanges gazeux. En induisant la fermeture stomatique en réponse à la sécheresse, l'ABA joue un rôle essentiel dans la limitation des pertes en eau et le maintien de la production de biomasse en conditions de déficit hydrique¹. Les réponses des plantes à la sécheresse impliquent des réseaux de régulation complexes, et des données récentes suggèrent également que le cofacteur métabolique nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) contribue de manière significative à ces réponses. Des altérations de la biosynthèse, de la distribution et de l'accumulation du NAD⁺ affectent la tolérance à la sécheresse, suggérant que le NAD⁺ pourrait agir comme une molécule de signalisation potentielle dans les réponses au stress hydrique²⁻⁷. Nos travaux ainsi que ceux d'autres équipes indiquent une forte corrélation entre les niveaux intracellulaires de NAD⁺, l'accumulation d'ABA et la signalisation de l'ABA^{4,8}. Plus précisément, le métabolisme du NAD⁺ semble influencer l'hypersensibilité à l'ABA via l'accumulation de peroxyde d'hydrogène réactif (H₂O₂). Ce processus est médié par la protéine SNF1-related protein kinase 2 (SnRK2) et par la protéine respiratory burst oxidase homolog protein F (RBOHF), composants clés de la signalisation ABA dans les stomates⁴. De plus, le facteur de transcription ABA-INSENSITIVE-4 (ABI4), requis pour la signalisation en aval de l'ABA, réprime directement le promoteur de *QUINOLINATE SYNTHASE* (QS), un gène clé de la voie de biosynthèse du NAD⁺. Cette répression réduit la production de NAD⁺, suggérant l'existence d'une boucle de rétroaction entre le métabolisme du NAD⁺ et la signalisation de l'ABA. Fait notable, l'hypersensibilité à l'ABA du mutant *qs* est corrigée par l'apport exogène d'intermédiaires du NAD⁺, notamment l'acide nicotinique (NA) et le mononucléotide nicotinate (NaMN), ce qui renforce l'idée d'une relation régulatrice entre ces voies. La biosynthèse du NAD⁺ semble

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

également jouer un rôle protecteur dans les cellules de garde contre le stress oxydatif induit par l'ABA en régulant l'activité de la NMNAT. De manière cohérente, l'activité NMNAT est fortement augmentée dans les cellules de garde après exposition à l'ABA, probablement en réponse compensatoire à la dégradation accrue du NAD⁺ par les NADases activées par l'ABA⁶. Toutefois, le rôle précis du NAD⁺ dans la régulation stomatique, en particulier son action éventuelle via des voies dépendantes ou indépendantes de l'ABA, reste à élucider. Les études récentes reliant le NAD⁺ et l'ABA se sont principalement concentrées sur des types cellulaires autres que les cellules de garde, laissant une lacune importante dans notre compréhension du rôle spécifique du NAD⁺ dans ces cellules. Des travaux récents montrent que la surexpression ciblée des oxydases NAD(P)H dans les cellules précurseurs des stomates réduit la densité et la conductance stomatiques, améliorant ainsi la tolérance à la sécheresse⁷. Cela suggère que la manipulation localisée du statut rédox du NAD pourrait constituer une stratégie innovante pour renforcer la résilience à la sécheresse sans affecter globalement le développement. Ces résultats s'appuient sur des travaux antérieurs du porteur du projet, qui ont montré que la distribution intracellulaire du NAD⁺ entre les organites influence fortement le développement et le patron stomatiques chez *Arabidopsis thaliana*⁸. Nos données préliminaires révèlent en outre que: (I) les gènes de biosynthèse du NAD⁺ sont plus fortement exprimés dans les cellules de garde que dans les cellules du mésophylle⁸, indiquant une production active de NAD⁺ dans les stomates ; (II) les mutants du gène *ASPARTATE OXIDASE*, présentant des niveaux réduits de NAD⁺, montrent une conductance stomatique plus élevée à la lumière par rapport aux plantes sauvages. Ce phénotype est entièrement rétabli par complémentation génétique restaurant les niveaux de NAD⁺ ; (III) l'application exogène de NAD⁺ sur des feuilles détachées induit la fermeture stomatique de manière dose-dépendante, avec des effets significatifs dès 50 μM ; (IV) afin d'approfondir le rôle du NAD⁺ dans la signalisation des cellules de garde, nous avons conçu une construction permettant sa surproduction spécifique dans les stomates en exprimant *ASPARTATE OXIDASE* sous le contrôle du promoteur spécifique des cellules de garde MYB60 (pMYB60::AO). Cette expression ciblée a entraîné une réduction de plus de 50 % de la conductance stomatique sans altération visible du développement des plantes, suggérant que le NAD⁺ est un régulateur majeur de l'ouverture stomatique. L'objectif de ce projet est d'élucider le rôle du NAD⁺ en tant que molécule de signalisation dans les cellules de garde, avec pour finalité l'amélioration de la résilience à la sécheresse par ingénierie métabolique ciblée de ces cellules. Bien que le NAD⁺ soit un cofacteur rédox métabolique bien connu, ses fonctions émergentes en tant que molécule de signalisation dans les cellules de garde, en particulier son interaction avec la voie de l'ABA, restent largement inexplorées. Pour répondre à ces questions, le projet mettra en œuvre une modulation génétique spécifique aux cellules de garde des niveaux de NAD⁺, combinée à des analyses transcriptomiques, des approches physiologiques et biochimiques, ainsi qu'au suivi en temps réel *in vivo* de paramètres physiologiques à l'aide de biocapteurs génétiquement encodés. En se concentrant sur les cellules de garde, nous visons à révéler de nouvelles fonctions du NAD⁺ comme molécule de signalisation, aussi bien en conditions optimales qu'en situation de sécheresse. Ces avancées ouvriront la voie à des innovations agricoles fondées sur l'ingénierie métabolique ciblée du NAD⁺ dans les cellules de garde.

