

Mécanisme moléculaire d'action de l'acide abscissique en réponse à la sécheresse chez les végétaux

Jeffrey Leung¹, Christiane Valon¹, Bertrand Moreau², Martin Boeglin², Cécile Lefoulon², Archana Joshi-Saha¹ et Isabelle Chérel²

¹ Institut des Sciences du Végétal, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 2355, 1 Avenue de la Terrasse Bât. 23, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

² Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes UMR CNRS (5004)/INRA (388)/SupAgro/UM2. Campus INRA/Montpellier SupAgro 2, Place Viala 34060 Montpellier Cedex 2, France

Auteur correspondant : Jeffrey Leung, Leung@isv.cnrs-gif.fr

Reçu le 30 avril 2012

Résumé – La consommation d'eau douce dans les pays les plus développés est aux alentours de 200 à 700 litres par habitant et par jour, dont environ 70 % seraient destinés aux besoins agricoles. Contrairement à d'autres ressources naturelles (comme les différentes formes d'énergie), l'eau n'a pas de produit de substitution. Au cours des dernières années, un énorme chemin a été parcouru concernant notre compréhension de la perception de l'acide abscissique (ABA), une phytohormone qui régule la majorité des réponses adaptatives au déficit hydrique. Face à des conditions environnementales toujours plus contraignantes, notre état de connaissance actuel sur la signalisation de l'ABA est-il suffisant pour assurer le maintien de la productivité des plantes de grande culture tout en consommant moins d'eau ? Cette question suscite des réflexions autant scientifiques que politiques. Bien que l'ABA soit historiquement considéré comme une phytohormone depuis 1960, elle a été redécouverte dans les années 1980 chez de nombreux organismes (éponges de mer, certains parasites, hydres, etc.), dont l'Homme. De manière étonnante, l'ABA présente des propriétés anti-inflammatoires et antivirales. De plus, les gènes homologues codant les récepteurs et les principaux intermédiaires de la signalisation sont conservés, ce qui suggère que les connaissances issues des études utilisant la plante comme modèle seraient applicables à d'autres organismes. La teneur en ABA pourrait atteindre un niveau 10 à 30 fois supérieur à la normale chez des plantes soumises à un stress hydrique ; l'ABA agit alors comme un déclencheur de diverses voies d'adaptation permettant à la plante de mieux résister au stress hydrique. Un modèle expérimental qui se prête particulièrement bien à l'étude de la complexité de l'action de l'ABA est la fermeture des stomates, une réponse physiologique mise en place par les végétaux supérieurs pour limiter la perte d'eau par transpiration. Les stomates sont de petits pores à la surface des feuilles. Chaque pore est entouré par une paire de cellules oblongues et légèrement courbées (en forme de rein), appelées cellules de garde, dont les mouvements contrôlent son degré d'ouverture. L'essor de la recherche sur les rôles physiologiques joués par l'ABA au cours du développement de la plante (notamment sur l'abscission des fruits et la dormance des bourgeons) a débuté dans les années 1960, et a abouti en 2009 à l'identification d'une famille de récepteurs cytosoliques de l'hormone. Cette découverte a été suivie très rapidement par la reconstitution de plusieurs cascades de transduction signalétiques ABA-dépendantes *in vitro*. De nombreuses études ont été réalisées sur les structures cristallines des protéines appartenant au complexe cœur de la signalisation par l'ABA (un récepteur, une phosphatase et une kinase), prises individuellement ou en combinaison, en complexe ou non avec l'ABA. Ces études laissent entrevoir la possibilité de concevoir des agonistes et antagonistes de l'hormone afin de permettre aux végétaux de mieux s'adapter au stress hydrique. Cette revue retracera le progrès

extraordinaire qui a permis d'éclairer la façon dont l'ABA agit sur les transports à travers la membrane plasmique, aboutissant à la fermeture des stomates pour limiter la transpiration.

Mots clés : Acide abscissique / réponse à la sécheresse / cellules de garde / fermeture stomatique

Abstract – The ABC of abscisic acid action in plant drought stress responses.

The combined daily consumption of fresh water ranges from 200 to 700 liters *per capita* per day in most developed countries, with about 70% being used for agricultural needs. Unlike other resources such as the different forms of energy, water has no other alternatives. With the looming prospect of global water crisis, the recent laudable success in deciphering the early steps in the signal transduction of the “stress hormone” abscisic acid (ABA) has ignited hopes that crops can be engineered with the capacity to maintain productivity while requiring less water input. Although ABA was first discovered in plants, it has resurfaced in the human brain (and many other non-plant organisms : sea sponge, some parasites, hydra to name a few), suggesting that its existence may be widespread. In humans, more amazingly, ABA has shown anti-inflammatory and antiviral properties. Even its receptors and key signaling intermediates have homologs in the human genome suggesting that evolution has refashioned these same proteins into new functional contexts. Thus, learning about the molecular mechanisms of ABA in action using the more flexible plant model will be likely beneficial to other organisms, and especially in human diseases, which is topical in the medical circle. ABA can accumulate up to 10 to 30-fold in plants under drought stress relative to unstressed conditions. The built up of the hormone then triggers diverse adaptive pathways permitting plants to withstand temporary bouts of water shortage. One favorite experimental model to unravel ABA signaling mechanisms in all of its intimate detail is based on the hormone’s ability to elicit stomatal closure – a rapid cellular response of land plants to limit water loss through transpiration. Each microscopic stoma, or pore, is contoured by two specialized kidney-shaped cells called the guard cells. Because land plants are protected by a waxy cuticle impermeable to gas exchange, the stomatal pores are thus the primary portals for photosynthetic CO₂ uptake. Drought, by biasing pathways that lead to rapid closure of these pores, has therefore a negative impact on photosynthesis, and consequently, biomass as well. The stomatal aperture widens and narrows by expansion and contraction, respectively, of these flanking guard cells caused by changes in the intracellular concentrations of ion fluxes. These transport mechanisms most likely share fundamental principles with any excitable cell. These events require coordination of channels, vacuolar and membrane transporters that generate a specific pattern of electrical signals that relay the ABA stimulus. Research on ABA begun in the 1960’s has now been crowned by the achievement of having identified the soluble ABA receptor that turns on and off the activities of a kinase/phosphatase pair, as the heart of the signaling complex. Results distilled from the latest structural studies on these ABA receptors, characterized by the so-called START domain, are beginning to tender the most exciting promise for rational design of agonists and antagonists towards modulating stress adaptive ability in plants. This review will chart the recent extraordinary progress that has enlightened us on how ABA controls membrane transport mechanisms that evoke the fast stomatal closing pathway.

Key words: Abscisic acid / guard cells / drought response / stomatal closure

1 Introduction

Les plantes terrestres se protègent contre la déshydratation par une cuticule de cire, mais celle-ci rend la plante imperméable aux échanges gazeux. Les pores stomatiques (figure 1) constituent donc

les seules portes d'entrée possibles pour le CO₂, dont la concentration est faible dans l'atmosphère (~ 350 ppm, ou parties par million). Cette diffusion du CO₂ vers les tissus photosynthétiques ne peut s'effectuer sans perte d'eau, car la pression de vapeur est plus importante dans la feuille que dans



Fig. 1. Stomates sur une feuille (de peuplier). Un stomate est composé d'un pore entouré par deux cellules de garde. La surface d'un stomate est d'environ $300 \mu\text{m}^2$, mais pourrait dépasser $1000 \mu\text{m}^2$ pour certaines espèces de plantes.

l'atmosphère. En effet, chez la plupart des plantes de type C3 (auquel appartiennent les plantes de grande culture), chaque molécule de CO_2 capturée entraîne la perte de centaines de molécules d'eau s'échappant par la même voie stomatique. Lorsque la disponibilité de l'eau devient trop faible dans le sol, l'activation des réponses aboutissant à la fermeture stomatique va limiter la diffusion du CO_2 vers l'intérieur de la plante, entraînant ainsi un impact négatif sur la photosynthèse (Tardieu, 2003). De plus, il en résulte une augmentation de la teneur en O_2 produit par la photosynthèse à l'intérieur de la plante, qui empêche la fixation enzymatique du CO_2 . La croissance des plantes est donc conditionnée par une gestion permanente de conflits d'intérêts entre acquisition du CO_2 et limitation de la perte en eau.

