

Hexokinase mitochondriale, enzyme clé de la bioénergétique cellulaire : une cible potentielle pour une thérapeutique anticancéreuse

**Stéphane Oudard
Eric Boitier
Anne Poupon
Laurent Miccoli
Marie-France Poupon**

ADRESSES

S. Oudard : docteur en médecine, étudiant en thèse en biologie, université Paris-VII. E. Boitier : étudiant en thèse en toxicologie. Biochimie pharmacologique et métabolique, Inserm U. 75, CHU Necker, 156, rue de Vaugirard, Paris Cedex 15, France. A. Poupon : étudiante en thèse de biomathématiques. Université Paris-VI-Paris VII, département des macromolécules biologiques, minéralogie-cristallographie, Cnrs URA 09, 4, place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France. L. Miccoli : étudiant en thèse de biologie, université Paris VII. M.F. Poupon : docteur en médecine, docteur en biologie humaine, directeur de recherche à l'Inserm, responsable du laboratoire de thérapeutique expérimentale de l'unité mixte de recherche 147 du Cnrs et de l'Institut Curie. Cytogénétique moléculaire et oncologie, Cnrs UMR 147, Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75231 Paris Cedex 05, France.

TIRÉS À PART

M. F. Poupon.

m/s n° 8, vol. 11, août 95

L'hexokinase (HK), en catalysant la phosphorylation du glucose, joue un rôle capital dans le métabolisme de tissus dont le glucose est la source d'énergie. Parmi les quatre isoformes connues, HK-IV ou glucokinase est majoritaire dans le foie mais HK-I l'est dans le cerveau, le rein et dans les tumeurs malignes. Elle est libre et cytoplasmique, ou liée et ancrée à la mitochondrie, ce qui augmente considérablement son activité enzymatique. On pense qu'il existe un contrôle de sa fonction fondé sur des changements de conformation entre formes libres et formes liées, ce qui permet de comprendre la cinétique enzymatique de l'HK-I. Cette enzyme constitue un intermédiaire essentiel entre le cycle oxydatif et la glycolyse : sa régulation par ancrage porinique constitue un système performant d'adaptation aux modifications des apports en oxygène ou en glucose. Dans les tumeurs malignes, la glycolyse est active même en aérobiose, et l'HK-I mitochondriale contribue à maintenir une activité métabolique intense, même en hypoxie : cette enzyme pourrait donc se révéler être une cible thérapeutique intéressante.

L'hexokinase (HK : ATP : D-hexose 6-phosphotransférase, EC 2.7.1.1) catalyse la première étape de la glycolyse. Sa double localisation intracellulaire libre ou liée à la mitochondrie est caractéristique, et conduisit Wilson à qualifier l'HK d'enzyme « ambiquitaire » [1]. La fraction liée est en équilibre avec la fraction soluble, cet équilibre pouvant être à tout moment modifié en cas de stress métabolique. En cela, l'HK s'apparente aux *heat shock proteins*, qui sont guidées vers la mitochondrie par un peptide signal, tout comme l'HK est guidée par sa séquence N-terminale. La conséquen-

RÉFÉRENCES

1. Wilson JE. Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1995; 126: 65-198.
2. Sprengers ED, Koenderman AHL, Staal GEJ. Mitochondrial and cytosolic hexokinase from rat brain: one and the same enzyme? *Biochim Biophys Acta* 1983; 755: 112-8.
3. Parry DM, Pedersen PL. Intracellular localization of rat kidney hexokinase. *J Biol Chem* 1984; 259: 8917-23.
4. Knull HR, Taylor WF, Wells WW. Effects of energy metabolism on *in vivo* distribution of hexokinase in brain. *J Biol Chem* 1973; 248: 5414-7.
5. Katzen HM, Schimke RT. Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965; 62: 1218-25.
6. Adams V, Griffin L, Towbin J, Gelb B, Worley K, McCabe ERB. Porin interaction with hexokinase and glycerol kinase: metabolic microcompartmentation at the outer mitochondrial membrane. *Biochem Med Metab Biol* 1991; 45: 271-91.
7. Preller A, Wilson JE. Localization of the type III isozyme of hexokinase at the nuclear periphery. *Arch Biochem Biophys* 1992; 294: 482-92.
8. Magnuson MA. Tissue-specific regulation of glucokinase gene expression. *J Cell Biochem* 1992; 48: 115-21.
9. Agius L. Control of glucokinase translocation in rat hepatocytes by sorbitol and the cytosolic redox state. *Biochem J* 1994; 298: 237-43.
10. Malaisse WJ. Anomalies du métabolisme insulaire dans le diabète. *médecine/sciences* 1995; 11: 199-202.
11. VanSchaffingen E, Vandercammen A, Dethoux M. Un nouveau mode de régulation pour la glucokinase hépatique. *médecine/sciences* 1992; 8: 46-52.
12. Griffin LD, Gelb BD, Wheeler DA, Davison D, Adams V, McCabe ERB. Mammalian hexokinase I: evolutionary conservation and structure to function analysis. *Genomics* 1991; 11: 1014-24.

ce de la liaison mitochondriale de l'HK est une élévation immédiate et importante de la glycolyse. Parmi les quatre isoenzymes de l'HK, l'HK-I fait l'objet d'un intérêt tout particulier dû à l'importance de la glycolyse dans le métabolisme des cancers car l'HK-I est l'isoenzyme majoritaire dans les cellules tumorales.