Méthode

Conditions de croissance : Ce projet utilisera principalement *Arabidopsis thaliana* (Col-0) comme système modèle. Les plantes seront cultivées dans des chambres contrôlées avec une régulation précise de la lumière, de l'humidité, de l'irrigation, du CO₂ et de la fertilisation. Les graines seront stratifiées à 4 °C dans l'obscurité pendant 2 jours, puis cultivées sous conditions de court jour (8 h lumière / 16 h obscurité) à une intensité lumineuse de 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Les expériences de sécheresse utiliseront des chambres avec contrôle automatisé de la lumière, de l'humidité, de l'irrigation, du poids des pots, de la transpiration, de la fluorescence de la chlorophylle et de la surface foliaire. Les fonds génétiques utilisés dans ce travail seront détaillés dans chaque section méthodologique pertinente.

Le projet de thèse est structuré autour de trois objectifs avec des résultats complémentaires, et les méthodologies sont adaptées aux buts spécifiques de chaque objectif.

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

Objectif 1 : Caractériser le NAD⁺ comme régulateur novel de la signalisation stomatique et des réponses à la sécheresse

1a. La signalisation stomatique médiée par le NAD⁺ est-elle spécifique au NAD⁺?

Les réponses de l'ouverture stomatique des plantes Col-0 aux traitements par NAD⁺, NADH, NADP⁺ et NADPH seront examinées afin de déterminer si la signalisation stomatique médiée par le NAD est spécifiquement associée au NAD⁺ ou implique d'autres formes redox. Des épidermes seront traités avec des composés exogènes NAD(P)(H), et l'ouverture stomatique sera mesurée.

1b. Comment le NAD⁺ contribue-t-il au comportement stomatique?