Le complexe cœur de signalisation de l'ABA : récepteur, protéine phosphatase 2C et kinase SnRK2

Depuis 1984, la recherche de protéines ayant une affinité pour l'ABA a conduit à l'identification de nombreux « récepteurs », ce qui a suscité certaines controverses (Joshi-Saha *et al.*, 2011). Parmi les candidats, ceux qui correspondent le mieux aux profils physiologiques et moléculaires ont été finalement identifiés en 2009. Cette découverte a été nommée par la prestigieuse revue Science comme étant une des plus marquantes de l'année (*The News Staff*, 2009).

La famille de récepteurs cytosoliques comprend 14 membres chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Une telle redondance de gènes dans la famille

a rendu sans doute difficile leur identification par des cribles génétiques classiques, du moins par des mutations de type « perte de fonction ». En fait, le premier récepteur de cette famille a été identifié par un crible dit de « génétique chimique » (“*chemical genetics*” en anglais). Le composé synthétique 4-bromo-N-[pyridine-2-yl-méthyl] naphthalène-1-sulfonamide, plus connu sous le nom de pyrabactine (figure 2), inhibe la germination des graines ainsi que la croissance des plantules ; de plus, il induit l'expression d'une partie du transcriptome typiquement ABA-dépendante (Park *et al.*, 2009). En sélectionnant après mutagenèse des graines capables de germer sur des concentrations inhibitrices de pyrabactine, puis en réalisant le clonage positionnel du locus muté, Cutler *et al.* (2010) ont réussi à isoler le gène *PYRABACTIN RESISTANCE1* (*PYR1*). La séquence protéique prédite présente des homologies avec le domaine START (*Steiroidogenic Acute Regulatory lipid Transfer*). La structure déduite indique que START formerait une poche spacieuse, dotée de la capacité d'accueillir un éventail de ligands hydrophobes, dont des hormones (Radauer *et al.*, 2008). Non seulement *PYR1* présente une affinité pour la pyrabactine comme prévu, mais elle fixe également l'ABA, bien que l'affinité pour l'hormone s'avère modeste, ce qui est relativement rare pour un récepteur physiologique (voir plus loin). De plus, dans le système du double-hybride effectué chez la levure, *PYR1* est capable de se lier directement, et de manière dépendante de l'ABA, à plusieurs phosphatases 2C (à savoir les homologues *ABI1*, *ABI2* et *HAB1*), déjà connues depuis plus de dix ans comme étant des régulateurs négatifs de premier plan au sein de la cascade de signalisation de l'ABA (Leung *et al.*, 1994, 1997; Meyer *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 1998; Leonhardt *et al.*, 2004; Saez *et al.*, 2004; Santiago *et al.*, 2009). Les 13 autres membres de la famille *PYR* identifiés grâce à leur homologie avec *PYR1* sont nommés *PYL* (pour *PYR-Like*) (Park *et al.*, 2009).

Les structures cristallines ont été élucidées pour (i) le récepteur couplé à l'ABA ; (ii) le couple pyrabactine-récepteur ; (iii) les récepteurs sans ligand (*PYR1*, *PYL1* et *PYL2*) ; (iv) le complexe ternaire ABA-*PYL*-PP2C. Les résultats révèlent que la poche de fixation du récepteur est spacieuse et constituée de sept feuilletts β (“ β -sheets”) anti-parallèles, ceinturés par une longue hélice provenant de l'extrémité C-terminale de la protéine. L'ABA est retenu dans la poche par une combinaison de charges polaires et non-polaires. Le groupement carboxyl de l'ABA est dirigé vers le fond de la poche, où il est en contact direct avec une lysine conservée dans quasiment tous les récepteurs (sauf *PYL13*). L'ABA est séquestré dans la poche du récepteur par deux structures importantes, le “*proline gate*” (portail proline) et le “*leucine*

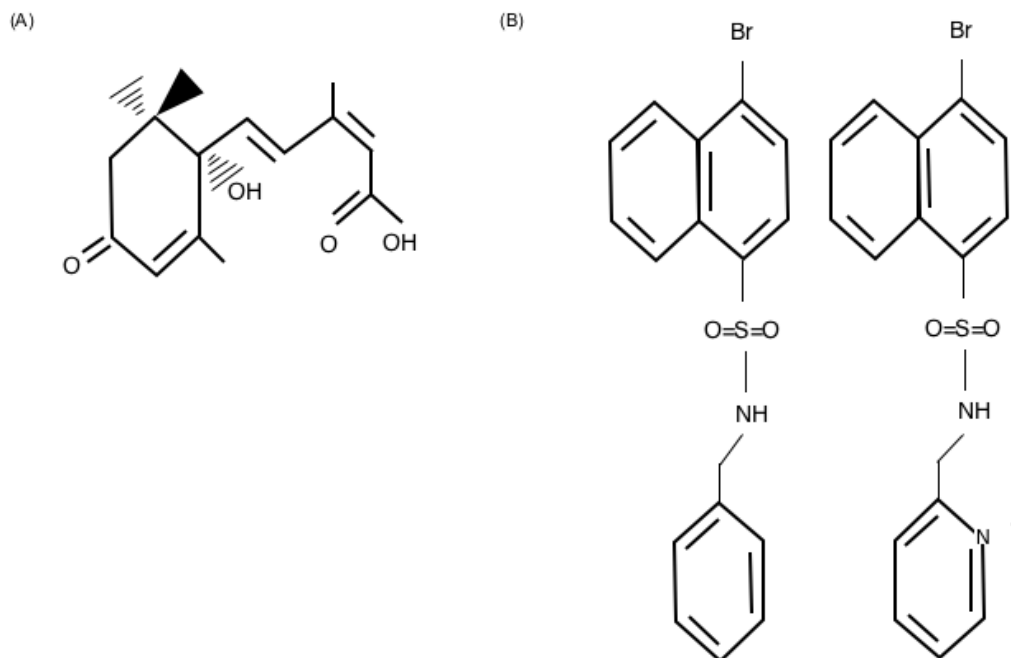


Fig. 2. L’ABA et la pyrabactine utilisés dans les cribles génétiques classiques ou chimiques. (A) La structure chimique de l’ABA. (B) La structure chimique de la pyrabactine, et de son analogue l’apyrabactine. La présence du N-pyridyl (astérisque) est critique pour la bioactivité agoniste puisque l’apyrabactine (à gauche) n’est pas active.

latch” (loquet leucine) (figures 3A et 3B). Le groupement cyclohexane de l’ABA s’étend vers l’entrée de la poche et stabilise le “*proline gate*” en position fermée grâce à une série d’interactions hydrophobes, provenant d’acides aminés conservés dans tous les récepteurs de la famille (Yin *et al.*, 2009). Une fois fermé, le “*proline gate*” sera ensuite verrouillé, d’une part par l’abaissement du “*leucine latch*” et d’autre part, par le recul d’une petite boucle de 13 acides aminés, le “*recoil*”, au-dessus de l’entrée de la poche (figure 3A).