Localisation tissulaire des isoenzymes de l'hexokinase et équilibre dynamique

Les quatre isoenzymes se distinguent par leur localisation tissulaire et par leurs propriétés cinétiques; elles sont codées par des gènes différents (Tableau I). L'HK-I est présente dans

tous les tissus. La concentration de cette isoenzyme est élevée dans le rein et le cerveau où elle est liée à 70 % aux mitochondries [1]. Dans le tissu cérébral, elle est plus concentrée dans la substance grise que dans la substance blanche [2]. Dans le rein, elle est faiblement représentée dans le cortex, intermédiaire au niveau médullaire, et élevée au niveau papillaire [3]. La proportion d'HK-I liée aux mitochondries est élevée au niveau du tube contourné distal-terminal, zone d'échanges ioniques dépendants de l'ATP. Les isoenzymes I-III sont soumises à un équilibre qui varie en fonction du statut physiologique du tissu concerné: une redistribution de l'HK-I vers la

Tableau I
CARACTÉRISTIQUES DES ISOENZYMES DE L'HEXOKINASE

Isoenzymes	Localisation tissulaire et distribution	Caractéristiques enzymatiques
HK-I	Ubiquitaire ^a , majoritaire dans le rein cortex: HK libre médullaire: HK libre/liée papillaire: HK liée dans le cerveau substance blanche: HK libre substance grise: HK liée	Substrats: D-glucose D-fructose D-mannose Propriétés cinétiques: K _m glucose faible (0,1 mM) V _{max} glucose élevée Inhibition: Glucose 6-phosphate MM: 100 kDa
HK-II	Muscle squelettique ^b Glandes mammaires ^b Tissu adipeux ^b	Régulation: Insuline MM: 100 kDa
HK-III	Foie	MM: 100 kDa
HK-IV ou Glucokinase	Foie: libre Pancréas: HK libre et liée	Substrats: D-glucose Propriétés cinétiques: K _m glucose élevée (10 mM) V _{max} glucose faible Régulation HK-IV hépatique: Insuline, glucagon, biotine Triiodothyronine Inhibition HK-IV pancréatique: Glucose (?) Pas d'inhibition par: Glucose-6-phosphate MM: 50kDa

a. L'hexokinase est retrouvée dans tous les tissus.

b. La distribution intracellulaire de l'hexokinase est variable en fonction du stimulus insulinaire. (?): la régulation de la glucokinase pancréatique par le glucose est discutée.

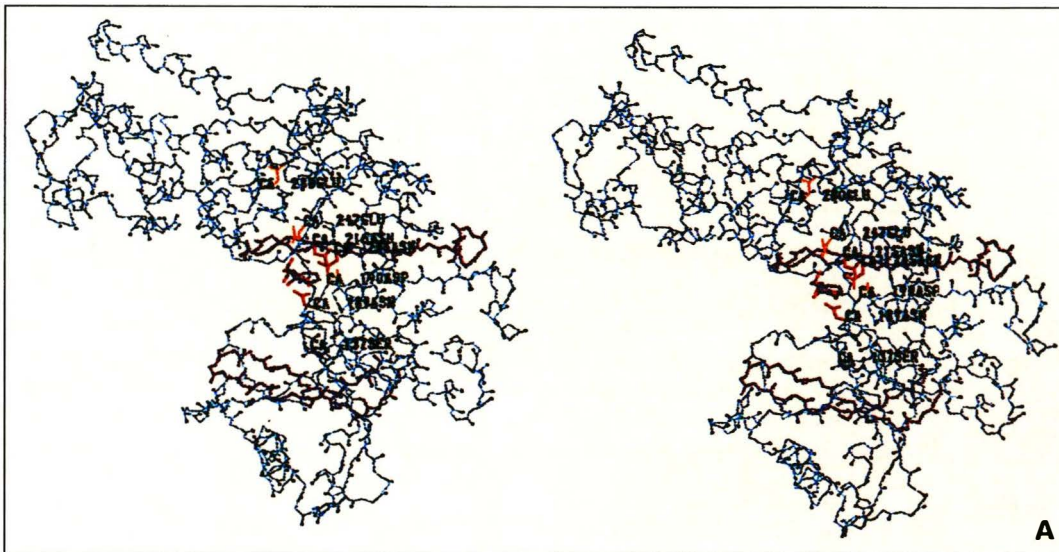
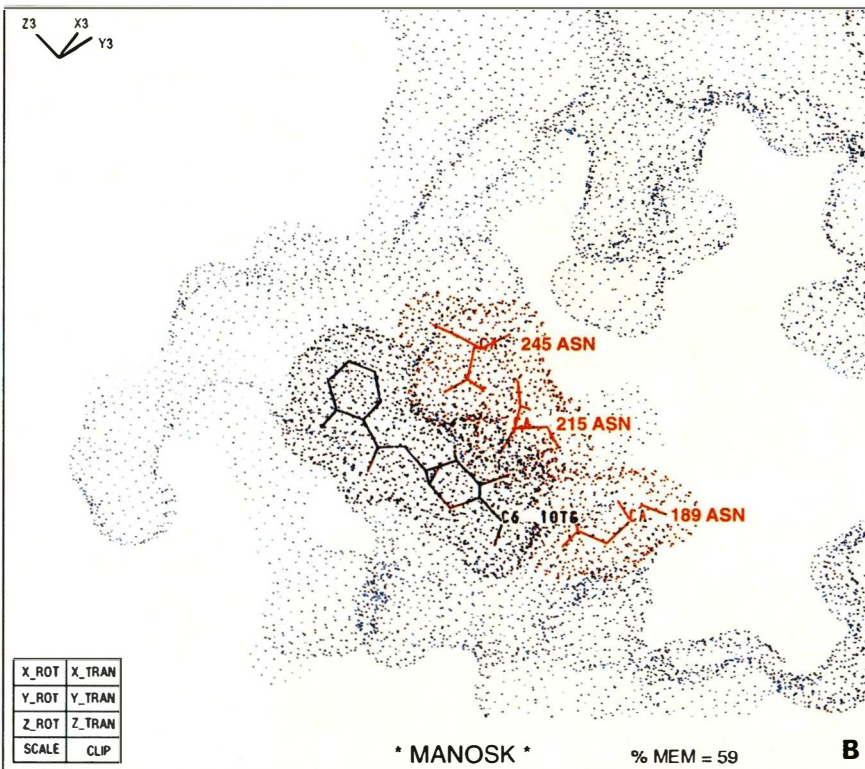


Figure 1. A. **Vue stéréoscopique du complexe HK-B de levure - O-toluidyl-glucosamine (HK-B, chaîne carbonée en vert et OTG, en violet).** Les premiers



acides aminés de l'HK n'ayant pas été vus par diffraction des rayons X, les numéros des résidus donnés ici, qui correspondent à la numérotation dans la PDB (protein data bank), sont différents de ceux dans la séquence obtenue chimiquement (donnés dans le texte). Nous avons fait apparaître ici les chaînes latérales des acides aminés interagissant avec la partie glucose de la molécule d'OTG (Asn¹⁸⁹, Asn²¹⁵, Asn²⁴⁵ en rouge), les chaînes latérales des acides aminés intervenant dans la fixation du glucose par l'HK-I de mammifère (Asp¹⁹⁰, Glu²⁴⁷, Glu²⁸⁰ en orange) et les zones supposées d'interaction avec l'ATP (résidus 61 à 82 et 207 à 226, en violet) ainsi que la sérine 137 phosphorylée en présence d'ATP (en bleu foncé). B. **Coupe du site de fixation du glucose de l'HK-B de levure.** La molécule d'OTG est représentée en violet, les acides aminés interagissant avec la partie glucose de la molécule d'OTG (Asn¹⁸⁹, Asn²¹⁵, Asn²⁴⁵) sont représentés en rouge, les autres acides aminés de l'HK visibles sur cette coupe sont représentés en bleu.