Pour évaluer la contribution du NAD⁺ au comportement stomatique, la dynamique stomatique sera caractérisée chez Col-0, *ao-1* et *ao-3* (lignées produisant de faibles niveaux de NAD⁺ de manière systémique) et chez les lignées Col-0-pMYB60::AO, qui devraient présenter des niveaux élevés de NAD⁺ spécifiquement dans les cellules de garde. Les réponses seront analysées lors de changements progressifs du déficit de pression de vapeur (VPD), de la lumière et du CO₂, lors des transitions lumière-obscurité, et après fermeture stomatique induite par l'ABA. Ces réponses seront quantifiées à l'aide d'une combinaison de techniques complémentaires : la dynamique stomatique sera mesurée à l'aide d'un système de photosynthèse portable (LI-COR 6800), tandis que l'ouverture stomatique sera évaluée par microscopie optique. De plus, la conductance stomatique des lignées *ao-1*-pMYB60::AO et *ao-3*-pMYB60::AO sera évaluée pour tester si la production de NAD⁺ dans les cellules de garde compense leur phénotype de conductance stomatique élevée. Les lignées génétiques nécessaires pour cette section sont actuellement disponibles et accessibles.

1c. La régulation stomatique médiée par le NAD⁺ est-elle induite par des changements redox et/ou de pH?

Des biosenseurs génétiquement codés seront utilisés pour surveiller en temps réel la dynamique des couples redox clés NADH/NAD⁺ (Peredox-mCherry)¹⁰, NADPH/NADP⁺ (NAPstars)¹¹, H₂O₂ (roGFP2-ORP1)¹², ainsi que le pH intracellulaire (cyt-cpYFP)¹³ dans le cytosol des cellules de garde de Col-0-pMYB60::AO exprimant de manière stable ces biosenseurs. L'objectif est de clarifier si l'ouverture stomatique médiée par le NAD découle directement des changements de niveaux de NAD⁺ ou de modifications plus larges du statut redox et/ou du pH intracellulaire. Cette distinction permettra d'identifier d'éventuelles cibles en aval du NAD⁺ et d'orienter les efforts pour élucider le mécanisme sous-jacent à la signalisation stomatique médiée par le NAD⁺. Les lignées Col-0-pMYB60::AO exprimant ces biosenseurs sont actuellement en cours de génération.

1d. Quel est l'impact de la signalisation stomatique médiée par le NAD⁺ sur la performance végétale et la résilience à la sécheresse?

La performance globale des plantes – y compris l'accumulation de biomasse et le rendement en graines – sera évaluée chez Col-0 et Col-0-pMYB60::AO dans des conditions bien irriguées et de sécheresse. Les expériences de sécheresse seront réalisées à l'aide de l'installation de phénotypage IMAPLANT de notre institut (BIAM), qui permet un suivi et un contrôle automatisés et en temps réel de la lumière, de l'humidité, de l'irrigation, du poids des pots, de la transpiration, de la fluorescence de la chlorophylle et de la surface foliaire. Parallèlement, des échantillons seront prélevés à des moments sélectionnés pour le profilage des métabolites des cellules de garde, ainsi que pour la quantification des niveaux d'ABA et de NAD(P)(H).

Objectif 2 : Déterminer la contribution de l'ABA à la signalisation stomatique médiée par le NAD⁺

La signalisation stomatique médiée par le NAD⁺ dépend-elle de l'ABA? Étant donné le lien émergent entre le métabolisme du NAD⁺ et la signalisation de l'ABA, nous proposons d'étudier l'interaction entre le NAD⁺ et l'ABA dans la signalisation des cellules de garde. Cette interaction constitue notre principal candidat pour tester si la régulation de la fonction stomatique par le NAD⁺ s'opère via un

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

mécanisme dépendant de l'ABA. Des tests de mouvement stomatique seront réalisés comme dans (1a) sur des mutants déficients en ABA (*aba3*) et insensibles à l'ABA (*ost2-2D*, *abi4*, *rbohF*) portant le construct pMYB60::AO. Des mesures de conductance stomatique seront utilisées pour évaluer si le NAD⁺ peut induire la fermeture stomatique indépendamment du contenu et des voies de signalisation de l'ABA. Parallèlement, des analyses dose-réponse de la fermeture stomatique induite par l'ABA seront effectuées sur les lignées mutantes déficientes en NAD⁺, *ao-1* et *ao-3*. Ces approches complémentaires visent à éclairer la relation entre les voies de signalisation du NAD⁺ et de l'ABA dans la régulation du comportement stomatique, en explorant si le NAD⁺ agit en amont, en aval ou via des mécanismes indépendants. Les lignées génétiques ont déjà été générées et sont à la génération T3.