Les récepteurs peuvent exister en monomères et dimères (Nishimura *et al.*, 2009; Dupeux *et al.*, 2001b). Dans la forme dimérique, les deux moitiés se lient l’une à l’autre grâce à des interactions entre leurs “*proline gates*”. L’assemblage des deux moitiés, en absence d’ABA, ne forme toutefois pas une double symétrie axiale à 180° comme c’est souvent le cas pour d’autres protéines dimériques, mais produit un léger décalage de 10° de l’une par rapport à l’autre. La fixation de l’ABA induit des changements conformationnels dans le “*proline gate*” et le “*leucine latch*”, ce qui fait basculer les deux partenaires vers une double symétrie axiale, donnant une structure plus compacte et concave qui ressemble à un globule rouge. La fixation par l’ABA induit aussi la dissociation des dimères en monomères (Dupeux *et al.*, 2001b). Après dissociation, chacun des monomères libérés se lie alors à une PP2C.

En dépit d’une différence de structure marquante avec l’ABA, la pyrabactine (figure 2), qui est une chaîne formant un axe longitudinal symétrique, se niche dans la poche du récepteur. Pour cela, elle se replie comme le symbole mathématique pi (π) (figure 3C). De manière encore plus inattendue, elle est capable de s’installer dans le récepteur dans deux orientations, en donnant un complexe « productif » (“*productive complex*” en anglais) ou « non-productif » (“*nonproductive*” en anglais) (figure 3C). Une série d’études cristallographiques très détaillées sur les complexes récepteur-pyrabactine et récepteur-pyrabactine-ABI1, permet de conclure que toutes les configurations « productives » impliquent des interactions de type Van der Waals entre la pyrabactine pliée à l’intérieur de la poche et le “*proline gate*”. Et cette conformation « productive » serait capable d’activer des réponses adaptatives (Melcher *et al.*, 2010). En revanche, des études similaires menées sur la structure pyrabactine-PYL2 en conformation « non-productive » montrent que la différence n’est pas due à une absence d’affinité de la pyrabactine pour PYL2 puisque des expériences biochimiques ont révélé que la pyrabactine est capable de contrecarrer l’activation du récepteur par l’ABA. En fait, l’axe longitudinal de la pyrabactine est retourné à 180° et ne parvient plus à établir les liaisons de Van Der Waals requises pour le maintien du “*gate*” en position fermée (figure 3C). La liaison du ligand, que ce soit l’ABA

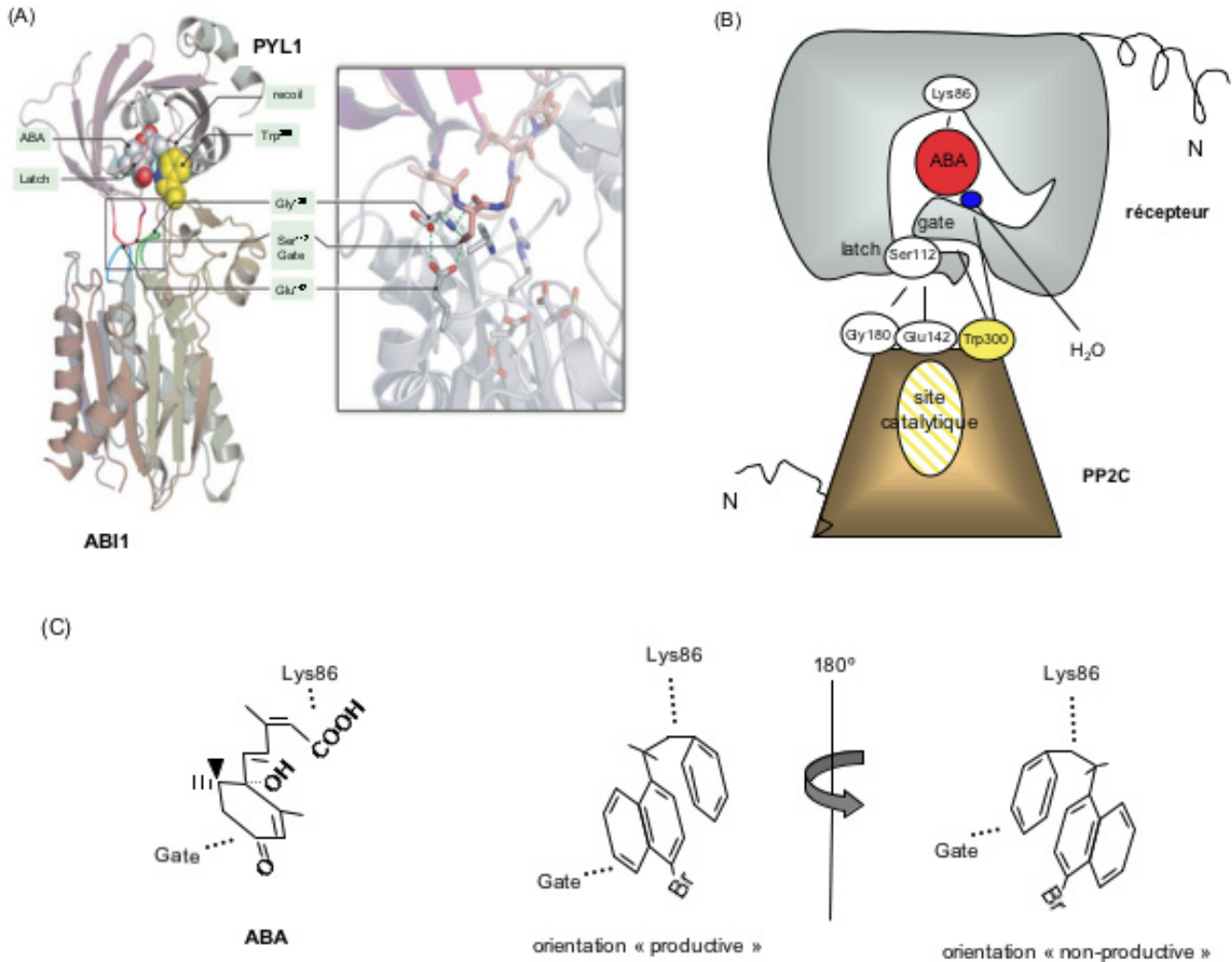


Fig. 3. Le complexe ternaire PYL1-ABA-ABI1 (modifié d'après Miyazono *et al.*, 2009 et Joshi-Saha *et al.*, 2011, Protein Data Base code d'accès 3KAZ). (A) L'acide aminé Trp300 d'ABI1 maintient l'ABA en place dans la profondeur du récepteur (PYL1). En encadré à droite sont présentées les interactions entre les acides aminés permettant la séquestration de la PP2C (ABI1) par le récepteur. (B) Modèle présentant les acides aminés importants pour l'interaction ABA-récepteur-PP2C. Une sérine conservée dans les récepteurs (Ser112 dans PYL1) interagit avec une glycine et un glutamate des PP2C (Gly180 et Glu142 dans ABI1). Le tryptophane conservé dans les PP2Cs impliquées dans la signalisation de l'ABA (Trp300 dans ABI1) interagit avec l'ABA *via* une molécule d'eau. Le groupement carboxyl de l'ABA est en contact direct avec une lysine conservée (Lys86 dans PYL1) au fond de la poche dans le récepteur. N, la terminaison amine de la protéine. (C) Les orientations de l'ABA et de la pyrabactine dans la poche du récepteur.

ou la pyrabactine, au sein du site de fixation n'est donc pas en soi suffisante pour déclencher la chaîne signalétique en aval. Un complexe « productif » dépend également de la capacité de l'agoniste à maintenir le « *proline gate* » fermé de manière à exposer la surface de la structure capable de fixer les PP2C. Les analyses structurales sur le récepteur PYL1 couplé à l'ABA (Melcher *et al.*, 2009), les complexes ternaires ABA-PYL1-ABI1 et ABA-PYL2-HAB1 (Miyazono *et al.*, 2009 ; Yin *et al.*, 2009) ont par ailleurs montré que la conformation du récepteur demeure globalement identique, indiquant que la protéine est rigide.