mitochondrie s'effectue de façon très rapide en cas d'ischémie cérébrale. A partir d'un modèle de poulet, Knull *et al.* ont montré une augmentation de l'HK cérébrale liée de 53% à 83%, 30 et 150 s après décapitation [4]. L'HK-II est retrouvée dans les tissus dépendants de l'insuline, tels le muscle squelettique, le tissu adipeux

et la glande mammaire. L'ancrage mitochondrial dépend de l'insuline et des anticorps anti-insuline permettent de solubiliser l'HK-II mitochondriale [5]. L'HK-III est retrouvée dans la rate et le foie où elle est principalement liée aux mitochondries [6] et au niveau de la membrane nucléaire [7].

L'HK-IV, ou glucokinase, dont l'activation et la synthèse sont sous le contrôle de l'insuline, de la biotine et de la triiodothyronine, est trouvée majoritairement dans le foie. Elle est inhibée par le glucagon *via* l'AMPc. L'activité de la glucokinase dans les cellules β -pancréatiques est uniquement sous le contrôle du glucose

RÉFÉRENCES

13. Anderson CM, Stenkamp RE, McDonald RC, Steitz TA. A refined model of the sugar binding site of yeast hexokinase B. *J Mol Biol* 1978; 123: 207-19.
14. Arora KK, Fanciulli M, Pedersen PL. Glucose phosphorylation in tumor cells: Cloning sequencing and overexpression in active form of a full length cDNA encoding a mitochondrial bindable form of hexokinase. *J Biol Chem* 1990; 265: 6481-8.
15. Bork P, Sander C, Valencia A. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7290-4.
16. Arora KK, Filburn CR, Pedersen PL. Structure/function relationships in hexokinase. *J Biol Chem* 1993; 268: 18259-66.
17. Schwab DA, Wilson JE. Complete amino acid sequence of rat brain hexokinase, deduced from the cloned cDNA, and proposed structure of a mammalian hexokinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2563-7.
18. Bennett WS, Steitz TA. Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose. *J Mol Biol* 1980; 140: 211-30.
19. Jarori GK, Iyer SB, Kasturi SR, Kenkare UW. Mapping of glucose and glucose-6-phosphate binding sites on bovine brain hexokinase. *Eur J Biochem* 1990; 188: 9-14.
20. Arora KK, Parry DM, Pedersen PL. Hexokinase receptors: preferential enzyme binding in normal cells to nonmitochondrial sites and in transformed cells to mitochondrial sites. *J Bioenerg Biomembr* 1992; 24: 47-53.
21. Blachly-Dyson E, Baldini A, Litt M, McCabe ERB, Forte M. Human genes encoding the voltage-dependent anion channel (VDAC) of the outer mitochondrial membrane: mapping and identification of two new isoforms. *Genomics* 1994; 20: 62-7.
22. Kottke M, Adams V, Riesinger I, Bremm G, Bosch W, Brdiczka D, Sandri G, Panfili E. Mitochondrial boundary membrane contact sites in brain. *Biochim Biophys Acta* 1988; 395: 807-32.
23. Vignais PV. Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1976; 456: 1-38.
24. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3170-4.
- [8], encore que cette régulation elle-même soit contestée. La glucokinase hépatique est présente sous forme libre à des concentrations en glucose de 15 à 30 mM, liée aux microfilaments du cytosquelette en présence de 5 mM de glucose [9] et mitochondriale dans les îlots de Langerhans du pancréas [10].

Caractéristiques cinétiques

Selon leurs propriétés cinétiques, on distingue deux groupes d'hexokinases. Les HK-I, HK-II et HK-III ont une forte affinité et une constante de Michaelis (K_m) faible pour tous les hexoses (environ 0,1 mM), libres ou en solution, elles sont fortement inhibées par le glucose 6-phosphate (G6-P). L'inhibition par le G6-P de l'HK-I liée est inférieure à celle de la forme libre. L'HK-IV est spécifique du glucose, n'est pas inhibée par le G6-P et a un K_m plus élevé (environ 10 mM). Elle a une fonction de stockage du glucose sous forme de glycogène dans le tissu hépatique [11].

Gènes et structures peptidiques

Les gènes codant pour les HK-I, HK-II et HK-III proviendraient de la duplication/fusion d'un gène ancestral qui aurait codé pour une protéine de 50 kDa. Le gène de l'HK-I humaine est localisé sur le chromosome 10 en position q22; il est transcrit sous forme d'un ARNm de 2,9 kb [12]. Les gènes codant pour les deux autres isoenzymes n'ont pas encore été localisés. Le gène de la glucokinase est localisé sur le chromosome 7 (7p). La glucokinase est un polypeptide de 465 acides aminés d'une masse moléculaire de 50 kDa. Elle présente, respectivement, 53 % et 33 % d'analogie de séquence avec la moitié C-terminale de l'HK-I de cerveau de rat [8]. Les HK-I, HK-II et HK-III sont des polypeptides de 918 acides aminés, d'une masse moléculaire de 100 kDa. Les HK-I du tissu rénal humain, de cerveau de rat et de bovin et d'hépatocarcinome de souris sont largement homologues. Les deux sous-unités C- et N-terminales présentent une identité de séquences

de 68 % entre elles et chacune de 60 % avec l'HK de levure.