Objectif 3 : Identifier l'expression génique régulée par le NAD⁺ dans les cellules de garde et découvrir des voies candidates indépendantes de l'ABA

Comment le NAD⁺ influence-t-il l'expression génique lors de l'ouverture stomatique ? Pour capturer la dynamique de l'expression génique sous-jacente à l'ouverture stomatique, un RNAseq masse sera réalisé sur des cellules de garde isolées provenant des lignées Col-0 et Col-0-pMYB60::AO, collectées pendant la transition obscurité-lumière. Cette stratégie permettra de fournir un profil complet des réponses transcriptionnelles dépendantes du NAD⁺ dans les cellules de garde, en révélant à la fois des voies dépendantes et indépendantes de l'ABA. L'analyse de l'expression différentielle permettra d'identifier des gènes candidats susceptibles de médier la fonction stomatique régulée par le NAD⁺. Les candidats les plus prometteurs feront l'objet d'une validation fonctionnelle par des approches génétiques afin d'élucider leur rôle dans la signalisation des cellules de garde.

Résultats attendus

Ce projet étudiera un nouveau rôle du NAD⁺ dans la signalisation stomatique et les réponses des plantes à la sécheresse, avec pour objectif de mettre en évidence des voies de régulation médiées par le NAD⁺ jusqu'ici non reconnues. En combinant des analyses physiologiques, moléculaires et métaboliques, nous prévoyons de révéler comment le NAD⁺ contrôle le comportement des stomates, la photosynthèse et l'efficacité d'utilisation de l'eau en conditions de stress hydrique. Ces résultats ont le potentiel de faire progresser la compréhension fondamentale de la physiologie du stress chez les plantes et devraient conduire à une publication à fort impact dans une revue internationale de premier plan, établissant le NAD⁺ comme une cible prometteuse pour améliorer la tolérance des cultures à la sécheresse.

Références bibliographiques

1. Wei, Y. S., Javed, T., Liu, T. T., Ali, A., & Gao, S. J. (2025). Mechanisms of Absciscic acid (ABA)-mediated plant defense responses: An updated review. *Plant Stress*, 15, 100724.
2. Ahmad, Z., Bashir, K., Matsui, A., Tanaka, M., Sasaki, R., Oikawa, A., ... & Seki, M. (2021). Overexpression of nicotinamidase 3 (NIC3) gene and the exogenous application of nicotinic acid (NA) enhance drought tolerance and increase biomass in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 107(1), 63-84.
3. Wang, X., Li, B. B., Ma, T. T., Sun, L. Y., Tai, L., Hu, C. H., ... & Chen, K. M. (2020). The NAD kinase OsNADK1 affects the intracellular redox balance and enhances the tolerance of rice to drought. *BMC Plant Biology*, 20, 1-19.
4. Hong, Y., Wang, Z., Shi, H., Yao, J., Liu, X., Wang, F., ... & Zhu, J. K. (2020). Reciprocal regulation between nicotinamide adenine dinucleotide metabolism and abscisic acid and stress response pathways in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 16(6), e1008892.
5. Sun, L., Li, Y., Miao, W., Piao, T., Hao, Y., & Hao, F. S. (2017). NADK2 positively modulates abscisic acid-induced stomatal closure by affecting accumulation of H₂O₂, Ca²⁺ and nitric oxide in Arabidopsis guard cells. *Plant Science*, 262, 81-90.
6. Hashida, S. N., Itami, T., Takahashi, H., Takahara, K., Nagano, M., Kawai-Yamada, M., ... & Uchimiya, H. (2010). Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 61(13), 3813-3825.
7. Bouvier, J. W., & Kelly, S. (2025). Metabolic engineering of stomatal precursor cells enhances photosynthetic water-use efficiency and vegetative growth under water-deficit conditions in Arabidopsis thaliana. *Plant Biotechnology Journal*.
8. Feitosa-Araujo, E., da Fonseca-Pereira, P., Pena, M. M., Medeiros, D. B., Perez de Souza, L., Yoshida, T., ... & Nunes-Nesi, A. (2020). Changes in intracellular NAD status affect stomatal development in an abscisic acid-dependent manner. *The Plant Journal*, 104(5), 1149-1168.