Une sérine spécifique conservée dans les récepteurs, S112 chez PYL1 ou celle équivalente S89 chez PYL2, fonctionne comme un bouchon. Elle entre en contact avec certains acides aminés dans le site catalytique de la phosphatase, obstruant ainsi l'accès des substrats (figures 3A et 3B).

Les récepteurs à l'ABA ont des constantes de dissociation (K_d) très élevées, de l'ordre de quelques micromolaires (μM) d'ABA. Ce qui suggère que les récepteurs auraient une affinité plutôt faible pour l'ABA. Toutefois, la fixation de la PP2C augmente l'affinité du récepteur pour l'ABA, ce qui amène la

constante de dissociation à une valeur de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de nanomolaires. Cette augmentation d'affinité est en accord avec des essais fondés sur l'inhibition de l'activité PP2C par des récepteurs *in vitro*. L'inhibition des PP2C est liée à la fois au rapport des concentrations entre récepteurs et de PP2C, et à l'identité précise des récepteurs et de PP2C (Raghavendra *et al.*, 2010; Szostkiewicz *et al.*, 2010). Ces PP2C dans le complexe se comportent donc comme des co-récepteurs; néanmoins, elles n'ont pas d'affinité avérée pour l'hormone comme de véritables co-récepteurs classiques. Les analyses structurales indiquent qu'un tryptophane spécifique présent au sein des PP2C (Trp 300 d'ABI1 ou son équivalent Trp385 chez HAB1), parfois appelé le "Trp Lock" (serrure tryptophane), est en contact à la fois avec l'ABA et le récepteur par des ponts d'eau ou des interactions hydrophobes. Il est possible que ces contacts simultanés augmentent la force de l'association entre l'hormone et le récepteur (Cutler *et al.*, 2010). Des expériences de type mutagenèse dirigée ont montré que ce tryptophane particulier n'est pas indispensable à l'activité catalytique de la phosphatase, mais qu'il joue un rôle dans la liaison avec les récepteurs, et par conséquent, dans l'inhibition ABA-dépendante des PP2C. Ceci a été démontré pour ABI1 (Miyazono *et al.*, 2009) et HAB1 (Dupeux *et al.*, 2011a).

L'implication de certaines kinases de type SnRK2 (pour "Sugar non-Fermenting1-Related Kinases" conservées chez les mammifères et chez la levure) dans la voie de signalisation de l'ABA a été mise en évidence grâce à leur activité dans des extraits protéiques végétaux en réponse à l'ABA. Les mutations de type perte-de-fonction dans le gène *OPEN STOMATA (OST)1* d'*Arabidopsis* bloquent la fermeture stomatique en réponse à la sécheresse progressive et à l'ABA exogène (Mustilli *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2007). Yoshida *et al.* (2010) ont mis en évidence une interaction directe entre ABI1 et OST1 co-exprimées dans la levure. De plus, ils ont identifié un domaine de fixation d'ABI1 (domaine II ou "ABA box") dans les parties C-terminales d'OST1 et de ses deux homologues les plus proches, SnRK2.2 et SnRK2.3, dont les activités kinases sont également induites par l'ABA. Parmi les dix membres de la famille, ces trois kinases réguleraient à elles seules la totalité des réponses élémentaires induites par l'ABA. Plusieurs sérines au sein de la boucle d'activation ("activation loop") sont phosphorylées *in vivo* après un traitement par l'ABA, et sont des sites privilégiés de déphosphorylation par ABI1 (Umezawa *et al.*, 2009; Vlad *et al.*, 2009). En outre, l'activité kinase ABA-dépendante mesurée dans des extraits protéiques est nettement réduite chez des mutants PP2C constitutifs (comme *abi1-1*), par rapport au sauvage et à

des mutants de type perte-de-fonction, dans lesquels elle est la plus élevée (Umezawa *et al.*, 2009; Vlad *et al.*, 2009). Ces observations sont compatibles avec l'hypothèse selon laquelle ces trois kinases seraient des cibles de régulation négative *in planta* par ABI1, ABI2 et HAB1. Enfin, OST1 (Vlad *et al.*, 2009), SnRK2.2, SnRK2.3 et plusieurs récepteurs à l'ABA (Nishimura *et al.*, 2010) co-immunoprécipitent avec ABI1 dans des extraits protéiques d'*Arabidopsis*. Lors de ces expériences, des résultats quasi identiques ont été obtenus avec ou sans traitement préalable à l'ABA. Ceci peut paraître surprenant, car, comme décrit ci-dessus, l'interaction de plusieurs couples de PYL-PP2C dans la levure est ABA-dépendante, suggérant que l'ABA aurait une influence sur la composition du complexe.

Les analyses biochimiques et structurales du couple OST1-HAB1 ont révélé un mécanisme d'inhibition de la kinase en deux étapes (figure 4). HAB1 inactive OST1 par déphosphorylation. De plus, afin de supprimer toute activité résiduelle, HAB1 se serre contre OST1 de manière à ce que les sites catalytiques des deux protéines se retrouvent face à face. En fait, la boucle d'activation d'OST1 a une structure qui rappelle partiellement le "proline gate" du récepteur, et s'insère, à l'instar du "proline gate", dans le site catalytique d'HAB1. Le récepteur, une fois couplé à l'ABA, adoptera de son côté une structure qui ressemble à la surface catalytique d'OST1 (Soon *et al.*, 2011; Leung, 2012). La première étape dans le mode d'action de l'ABA est donc fondée sur un mimétisme moléculaire entre le récepteur et la kinase, qui leur permet d'échanger la même PP2C comme partenaire.

Les études structurales et moléculaires réalisées sur le complexe OST1-HAB1 pourraient expliquer également pourquoi aucun changement n'est perceptible dans la composition des extraits protéiques obtenus à partir d'*Arabidopsis* traités ou non préalablement à l'ABA (cf. ci-dessus) L'association des PP2C et des kinases s'effectue non seulement *via* leurs sites catalytiques, mais aussi de manière quasi constitutive entre la "boîte ABA" ("ABA box") des kinases OST1, SnRK2.2 ou SnRK2.3 et certains des résidus chargés positivement des PP2C (Soon *et al.*, 2011) (figure 4). Le récepteur se lie donc à la phosphatase en décrochant la kinase, mais sans être parvenu à dissocier celle-ci complètement du complexe.

Première cascade synthétique de signalisation de l'ABA

Des observations préliminaires, pour la plupart basées sur des tests de phosphorylation *in vitro* combinés à des prédictions informatiques (Furihata *et al.*, 2006; Vlad *et al.*, 2008), avaient laissé supposer qu'OST1

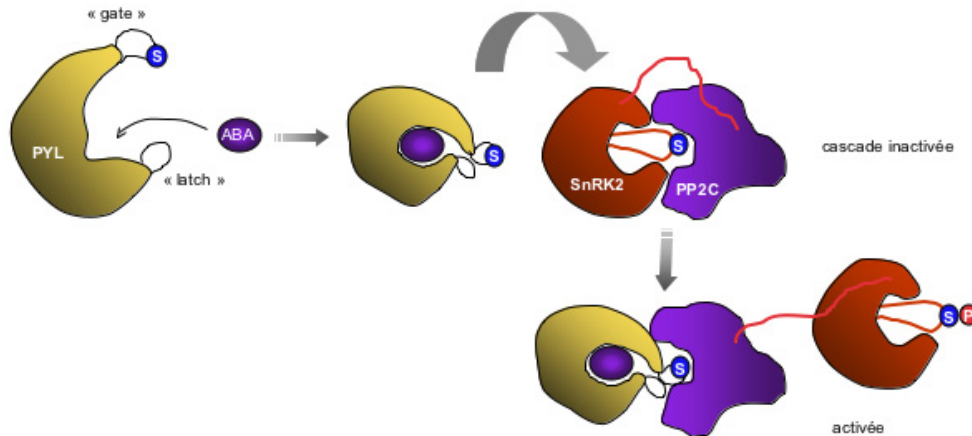


Fig. 4. L'échange de partenaire pour contrôler le mode d'action de l'ABA (d'après Leung, 2012). Le mimétisme moléculaire entre la face catalytique de la kinase et le « gate » du récepteur PYL couplé à l'ABA permet à ce dernier de prendre la place de la kinase dans l'interaction avec la phosphatase PP2C. Le symbole (S) désigne soit la sérine conservée dans le « gate » (le bouchon) soit la sérine phosphorylée dans la kinase. Ligne : partie C-terminale de la kinase contenant le motif « ABA box ».