L'hexokinase de levure, modèle de structure tridimensionnelle

Du fait de la forte identité de structure entre les HK de mammifère et de levure (HK-A et HK-B), il est probable qu'elles présentent de fortes similitudes dans leurs repliements tridimensionnels. La structure des HK de levure ayant été déterminée par cristallographie, l'étude de leurs relations structure-fonction est plus aisée et on en a déduit des informations relatives au fonctionnement des HK de mammifère. Anderson *et al.* [13] ont déterminé la structure du complexe HK-B-OTG (O-toluoylglucosamine). La molécule d'OTG est un inhibiteur compétitif de la fixation du glucose qui se lie à l'HK-B en adoptant la même conformation que le glucose, au niveau du site accepteur. L'affinement à 2,1 Å de la structure du complexe a permis de mettre en évidence trois acides aminés dont les chaînes latérales interagissent avec les groupements hydroxyls 3 et 4 de la molécule d'OTG. Ce sont les résidus asparagine en positions 210, 237 et 267 (*figures 1A et 1B*, les numéros des résidus donnés sur les figures correspondent à la numérotation de la *protein data bank*, PDB), soit respectivement, 189, 215 et 245*), elles sont conservées dans les HK de mammifère correspondant, dans la sous-unité C-terminale de l'HK-I, aux résidus asparagine 656, 683 et 706 et, dans la sous-unité N-terminale, aux résidus asparagine 208, 235 et 258. Selon Arora *et al.* [14], dans le cas de l'HK-I de mammifère, ce sont, respectivement, les résidus Asp²⁰⁹, Glu²⁶⁰ et Glu²⁹⁴, Asp⁶⁵⁷, Glu⁷⁰⁸ et Glu⁷⁴² dans chacune des deux sous-unités qui interviendraient dans la fixation du glucose. Ces résultats sont transposables à l'HK de levure en ce qui concerne ces résidus (qui correspondent dans HK-B aux résidus Asp²¹¹, Glu²⁶⁹ et Glu³⁰² (soit Asp¹⁹⁰, Glu²⁴⁷, Glu²⁸⁰ selon la PDB). Sur la *figure 1B*, le résidu Glu³⁰² (Glu²⁸⁰ selon la PDB) semble très éloigné du substrat. Cela est dû au fait que tous les atomes n'ont pas été vus en cristallographie; l'orientation de la chaîne latérale n'est donc pas connue avec certitude. Cependant, la distance entre le car-

* La numérotation de la PDB ne tient pas compte des premiers acides aminés qui n'étaient pas visibles sur les images de diffraction des rayons X.

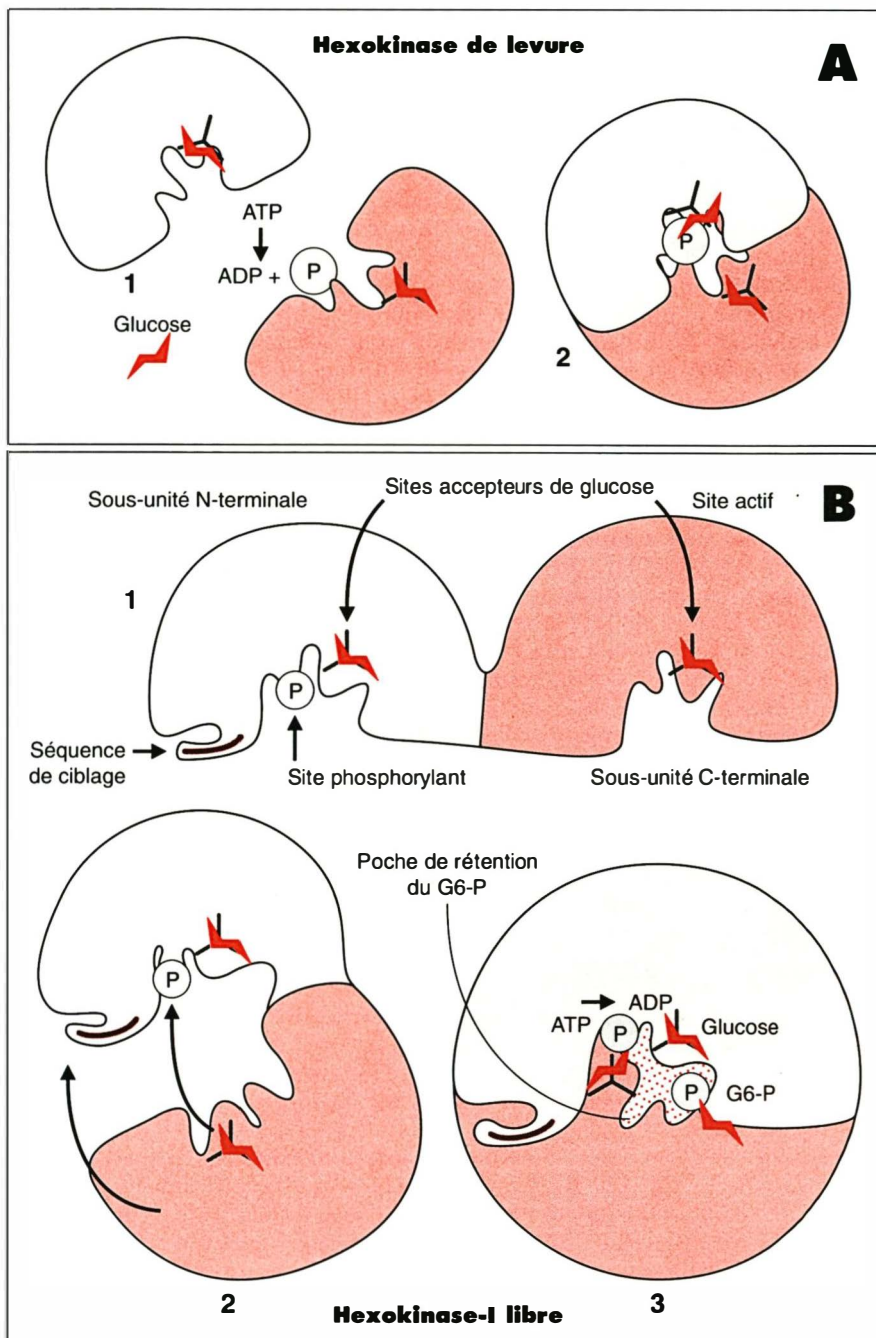


Figure 2. **Mécanisme de phosphorylation du glucose par l'HK de levure et de mammifère, faits et hypothèses.** A. L'HK de levure fonctionne en dimère (1). Un repliement est induit lors de la fixation du glucose sur le site accepteur. Une molécule d'ATP serait alors captée au sein du dimère; un rapprochement suffisant avec une molécule de glucose permettrait alors un transfert direct du phosphate, ou le phosphate serait transféré sur un acide aminé de l'HK et la phosphorylation du glucose serait secondaire (2). B. L'HK de mammifère est dimérique. Elle porte deux sites accepteurs du glucose (1). La fixation du glucose s'accompagne d'un changement de conformation des sites accepteurs. Ce changement de conformation pourrait permettre l'interaction du glucose fixé sur le site en C-terminal avec un site de l'extrémité N-terminale, phosphorylé au contact d'une molécule d'ATP (2). Une poche acceptrice du G6-P formé serait alors constituée (3) et la présence du G6-P inhiberait transitoirement la phosphorylation ultérieure du glucose.