APPEL A PROJETS DE THÈSE 2026 CONCOURS DE L'ED 658 – Sciences du vivant

9. Rusconi, F., Simeoni, F., Francia, P., Cominelli, E., Conti, L., Riboni, M., ... & Galbiati, M. (2013). The Arabidopsis thaliana MYB60 promoter provides a tool for the spatio-temporal control of gene expression in stomatal guard cells. *Journal of experimental botany*, 64(11), 3361-3371.
10. Steinbeck, J., Fuchs, P., Negroni, Y. L., Elsässer, M., Lichtenauer, S., Stockdreher, Y., ... & Schwarzländer, M. (2020). In vivo NADH/NAD⁺ biosensing reveals the dynamics of cytosolic redox metabolism in plants. *Plant Cell*, 32(10), 3324-3345.
11. Scherschel, M., Niemeier, J. O., Jacobs, L. J., Hoffmann, M. D., Diederich, A., Bell, C., ... & Morgan, B. (2024). A family of NADPH/NADP⁺ biosensors reveals in vivo dynamics of central redox metabolism across eukaryotes. *Nature communications*, 15(1), 10704.
12. Nietzel, T., Elsässer, M., Ruberti, C., Steinbeck, J., Ugalde, J. M., Fuchs, P., ... & Schwarzländer, M. (2019). The fluorescent protein sensor ro GFP 2-Orp1 monitors in vivo H₂O₂ and thiol redox integration and elucidates intracellular H₂O₂ dynamics during elicitor-induced oxidative burst in Arabidopsis. *New Phytologist*, 221(3), 1649-1664.
13. Schwarzländer, M., Wagner, S., Ermakova, Y. G., Belousov, V. V., Radi, R., Beckman, J. S., ... & Murphy, M. P. (2014). The 'mitoflash' probe cpYFP does not respond to superoxide. *Nature*, 514(7523), E12-E14.

Conditions scientifiques matérielles et financières du projet de recherche

Le projet de doctorat sera réalisé au BIAM (CEA Cadarache), qui dispose d'infrastructures expérimentales de pointe. L'institut met à disposition des chambres de culture contrôlées permettant de simuler le stress hydrique dans des conditions précisément régulées de température, de lumière, d'humidité et de CO₂. Des équipements spécialisés sont disponibles pour le phénotypage et les analyses d'échanges gazeux (par exemple, systèmes LICOR, imagerie infrarouge), ainsi que pour les analyses biochimiques et moléculaires, notamment la quantification des métabolites et l'étude de l'expression génique. Toutes les expériences seront conduites conformément aux protocoles de sécurité en vigueur, avec une formation technique appropriée et un accompagnement garantissant une mise en œuvre sûre et efficace du projet. Le laboratoire d'accueil dispose de toutes les ressources financières nécessaires pour assurer le développement et la réussite complète du projet de thèse.

Profil et compétences recherchées

Pour mener à bien ce projet de doctorat, nous recherchons un(e) candidat(e) hautement motivé(e) et passionné(e) par la science des plantes, en particulier la biologie des plantes, le métabolisme et les mécanismes de tolérance à la sécheresse. Le/la candidat(e) idéal(e) aura une solide formation en biologie végétale ou écophysiologie, complétée par des connaissances en génétique végétale, techniques moléculaires et métabolisme des plantes.

Compétences requises :

1. Expérience des techniques de physiologie végétale, en particulier la mesure des échanges gazeux, la photosynthèse, la régulation stomatique et les analyses métaboliques dans des conditions de sécheresse.
2. Expérience en biologie moléculaire, incluant l'extraction d'ARN/ADN, PCR, qPCR et analyse de l'expression génique.
3. Fortes compétences analytiques, avec maîtrise de l'analyse de données biologiques, bioinformatique et statistiques.
4. Capacité à travailler de manière autonome tout en communiquant efficacement les résultats scientifiques.

Le/la candidat(e) retenu(e) devra être consciencieux(se), très motivé(e) et capable de collaborer efficacement au sein d'une équipe pluridisciplinaire.