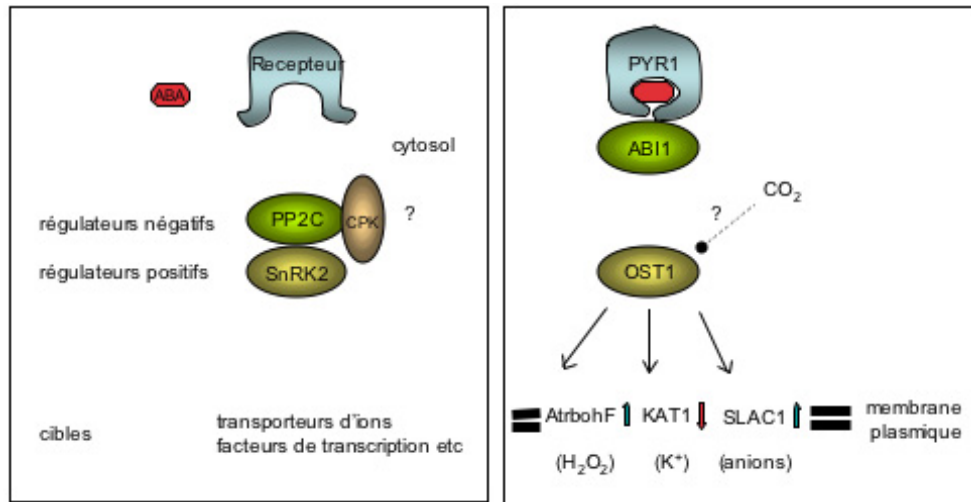


Fig. 5. Modèle (simplifié) résumant l'état actuel de nos connaissances sur la signalisation de l'ABA dans la cellule de garde. (Gauche) En absence d'ABA, les activités des SnRK2 sont inhibées par les PP2C spécifiques. La fixation de l'ABA au récepteur conduit à la rétention des PP2C, libérant ainsi les kinases pour phosphoryler les cibles. Les flèches indiquent soit l'activation (vers le haut) soit l'inactivation (vers le bas) des activités des canaux. Le point d'interrogation (?) représente l'incertitude ou la lacune dans notre connaissance.

avait un grand nombre de cibles. En effet, une fraction importante du transcriptome de réponse à l'ABA (estimé à 10 % des gènes codants, soit > 2000 gènes) serait régulée par trois facteurs de transcription à domaine b-ZIP (*basic leucine-zipper*) (Yoshida *et al.*, 2010), qui, eux-mêmes, seraient des cibles directes de OST1 (Furihata *et al.*, 2006; Sirichandra *et al.*, 2010). Une voie de signalisation synthétique a été reconstituée *in vitro*, aboutissant, en réponse à l'application de l'ABA, à la phosphorylation d'un peptide correspondant au facteur de transcription à domaine b-ZIP, ABF2, pour simuler la régulation de transcription ABA-dépendante (Fujii *et al.*, 2009)

(figure 5). Cette réussite souligne clairement que seules trois protéines (PYR1, ABI1 et OST1) suffisent pour déclencher la régulation par l'ABA. Celles-ci sont désormais définies comme membres du « complexe cœur » (Cutler *et al.*, 2010).

La régulation des transporteurs ioniques par l'ABA dans la cellule de garde

Contrairement à la régulation transcriptionnelle, qui est une réponse « lente », les flux d'anions à travers la membrane plasmique d'une cellule de garde sont

déTECTABLES quelques (~ 2) minutes après traitement à l'ABA (Levchenko *et al.*, 2005). La fermeture stomatique est déclenchée par des activités coordonnées des transporteurs d'ions, et la production de plusieurs intermédiaires comme le Ca^{2+} et l'eau oxygénée (H_2O_2). Des études réalisées *in vitro* montrent que OST1 phosphoryle une thréonine spécifique de KAT1, qui est un canal potassique entrant majeur (Sato *et al.*, 2009) (figure 5). Lorsque cette thréonine est convertie en acide aspartique, qui mime un résidu phosphorylé, KAT1 devient incapable de compléter une souche de levure mutée dans les gènes codant les transporteurs d'influx de K^+ (*trk1 trk2*).

Les flux calciques impliqués dans la stimulation de la fermeture stomatique sont régulés par l'ABA *via*, au moins en partie, OST1 et la production d' H_2O_2 . L'ABA stimule la production d' H_2O_2 par les NADPH oxydases. Bien que H_2O_2 ait une structure et des propriétés chimiques très proches de celles d' H_2O (Bienert *et al.*, 2007), ce messenger universel est paradoxalement un oxydant puissant. Le dilemme pour la cellule est le suivant : lors de la signalisation, la concentration cellulaire de H_2O_2 augmente, et le pic d'activité doit être d'une durée suffisante pour permettre l'oxydation des molécules effectrices, cependant la concentration de H_2O_2 doit être maintenue en-dessous d'un certain seuil (pouvant aller de 10 à 100 μM) en raison de sa toxicité. Les activités des NADPH oxydases sont donc étroitement contrôlées pour limiter cette toxicité (Cho *et al.*, 2009). Kwak *et al.* (2003) ont identifié des mutations dans deux gènes qui codent des sous-unités catalytiques de NADPH oxydases, *AtrbohD* et *AtrbohF* (pour *respiratory burst oxidase homolog D* et *F*), qui empêchent, à la fois, la fermeture stomatique, la production des radicaux libres induite par l'ABA, et l'augmentation du signal calcique par l'ABA. Sirichandra *et al.* (2009) ont montré qu'OST1 phosphoryle *AtrbohF* *in vitro* et que les deux protéines co-exprimées dans des cellules d'épiderme de tabac interagissent directement. Ces résultats pourraient expliquer l'absence de pic de H_2O_2 induit par l'ABA dans les cellules de garde chez le mutant *ost1* (Mustilli *et al.*, 2002).

La cible de OST1 qui a suscité le plus d'intérêt est celle impliquée dans la régulation du courant anionique de type S (pour "slow" ou lent). Des études pharmacologiques antérieures avaient montré qu'un courant anionique lent et soutenu était critique pour initier la fermeture stomatique en dépolarisant la membrane plasmique. Deux équipes indépendantes ont exploité l'une le phénotype de l'absence de fermeture stomatique en réponse au CO_2 (Negi *et al.*, 2008), et l'autre la fermeture stomatique accrue due à l'ozone (O_3) (Vahisalu *et al.*, 2008) pour des cribles génétiques. Les deux équipes ont simultanément

convergé sur le même locus *SLAC1* (*SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED*).