bone α du Glu³⁰² et le groupement hydroxyl en position 6 de OTG est de 12,2 Å et la distance entre le carbone α et les oxygènes terminaux de ce résidu peut atteindre 10,8 Å. En supposant que ce résidu adopte une orientation différente de celle de la figure 1B, il serait possible qu'il interagisse avec le glucose. La sérine¹⁵⁸, sérine¹³⁷ selon la PDB (correspondant dans HK-I aux résidus sérine 155 et 603, selon Arora *et al.*) est trop éloignée du glucose pour que le transfert d'un phosphate puisse se faire directement entre les deux (distance C α - C₆OTG: 11,1 Å). Cette constatation a également été faite dans le cas des HK de mammifères. En ce qui concerne le site de fixation de l'ATP, il est possible d'avoir une idée de sa localisation par la mise en évidence de similitudes de repliement entre l'HK de levure, l'actine et la protéine de choc thermique (*heat shock protein*, hsp 70) [15], dont les structures sont très proches de celle de l'HK-I.

Phosphorylation du glucose, rôle de la conformation tridimensionnelle

Arora *et al.* ont montré que seule la sous-unité C-terminale est catalytique [16] alors que les deux sous-unités possèdent un site accepteur de glucose. La substitution des acides aminés du site accepteur de la moitié C-terminale empêche la fixation du glucose et sa phosphorylation [16]. Une substitution identique dans la sous-unité N-terminale empêche la fixation du glucose sans perte de l'activité catalytique de la protéine [16]. L'analyse de la séquence suggère un domaine de liaison de l'ATP dans chacune des sous-unités [17]. Quant au mécanisme de phosphorylation, Arora *et al.* postulent l'existence d'un site de fixation de l'ATP sur chacune des deux sous-unités de l'HK-I de mammifère. L'étude de l'HK de levure a fait proposer par Bennett et Steitz [18] que la sérine proche du site accepteur du glucose serait phosphorylée. Dans cette hypothèse, un groupement phosphate serait transféré secondairement sur le glucose. Bennett et Steitz ont montré que la fixation du glucose modifie la conformation tri-dimensionnelle de l'HK, resserrant son emprise sur la molécule de glucose (figure 1B). Ce premier

RÉFÉRENCES

25. Gelb B, Adams V, Jones S, Griffin L, MacGregor G, McCabe E. Targeting of hexokinase 1 to liver and hepatoma mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 202-6.
26. Graham JF, Cummins CJ, Smith BH, Kornblith PL. Regulation of hexokinase in cultured gliomas. *Neurosurgery* 1985; 17: 537-2.
27. Arora KK, Pedersen PL. Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism: evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J Biol Chem* 1988; 263: 17422-8.
28. Gots RE, Bessman SP. The functional compartmentation of mitochondrial hexokinase. *Arch Biochem Biophys* 1974; 163: 7-14.
29. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309-14.
30. Klimek F, Bannasch P. Isoenzyme shift from glucokinase to hexokinase is not an early but a late event in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1857-61.
31. Bustamante E, Pedersen P. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3735-9.
32. Cortassa S, Aon MA. Spatio-temporal regulation of glycolysis and oxidative phosphorylation *in vivo* in tumor and yeast cells. *Cell Biol Int* 1994; 18: 687-713.
33. Fanciulli M, Paggi MG, Bruno T, Carlo CD, Bonetto F, Gentile FP, Floridi A. Glycolysis and growth rate in normal and in hexokinase-transfected NIH-3T3 cells. *Oncol Res* 1994; 6: 405-9.
34. Nelson BD, Kabir F, Kolarov J, Luciakova K, Kuzela S, Latruffe N, Linden M. Immunohistochemical analysis of the membrane proteins of the rat liver and Zajdela hepatoma mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1984; 234: 24-30.
35. Baggetto LG. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie* 1992; 74: 959-74.
36. Oudard S, Poirson F, Miccoli L, Bourgeois Y, Vassault A, Poisson M, Magdelénat H, Dutrillaux B, Poupon MF. Mitochondrial-bound hexokinase: a target therapy of advanced gliomas. *Int J Cancer* 1995; 62: 1-7.

changement de conformation empêche le glucose et pourrait contribuer à la formation de la poche acceptrice du G6-P. Ce dernier point est confirmé par la perte d'accessibilité de ce site à des compétiteurs du G6-P après interaction avec le glucose.

Le mécanisme de transfert d'un phosphate de l'ATP vers le glucose reste à définir: une hypothèse originale serait que le glucose fixé sur le site catalytique C-terminal interagirait avec un site phosphorylé de la moitié N-terminale. Un argument en faveur de cette hypothèse vient de l'étude de l'HK de levure qui fonctionne en dimère [13, 18]: un seul glucose est phosphorylé pour deux HK, suggérant une complémentarité de deux molécules d'HK (figure 2A). Le glucose interagirait alors avec un phosphate transféré de l'ATP, transitoirement capté par le repliement d'une molécule d'HK sur une autre, cette interaction permettant le rapprochement, critique pour l'activité enzymatique, entre un glucose et un site accepteur de phosphate. Cette hypothèse est compatible avec l'analyse de structure, qui révèle un espace disponible entre deux HK interactives, juste suffisant pour capter une molécule unique d'ATP.

L'inhibition par le G6-P pourrait se faire, soit par fixation d'une molécule de glucose sur le site accepteur de l'extrémité C-terminale – elle y serait phosphorylée, inhibant transitoirement la fixation du glucose libre –, soit la molécule de glucose phosphorylée au site actif migrerait dans une structure voisine du site accepteur. Le site de fixation du glucose ainsi libéré serait de nouveau disponible, mais l'encombrement créé par le G6-P bloquerait transitoirement la phosphorylation, rendant inaccessible le glucose fixé ou empêchant l'interaction avec l'ATP. Le G6-P se fixe sur l'HK comme l'ont montré Jarori *et al.* [19]: ces auteurs, étudiant la distance qui sépare les sites de fixation du glucose et du G6-P, ont montré que les sites étaient distincts, respectivement à 11 Å et 8 Å du site catalytique de l'HK, suggérant une régulation allostérique.

Une différence essentielle entre l'HK de levure et l'HK non liée de mammi-fère tient dans l'inhibition par le G6-P de cette dernière. Cette différence tend à disparaître lorsqu'elle se

lie à la mitochondrie, peut-être grâce à des changements de conformation selon que l'HK est libre ou ancrée dans la mitochondrie (figure 2B). Dans la conformation de l'HK-I libre, la poche de fixation du G6-P serait formée et inhiberait la phosphorylation ultérieure du glucose. Dans la conformation liée, l'interaction entre l'extrémité N-terminale et la porine maintiendrait une structure telle que la poche acceptrice du G6-P ne serait pas formée, le G6-P serait immédiatement libéré, comme pour l'HK de levure. Cette hypothèse permet de rendre compte des changements très rapides (5 min au plus) de cinétique d'activité de l'HK-I, selon qu'elle est sous forme libre ou liée.

L'hexokinase et les porines mitochondriales

L'HK-I est liée à la membrane externe mitochondriale au niveau de porines, également appelées VDAC (*voltage-dependent anion channel*) [20] (figure 3). Il existe quatre gènes connus codant pour les protéines de type VDAC [21]. Les porines mitochondriales sont distribuées de façon aléatoire sur la membrane externe mitochondriale et présentent deux états fonctionnels, « ouvert » ou « fermé », contrôlés par le potentiel électrique membranaire. Certaines porines sont localisées à des points de contact entre les membranes interne et externe des mitochondries et l'HK se fixerait préférentiellement sur les porines localisées à ces points de contact [22]. Les porines permettent l'échange de molécules chargées négativement, comme l'ATP et l'ADP, dont la translocation est assurée par une ADP/ATP translocase [23]. Les porines font partie d'un complexe comportant le récepteur périphérique des benzodiazépines et l'ADP/ATP translocase (figure 3) [24]. Cet ensemble a pour fonction essentielle l'échange entre l'ATP mitochondrial et l'ADP cytosolique. L'HK-I interagit avec la porine par l'intermédiaire de son extrémité N-terminale [25]. L'intégrité de la séquence des douze acides aminés N-terminaux est nécessaire à l'ancrage mitochondrial. Une construction chimérique d'une