SLAC1 appartient à la famille des transporteurs de C4-dicarboxylate des champignons et est un homologue éloigné d'un transporteur de malate de *Schizosaccharomyces pombe*. Le mutant *slac1* présente un ensemble de phénotypes complexe. Les cellules de garde ne sont que faiblement sensibles à la lumière et à l'humidité. Elles présentent également des différences très prononcées avec le sauvage quant aux réponses à l'ABA, au NO , à O_3 et H_2O_2 . De plus, l'homéostasie de plusieurs ions organiques et inorganiques est particulièrement perturbée chez *slac1-2*. L'ensemble des résultats obtenus pour *SLAC1* décrits ci-dessus sont importants pour plusieurs raisons. Premièrement, ils fournissent une preuve que les réponses stomatiques au CO_2 , à O_3 , et à l'humidité sont connectées à la voie de perception de l'ABA et que SLAC1 aurait un rôle central dans l'intégration de ces divers signaux. Cette découverte a donné une preuve irréfutable que les courants de type R (pour rapide) et de type S proviennent de canaux anioniques distincts. Le courant de type R, qui est transitoire et de courte durée, n'est pas du tout affecté chez *slac1*, ce qui suggère fortement que les courants lents et rapides ne sont pas produits par le même canal soumis à des mécanismes de régulation post-traductionnels. SLAC1 correspond donc très vraisemblablement au canal anionique recherché depuis presque 30 ans.

Par référence aux données structurales obtenues pour le transporteur bactérien TehA, l'homologue de SLAC1, ce dernier serait probablement un trimère composé de sous-unités quasi symétriques, dont chacune posséderait dix hélices transmembranaires pour former au total cinq pores. Chaque pore formerait un cylindre de 5 Å de diamètre composé d'acides aminés pour la plupart hydrophobes, avec un rétrécissement où le passage d'anions ("*gating*" en anglais) serait contrôlé par le mouvement d'une phénylalanine spécifique, ce qui signifie que la phénylalanine fonctionnerait comme un portail. La sélectivité de SLAC1 semble reposer uniquement sur la dépense énergétique nécessaire à la déshydratation des anions, et non pas, comme pour d'autres canaux anioniques, sur des sites de fixation spécifiques. Le pore de SLAC1 posséderait donc une structure unique parmi les pores des canaux anioniques caractérisés à ce jour.

OST1 intègre les signaux ABA et CO_2

Le fait que SLAC1 soit la cible d'OST1 au sein de la cellule de garde a ouvert de nouvelles perspectives sur la façon dont les signaux de l'ABA et du CO_2 pourraient être intégrés (Xue *et al.*, 2011). La pénurie d'eau douce et la progression constante de la teneur en

CO₂ atmosphérique ont un impact sur la productivité agricole de plus en plus palpable. Les plantes ferment les stomates lorsque la teneur en CO₂ est élevée (~ 800 ppm). Cette réponse nécessite l'activité de l'anhydrase carbonique, mais les autres intervenants moléculaires dans la chaîne de signalisation restent inconnus (Hu *et al.*, 2010). Même la manière dont le CO₂ traverse la membrane plasmique est controversée à l'heure actuelle. Des indices existent aussi bien pour une diffusion passive à travers la membrane durant la photosynthèse, que pour le passage *via* des aquaporines appelées aussi canaux à eau (Terashima & Ono, 2002; Uehlein *et al.*, 2003; Flexas *et al.*, 2008).

De fortes teneurs en CO₂ activent des courants d'anions dans la cellule de garde (Hu *et al.*, 2010). De plus, comme pour le CO₂, il est connu depuis plusieurs décennies que de fortes ainsi que de faibles concentrations de bicarbonate (HCO₃⁻) sont également capables de provoquer soit la fermeture soit l'ouverture stomatique (Mrinalini *et al.*, 1982). HCO₃⁻ est synthétisé à partir de CO₂ et H₂O, grâce à une réaction de condensation catalysée par l'anhydrase carbonique. Les travaux sur *slac1* démontrent que la cellule de garde est dotée d'une voie de transduction du signal CO₂. En effet, la réponse au changement de la teneur en CO₂ est absente chez *slac1* (Negi *et al.*, 2008; Vahisalu *et al.*, 2010) et des cellules de garde mutantes ne produisent plus de courant anionique de manière significative après traitements par de fortes doses de CO₂ et de HCO₃⁻ (Xue *et al.*, 2011). Ces études ont montré que le HCO₃⁻, autant que le CO₂, seraient des activateurs intracellulaires des canaux anioniques. Il a été proposé, sur la base de travaux électrophysiologiques, que CO₂/HCO₃⁻ accentuerait la sensibilité de SLAC1 au signal calcique (Xue *et al.*, 2011).

Si le mutant *ost1* présente une réponse stomatique quasi normale à de faibles concentrations de CO₂ (Mustilli *et al.*, 2002), les cellules de garde *ost1* ne produisent plus de courant anionique après traitements par de fortes concentrations de CO₂/HCO₃⁻, et la fermeture stomatique est fortement ralentie. En revanche, la réponse stomatique au bicarbonate est normale, si ce n'est pas légèrement plus lente, chez le quadruple mutant *pyr1 pyl1 pyl2 pyl4*, auquel il manque quatre récepteurs fonctionnels à l'ABA (Xue *et al.*, 2011). L'ensemble des résultats suggère que OST1 serait le point majeur de convergence des signaux CO₂ et ABA (figure 5).

Conclusions

La découverte en 2009 des récepteurs cytosoliques à l'ABA, caractérisés par le domaine START, a permis l'élucidation rapide des premières étapes successives

dans la voie de signalisation de l'acide abscissique. L'acheminement de l'ABA extracellulaire vers les récepteurs intracellulaires serait assuré au moins en partie par des transporteurs de type *ATP-Binding Cassette (ABC transporters)* (Kang *et al.*, 2010; Kuromori *et al.*, 2010). Ces transporteurs exprimés dans des systèmes hétérologues comme des cellules de mammifères ou la levure, présentent bien des activités de transport de l'ABA.

Une cascade synthétique de signalisation par l'ABA a permis de valider un trio de protéines comme étant les membres du complexe au cœur de la signalisation : le récepteur, une phosphatase de type 2C et une kinase de type SnRK2 (qui correspondent aux éléments fondateurs PYR1, ABI1 et OST1) (Cutler *et al.*, 2010). Cette cascade *in vitro* utilise comme révélateur en bout de chaîne la phosphorylation d'un peptide provenant du facteur de transcription à domaine b-ZIP ABF2, qui est dépendante de l'ABA. Même si la PP2C n'a pas d'affinité directe pour l'ABA, dans le complexe ternaire ABA-récepteur-PP2C, la présence de la PP2C stabilise l'hormone séquestrée à l'intérieur du récepteur, diminuant la valeur de K_d. Une deuxième cascade a été conçue *in vitro* pour simuler le mécanisme moléculaire de la fermeture stomatique. Les éléments fondamentaux de cette cascade, *a minima*, seraient le récepteur RCAR1 (PYL9), ABI1/PP2CA, OST1, et SLAC1. *In planta*, la composition du complexe cœur ressemblerait plus à un "signalosome" avec de multiples protéines pas encore complètement identifiées qu'à un simple trio qui fonctionnerait en série. En effet, ABI1 co-immunoprécipite avec plusieurs récepteurs, une sous-unité du protéasome 26S, et une pompe à proton ATPase nommée OST2 (Smalle *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2010). Les pompes à proton ATPases sont aussi les cibles des phototropines (les récepteurs de la lumière bleue qui permettent à la plante de suivre la direction du soleil) (Inoue *et al.*, 2011), et des pathogènes qui entrent dans la plante par la voie stomatique (Liu *et al.*, 2009; Elmore & Coaker, 2011).

Toutes les études sur l'évolution climatique parviennent à la conclusion selon laquelle au cours de ce siècle une grande partie de la superficie mondiale sera touchée par une grave sécheresse. Cette tendance est déjà bien visible. La mer d'Aral, étendue d'eau égale à 10 % de la taille de la France (soit 60 000 km²), est aujourd'hui un lac salé qui s'assèche au milieu d'un désert. Trente années de monoculture forcenée du coton et le détournement à des fins d'irrigation de deux fleuves qui alimentaient la mer d'Aral ont abouti à un désastre écologique. Le Lac Tchad, autrefois le plus grand lac d'Afrique, qui couvrait dans les années 1960 une superficie de 26 000 km², n'occupe plus que 1500 km² dans les années 2000. Le déficit de pluviosité combiné à une plus grande utilisation des eaux

du lac et des rivières pour l'irrigation expliquent ce recul. La navigation y est désormais impossible. Même en Europe, une zone géographiquement qualifiée de tempérée, des périodes de pénuries en eau surviennent de plus en plus souvent.

Combien de litres d'eau consommons-nous quotidiennement et inconsciemment en dehors des grandes quantités déjà utilisées pour les besoins agricoles? Voici quelques chiffres impressionnants : 10 000 litres d'eau auraient été nécessaires pour la confection de votre jean (l'irrigation du coton), entre 1500 et 2700 litres pour une chemise, 35 000 litres d'eau auraient été nécessaires pour la production d'une voiture, et comble de l'ironie, 7 litres d'eau pour la fabrication d'une bouteille d'eau en plastique...(sources de l'information : *Water Resource of the United States* et *Encyclopedia.com*). Et nous n'avons pas encore cité la consommation consciente et quotidienne de l'eau potable (pour les bains/douches, la cuisine, les toilettes, le lavage du linge, les piscines... etc.). En y ajoutant les besoins agricoles, le constat, déjà mentionné dans le résumé plus haut, est qu'entre 200 et 700 litres d'eau douce auraient été utilisés tous les jours par chaque habitant des pays industrialisés pour assurer un certain niveau de confort. Mais, combien de temps encore pourrions-nous continuer ainsi? Y a-t-il des risques de conflits liés à l'eau, comme avaient déjà mis en garde certains experts, à mesure que la demande mondiale en eau potable va croître et que les réserves ne progresseront pas au même rythme (Libération, 22 mars 2010)?

Outre des mesures restrictives permettant de limiter le gaspillage d'eau douce, que pourrions-nous envisager dans l'immédiat pour mettre en œuvre les connaissances acquises en recherche fondamentale au service de l'amélioration des plantes de grandes cultures? Rappelons que l'agoniste synthétique de l'ABA, la pyrabactine, peut se lier à PYL2 par le mécanisme de conformation induite dans deux orientations, formant ainsi un complexe "productif" ou "non-productif" (figure 4C). Ce constat a donné l'idée que des antagonistes de l'ABA pourraient exister chez les plantes pour verrouiller le récepteur, et constituer ainsi un mécanisme de sécurité pour empêcher l'éventuelle activation aléatoire de la cascade, tout en permettant à l'ABA de participer au développement de la plante (Chen, 2010; Melcher *et al.*, 2010). Les connaissances acquises, grâce à des études structurales et biochimiques (inhibition d'activités PP2C ou phosphorylation d'une cible *in vitro* comme tests révélateurs) sur les complexes récepteur-ABA, récepteur-ABA-PP2C, récepteur-pyrabactine et récepteur-pyrabactine-PP2C, laissent entrevoir une vraie possibilité de concevoir des modulateurs chimiques permettant d'améliorer la résistance des plantes de grande culture face aux défis climatiques.

Remerciements. Les travaux des auteurs sont financés par l'Agence Nationale de Recherche 08-BLAN-01 312133. Nous remercions Camille Grillon pour la révision du manuscrit.

Références

- Bienert G.P., Moller A.L., Kristiansen K.A., Schulz A., Moller I.M., Schjoerring J.K., Jahn T.P., Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem*, 2007, 282, 1183–1192.
- Chen I., ABA receptor diversity. PSI-Nature Structural Biology Knowledgebase, 2010, <http://sbkb.org/update/2010/11/full/sbkb.2010.49.html>
- Cho D., Shin D., Jeon B.W., Kwak J.M., ROS-mediated ABA signaling. *J Plant Biol*, 2009, 52, 102–113.
- Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R., Abrams S.R., Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61, 651–679.
- Dupeux F., Antoni R., Betz K., Santiago J., Gonzalez-Guzman M., Rodriguez L., Rubio S., Park S.-Y., Cutler S.R., Rodriguez P.L., Márquez J.A., Modulation of abscisic acid signaling *in vivo* by an engineered receptor-insensitive protein phosphatase type 2C allele. *Plant Physiol*, 2011a, 115, 106–116.
- Dupeux F., Santiago J., Betz K., Twycross J., Park S.-Y., Rodriguez L., Gonzales-Guzman M., Jensen M.R., Krasnogor N., Blackledge M., Holdsworth M., Cutler S.R., Rodriguez P.L., Márquez J.A., A thermodynamic switch modulates abscisic acid receptor sensitivity. *EMBO J*, 2011b, 30, 4171–4184.
- Elmore J.M., Coaker G., The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant-microbe interactions. *Mol Plant*, 2011, 4, 416–427.
- Flexas J., Ribas-Carbó M., Diaz-Espejo A., Galmés J., Medrano H., Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ*, 2008, 31, 602–621.
- Fujii H., Verslues P.E., Zhu J.-K., Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19, 485–494.
- Fujii H., Chinnusamy V., Rodrigues A., Rubio S., Antoni R., Park S.-Y., Cutler S.R., Sheen J., Rodriguez P.L., Zhu J.-K., *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature*, 2009, 462, 660–664.
- Furuihata T., Maruyama K., Fujita Y., Umezawa T., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2006, 103, 1988–1993.
- Hu H., Boisson-Dernier A., Israelsson-Nordstrom M., Bohmer M., Xue S., Ries A., Godoski J., Kuhn J.M., Schroeder J.I., Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂ controlled stomatal movements in guard cells. *Nat Cell Biol*, 2010, 12, 87–93.