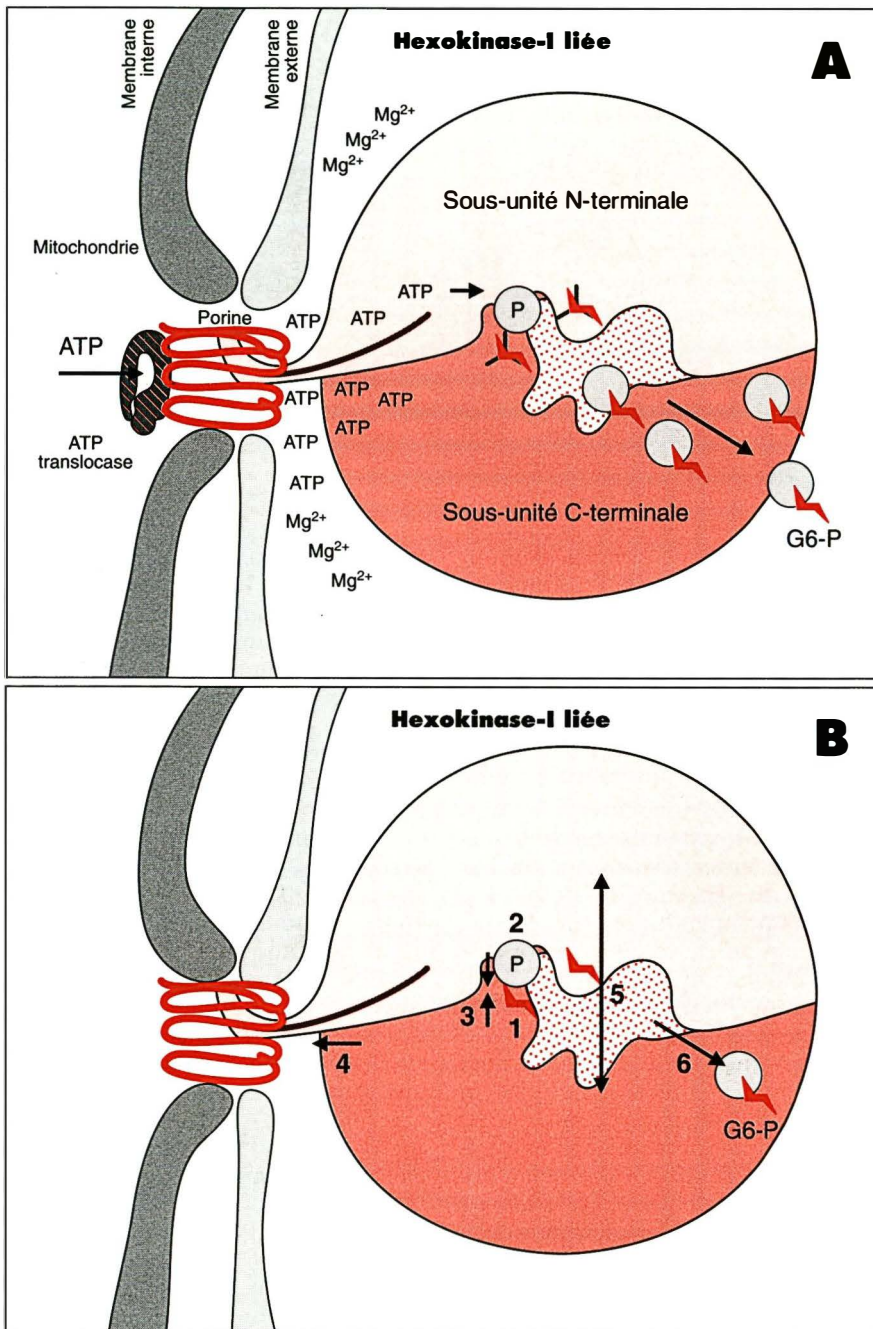


Figure 3. **Ancre mitochondrial de l'HK de mammifère.** **A.** Interaction entre la porine (voltage dependent anion channel, VDAC) présente sur la membrane externe de la mitochondrie et l'HK. L'ancre est assurée par l'extrémité N-terminale de l'HK, par un peptide de ciblage d'environ 12 acides aminés. Les molécules d'ATP synthétisées sont transportées hors de la mitochondrie par l'ADP/ATP translocase située du côté mitochondrial interne de la porine. **B.** Hypothèses relatives aux changements de conformation tridimensionnelle de l'HK liée et à la phosphorylation du glucose. Le premier changement concerne le resserrement du site de fixation du glucose (démonstré). En 2, la transphosphorylation de l'HK s'effectuerait à partir d'un phosphate de l'ATP. En 3, le rapprochement entre le site phosphorylé de l'HK et le glucose fixé permettrait le transfert du phosphate. Les étapes 4 et 5 seraient propres à l'enzyme HK liée: l'HK est ancrée dans la membrane mitochondriale par l'intermédiaire de la séquence peptidique N-terminale. Cette interaction empêcherait la formation de la poche acceptrice du G6-P formé, étape 6, et ainsi n'inhiberait pas la phosphorylation ultérieure du glucose. Au contraire, dans l'HK libre, la poche acceptrice de G6-P se formerait et inhiberait transitoirement l'HK, comme représenté sur la figure 2.

séquence nucléotidique codant pour les quinze derniers acides aminés de l'HK-I associée à un gène rapporteur incorporé dans un vecteur d'expression a été utilisée afin de déterminer la séquence responsable de la fixation de l'HK sur la mitochondrie. A cette fin, des délétions portant sur la séquence N-terminale ont été réalisées. Des délétions de plus de quatre acides aminés entraînent une perte

d'ancre mitochondrial [25]. Par ailleurs, ces mutations portant sur l'extrémité N-terminale n'ont pas d'effet sur l'activité catalytique ou régulatrice de l'HK-I [16]. Une perte d'ancre est également observée après protéolyse de HK-I par la chymotrypsine qui permet de libérer un fragment N-terminal de 10-kDa, ou par des anticorps dirigés contre cette région (Oudard *et al.*, manuscrit en préparation).

L'ancre mitochondrial de l'HK-I augmente son activité: le flux glycolytique de l'HK liée est supérieur à celui de l'HK libre. Dans des homogénats de glioblastomes, Graham *et al.* montrent que l'affinité de l'HK pour le glucose est identique entre les glioblastomes et la lignée astrocytaire témoin; en revanche, la cinétique de l'activité enzymatique est 2,5 fois plus élevée dans les glioblastomes [26]. Les différences ciné-

tiques observées montrent que la phosphorylation du glucose par l'HK liée est plus efficace que par l'HK libre. Ce meilleur rendement enzymatique de l'HK liée pourrait également être dû à un accès préférentiel de l'ATP produit par la mitochondrie et transporté *via* les porines [27]. Il est possible également que l'interaction de l'HK avec la porine contribue à maintenir ce canal en position « ouverte » augmentant le flux d'ATP. Comme suggéré ci-dessus, l'interaction entre porine et HK maintiendrait cette dernière dans une conformation telle que celle-ci ne serait plus inhibée par le G6-P. De plus, l'HK liée, stabilisée par son ancrage mitochondrial, serait protégée des protéases et moins thermolabile. Sa demi-vie serait de ce fait prolongée par rapport à celle de l'HK libre.

Enfin, le gradient de concentration d'ATP en présence d'ions Mg^{2+} au site porinique pourrait contribuer à maintenir la liaison de l'HK sur la mitochondrie: en utilisant de l'ATP marquée, Gots *et al.* ont montré que l'HK liée aux mitochondries de foie de rat a une meilleure affinité pour l'ATP mitochondriale que pour l'ATP cytosolique [28].

Il en résulte que les cellules ayant une activité HK liée majoritaire par rapport à une activité HK libre présentent un avantage énergétique lié à une glycolyse plus active. Mais surtout la mobilisation de l'HK libre vers la mitochondrie représente un mécanisme de contrôle quasi immédiat aux situations de stress créées, soit par une carence en glucose, soit par une anoxie, dans des tissus sensibles comme le tissu cérébral. Cette mobilisation apparaît également comme un mécanisme d'adaptation des cellules tumorales à développement rapide.

L'hexokinase dans les cellules cancéreuses

Warburg fut le premier à mettre en évidence une glycolyse élevée dans les tissus tumoraux dans des conditions d'aérobiose, au contraire des tissus normaux [29]. Des études menées sur de nombreuses lignées cellulaires tumorales montrèrent une forte activité glycolytique avec élévation de l'acide lactique associée à une forte activité de l'HK-I par rap-

Tableau II	
TABLEAU COMPARATIF DE L'ACTIVITÉ RELATIVE D'HK-I LIÉE DANS DES TISSUS SAINS ET TUMORAUX	
Origine des mitochondries	Activité spécifique de l'HK (mU/mg de protéine)
Hépatome AS-30D	1500-1800
Foie	3-8
Foie en régénération	11
Rein	40-166
Cerveau	38
Cœur	495-690
Intestin grêle	54
Muscle squelettique	16-106

D'après [27].

port aux cellules normales de référence (Tableau II) [27]. Dans les lignées tumorales, 50 % à 70 % de l'HK-I est lié aux mitochondries. Au cours du développement d'un cancer du foie, la glucokinase est majoritaire au début, progressivement remplacée par l'HK-II, modérée puis élevée à un stade avancé [30], et 50 % de cette HK est liée aux mitochondries [31]. Des fibroblastes d'embryon de poulet montrent, après transformation par le virus du sarcome de Rous, une majoration du transport du glucose, une élévation de la glycolyse et une augmentation de 70 % à 100 % de l'activité de l'HK avec migration de l'enzyme vers la mitochondrie.