- Inoue S.-i., Takemiya A., Shimazaki K., Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 13, 587–593.
- Joshi-Saha A., Valon C., Leung J., A brand new start: Abscisic acid perception and transduction in the guard cell. *Sci Signal*, 2011 4, re4.
- Kang J., Hwang J.-U., Lee M., Kim Y.-Y., Assmann S.M., Martinoia E., Lee Y., PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, 2355–2360.
- Kuromori T., Miyaji T., Yabuuchi H., Shimizu H., Sugimoto E., Kamiya A., Moriyama Y., Shinozaki K., ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, 2361–2366.
- Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangel J.L., Bloom R.E., Bodde S., Jones J.D., Schroeder. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 2003, 22, 2623–2633.
- Leonhardt N., Kwak J.M., Robert N., Waner D., Leonhardt G., Schroeder J.I., Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell*, 2004, 16, 596–615.
- Leung J., Controlling hormone action by subversion and deception. *Science*, 2012, 335, 46–47.
- Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P.-C., Guerrier D., Chedford F., Giraudat J., *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, 1994, 264, 1448–1452.
- Leung J., Merlot S., Giraudat J., The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, 1997, 9, 759–771.
- Levchenko V., Konrad K.R., Dietrich P., Roelfsema M.R.G., Hedrich R., Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca^{2+} signals. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, 102, 4203–4208.
- Liu J., Elmore J.M., Fuglsang A.T., Palmgren M.G., Staskawicz B.J., Coaker R., RIN4 functions with plasma membrane H^{+} -ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol*, 2009, 7, e10001139.
- Melcher K., Ng L.-M., Zhou X.E., Soon F.-F., Xu Y., Suino-Powell K.M., Park S.-Y., Weiner J.J., Fujii H., Chinnusamy V., Kovach A., Li A.-B., Wang Y., Li J., Peterson F.C., Jensen D.R., Yong E.-L., Volkman B.F., Cutler S.R., Zhu J.-K., Xu H.E., A gate-latch-lock mechanisms for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature*, 2009, 462, 602–608.
- Melcher K., Xu Y., Ng L.-M., Zhou X.E., Soon F.-F., Chinnusamy V., Suino-Powell K.M., Kovach A., Tham F.S., Cutler S.R., Li J., Yong E.-L., Zhu J.-K., Xu H.E., Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17, 1102–1108.
- Meyer K., Leube M.P., Grill E., A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 1994, 264, 1452–1455.
- Miyazono K.-i., Miyakawa T., Sawano Y., Kubota K., Kang H.-J., Asano A., Miyauchi Y., Takahashi M., Yoshida T., Kodaira K., Yamaguchi-Shinozaki K., Tanokura M., Structural basis of abscisic acid signaling. *Nature*, 2009, 462, 609–614.
- Mrinalini T., Latha Y.K., Raghavendra A.S., Das V.S.R., Stimulation and inhibition by bicarbonate of stomatal opening in epidermal strips of *Commelina benghalensis*. *New Phytol*, 1982, 91, 413–418.
- Mustilli A.-C., Merlot S., Vavasseur A., Fenzi F., Giraudat J., *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell*, 2002, 14, 3089–3099.
- Negi J., Matsuda O., Nagasawa T., Oba Y., Takahashi H., Kawai-Yamada M., Uchimiya H., Hashimoto M., Iba K., CO_2 regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*, 2008, 452, 483–486.
- Nishimura N., Hitomi K., Arvai A.S., Rambo R.P., Hitomi C., Cutler S.R., Schroeder J.I., Getzoff E.D., Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science*, 2009, 326, 1373–1379.
- Nishimura N., Sarkeshik A., Nito K., Park S.Y., Wang A., Carvalho P.C., Lee S., Caddell D.F., Cutler S.R., Chory J., Yates J.R., Schroeder J.I., PYR/PYL/RCAR family members are major *in-vivo* ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2010, 61, 290–299.
- Park S.-Y., Fung P., Nishimura N., Jensen D.R., Fujii H., Zhao Y., Lumba S., Santiago J., Rodrigues A., Chow T.F., Alfred S.E., Bonetta D., Finkelstein R., Provart N.J., Desveaux D., Rodriguez P.L., McCourt P., Zhu J.K., Schroeder J.I., Volkman B.F., Cutler S.R., Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 2009, 324, 1068–1071.
- Radauer C., Lackner P., Breiteneder H., The Bet V 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evol Biol*, 2008, 8, 286.
- Raghavendra A.S., Gonugunta V.K., Christmann A., Grill E., ABA perception and signalling. *Trends in Plant Sci*, 2010, 15, 395–401.
- Rodriguez P.L., Benning G., Grill E., ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 1998, 421, 185–190.
- Saez A., Apostolova N., Gonzalez-Guzman M., Gonzalez-Garcia M.P., Nicolas C., Lorenzo O., Rodriguez P.L., Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant J*, 2004, 37, 354–369.
- Santiago J., Rodrigues A., Saez A., Rubio S., Antoni R., Dupeux F., Park S.-Y., Marquez J.A., Cutler S.R., Rodriguez P.L., Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J*, 2009, 60, 575–588.

- Sato A., Sato Y., Fukao Y., Fujiwara M., Umezawa T., Shinozaki K., Hibi T., Taniguchi M., Miyake H., Goto D.B., Uozumi N., Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J*, 2009, 424, 438–448.
- Sirichandra C., Gu D., Hu H.-C., Davanture M., Lee S., Djaoui M., Valot B., Zivy M., Leung J., Merlot S., Kwak J.M., Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett*, 2009, 583, 2982–2986.
- Sirichandra C., Davanture M., Turk B.E., Zivy M., Valot B., Leung J., Merlot S., *Arabidopsis* ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PLoS One*, 2010, 5, e13935.
- Smalle J., Kurepa J., Yang P., Emborg T.J., Babiychuk E., Kushnir S., Vierstra R.D., The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in *Arabidopsis* growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 2003, 15, 965–980.
- Soon F.-F., Ng L.-M., Zhou X.E., West G.M., Kovach A., Tan H.M., Suino-Powell K.M., He Y., Xu Y., Chalmers M.J., Brunzelle J.S., Zhang H., Yang H., Jiang H., Li J., Yong E.-L., Cutler S., Zhu J.-K., Griffin P.R., Melcher K., Xu H.E., Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science*, 2011, 335, 85–88.
- Szostkiewicz I., Richter K., Kepka M., Demmel S., Ma Y., Korte F.F., Assaad A., Christmann E., Grill E., Closely-related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J*, 2010, 61, 25–35.
- Tardieu F., Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends in Plant Sci*, 2003, 8, 9–14.
- Terashima I., Ono K., Effects of HgCl₂ on CO₂ dependence of leaf photosynthesis: Evidence indicating involvement of aquaporins in CO₂ diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43, 70–78.
- The News Staff. Breakthrough of the year. The Runners-Up. *Science*, 2009, 326, 1600–1607.
- Uehlein N., Lovisolo C., Siefritz F., Kaldenfoff R., The tobacco aquaporin *NtAQP1* is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*, 2003, 425, 734–737.
- Umezawa T., Sugiyama N., Mizoguchi M., Hayashi S., Myouga F., Yamaguchi-Shinozaki K., Ishihama Y., Hirayama T., Shinozaki K., Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 17588–17593.
- Vahisalu T., Kollist H., Wang Y.-F., Nishimura N., Chan W.-Y., Valero G., Lamminmäki A., Brosche M., Moldau H., Desikan R., Schroeder J.I., Kangasjärvi J., SLAC1 is required for plant guard cells S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, 2008, 452, 487–491.
- Vahisalu T., Puzõrjova I., Brosché M., Valk E., Lepiku M., Moldau H., Pechter P., Wang Y.-S., Lindgren O., Salojärvi J., Loog M., Kangasjärvi J., Kollist H., Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J*, 2010, 62, 442–453.
- Vlad F., Turk B.E., Peynot P., Leung J., Merlot S., A versatile strategy to define phosphorylation preferences of plant protein kinases and screen for putative substrates. *Plant J*, 2008, 55, 104–117.
- Vlad F., Rubio S., Rodriguez A., Sirichandra C., Belin C., Robert N., Leung J., Rodriguez P.L., Laurière C., Merlot S., Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21, 3170–3184.
- Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C., Redko Y., Jammes F., Valon C., Frei dit Frey N., Leung J., An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant*, 2008, 1, 198–217.
- Xie X., Wang Y., Williamson L., Holroyd G.H., Tagliavia C., Murchie E., Theobals J., Knight M.R., Davies W.J., Leyser H.M.O., Hetherington A.M., The identification of genes involved in the stomatal response to reduced atmospheric relative humidity. *Curr Biol*, 2006, 16, 882–887.
- Xue S., Hu H., Ries A., Merilo E., Kollist H., Schroeder J.I., Channel functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO₂ signal transduction in guard cell. *EMBO J*, 2011, 30, 1645–1658.
- Yin P., Fan H., Hao Q., Yuan X., Wu D., Pang Y., Yan C., Li W., Wang J., Yan N., Structural insights into mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nat Struct Biol*, 2009, 16, 1230–1236.
- Yoshida T., Fujita Y., Sayama H., Kidokoro S., Maruyama K., Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., AREB1, AREB2, and AREB3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J*, 2010, 61, 672–685.