Dans certaines tumeurs, notamment d'origine neuroectodermique et dans les hépatocarcinomes, une déviation du métabolisme énergétique vers la glycolyse est mise en évidence. Le métabolisme du pyruvate par les mitochondries est diminué en raison du nombre réduit de ces organites dans les tumeurs à croissance rapide, et/ou d'une utilisation préférentielle des substrats ADP et phosphates aux sites de transphosphorylation de la glycolyse. L'HK-I entraînerait une diminution de la respiration dans les cellules tumorales [32]. Ainsi, dans le cas particulier des hépatocarcinomes, on observe une variation de l'équilibre entre stockage et dégradation du glucose, en raison d'une baisse de l'activité de la glucokinase intervenant dans la glycogénèse et d'une augmentation quantitative de l'HK-II ainsi qu'un meilleur rendement de leur activité enzymatique.

L'augmentation de la proportion d'HK-I mitochondriale dans les tumeurs pourrait rendre compte, soit d'une meilleure affinité de l'HK pour les porines, soit de la synthèse d'une isoforme particulière d'HK. Fanciulli *et al.* ont démontré, après transfection de la lignée cellulaire NIH-3T3 avec l'ADNc de l'HK-I (provenant de tumeurs), une corrélation entre l'augmentation de l'activité de l'HK, le flux glycolytique et la croissance cellulaire [33]. Cela indique qu'une augmentation de la synthèse d'HK, avec une migration majoritaire de l'enzyme vers la mitochondrie, constitue un système d'adaptation aux nouvelles exigences de la cellule après transformation et est associée à une activité mitotique accrue.

Une élévation de la quantité d'HK ancrée pourrait être due à une augmentation du nombre de porines par cellule ou à une modification des porines mitochondriales ou extramitochondriales [20]. Dans un hépatocarcinome de rat, la multiplication par 3 du nombre de récepteurs poriniques [34] était accompagnée d'une multiplication par 100 de l'activité de l'HK. Par ailleurs, Arora *et al.* ont montré, en séparant les mitochondries des structures non mitochondriales à partir de tissus sains et tumoraux, qu'il existe dans les tumeurs une redistribution de l'HK-I liée des structures non mitochondriales (cytosol et réticulum endoplasmique) vers la mitochondrie [20].

La proportion d'HK ancrée pourrait aussi être liée à la synthèse d'une nouvelle isoenzyme. Cependant, des essais de liaison de l'HK provenant

de tissu cérébral ou de tumeur sur des mitochondries isolées ne montrent pas de différence d'affinité. Enfin, la répartition intracellulaire de l'HK peut être influencée par des stress cellulaires, telle l'anoxie liée à l'hypovascularisation fréquente dans les tumeurs. Il en résulterait ainsi une localisation mitochondriale, une augmentation de l'activité de l'HK et une déviation du métabolisme énergétique vers la glycolyse [35].

Dans une étude récente portant sur une série de 27 gliomes malins, l'activité totale d'HK-I détectée était globalement inférieure à celle du cerveau; en revanche, la proportion d'HK liée était constamment élevée, de 63 % en moyenne [36]. La lonidamine, un agent connu pour son activité antiglycolytique par inhibition de l'ancrage mitochondrial de l'HK-I fut utilisée pour traiter des souris porteuses de gliomes humains transplantés. Un effet antitumoral fut obtenu, dont l'amplitude dépendait du taux d'ancrage mitochondrial de l'HK-I [36]. Ainsi, il apparaît que, dans certains cancers comme les gliomes dont le métabolisme glycolytique permet une adaptation à des stress, telle l'hypoxie, bloquer la liaison mitochondriale de l'HK-I conduit à un effet antitumoral majeur. Une meilleure connaissance des modes de régulation des activités enzymatiques, appropriés aux besoins métaboliques de certains cancers, permet de concevoir des approches thérapeutiques spécifiques.

En conclusion, le contrôle de l'activité de l'HK-I est lié à un équilibre entre une forme libre et une forme liée à la mitochondrie. La liaison mitochondriale de l'HK apparaît fonctionnelle, transitoire et étroitement dépendante de l'état physiologique de la cellule, conférant à celle-ci de nouvelles propriétés enzymatiques, notamment en cas de stress. Cette liaison s'effectue par un mécanisme d'ancrage de la molécule sur la mitochondrie, par le biais d'une séquence N-terminale, mécanisme que l'on peut observer au niveau des protéines de choc thermique. La conséquence de la liaison mitochondriale de l'HK est une élévation très rapide de la glycolyse. Une proportion importante d'HK-I mitochondriale dans les tissus tumoraux pourrait expliquer la déviation,

connue depuis longtemps, du métabolisme énergétique vers la glycolyse. La meilleure connaissance des mécanismes qui contrôlent ce métabolisme ouvre un champ d'investigations thérapeutiques. L'utilisation d'antiglycolytiques ciblés sur la liaison de l'HK-I à la porine pourrait conduire à une application thérapeutique ■

Summary

Mitochondrial hexokinase, a key enzyme of cell bioenergetics: a possible target for anticancer therapy

The hexokinase (HK, ATP: D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1) catalyzes the glucose phosphorylation. The HK plays a critical role in glucose-dependent tissues. Of the four HK isoenzymes known, HK-IV or glucokinase is found in the liver and HK-I in the brain, the kidney and the malignant tumors. The HK-I is either free or bound by its N-terminal sequence to the external membrane of mitochondria *via* porines. HK-I mitochondria-binding increases its activity. HK-I is a dimer consisting of two subunits, homologous of the monomeric yeast HK. The HK-I has not been crystallized, however it is possible to deduce its structure from that of yeast HK. An hypothesis relative to the regulation of its activity *via* its porin-binding through conformational changes is presented here: this hypothesis allows to explain the HK-I kinetics. HK-I is the intermediate between oxidative processes and glycolysis: its mitochondrial anchorage allows the cells to adapt and optimize their energy metabolism. In tumor cells, glycolysis is active even in aerobic conditions and mitochondrial HK-I contributes to support a high metabolic rate even in hypoxia: the blockage of HK mitochondria-anchorage could be a basis of new therapeutic approaches in cancer.

Remerciements

Les auteurs remercient le Dr B. Dutrillaux (UMR 147 Cnrs) pour avoir inspiré cette étude, le Pr J. P. Henry (URA 1112 Cnrs), le Pr J. P. Leroux et le Dr C. Marsac (Inserm U. 75, CHU Necker, Paris) pour leurs discussions constructives dans l'élaboration de cette revue.