

Biochimica et Biophysica Acta, 452 (1976) 209–218
© Elsevier/North-Holland Biomedical Press

BBA 67944

NATURE DE L'INHIBITION DE CEPHALOSPORINASES PAR LA CARBENICILLINE

ROGER LABIA et CHRISTIAN FABRE

*Laboratoire de Bioorganique (ER 156 C.N.R.S.) C.E.R.C.O.A. 2 à 8, rue Henry Dunant
94320 Thiais (France)*

(Reçu le 2 mars, 1976)

Summary

Nature of the inhibition of some cephalosporinases by carbenicillin

This paper deals with the kinetic inhibition of six cephalosporinases (cephalosporin amido- β -lactamhydrolase, EC 3.5.2.8) by carbenicillin. In previous cases, the inhibition has appeared usually to be competitive and slowly reversible. This makes it possible to measure the two terms of the ratio $K_i = k_5/k_4$; k_4 and k_5 being respectively the velocity constants of formation and destruction of the enzyme-inhibitor complex. A program was prepared which made it possible to obtain these constants from only one experiment.

With ampicillin and cloxacillin, we verified that the reaction is faster, and that only K_i can be measured.

These facts suggest that special precautions should be taken in order to obtain significant values for the constants governing inhibition.

Résumé

Cet article concerne l'inhibition de six céphalosporinases (cephalosporin amido- β -lactamhydrolase, EC 3.5.2.8) par la carbénicilline. Dans les cas précédemment étudiés, l'inhibition apparaît en général de nature compétitive et lentement réversible. Ce qui permet de mesurer les deux termes du rapport $K_i = k_5/k_4$, k_4 et k_5 étant respectivement les constantes de vitesse de formation et de destruction du complexe enzyme-inhibiteur: un programme a été mis au point sur ordinateur, permettant de déterminer ces constantes élémentaires de vitesse en une seule mesure.

Pour l'ampicilline et le cloxacilline, on a vérifié que les phénomènes sont plus rapides et que seul le K_i est accessible.

Ces faits impliquent de prendre de précautions particulières pour obtenir des mesures significatives des constantes d'inhibition.

Introduction

Les β lactamases sont des enzymes monomères, de faible masse moléculaire, qui ne possèdent qu'un seul site actif [1]. Ces enzymes respectent la cinétique de Michaelis et Menten [2,3]. Toutefois, des travaux antérieurs [4,5] ont montré que la structure de la pénicilline ou de la céphalosporine utilisée comme substrat peut induire une modification conformationnelle de la structure quaternaire de l'enzyme qui peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'activité catalytique. Ce phénomène peut être suffisamment lent pour permettre son observation [6].

Les inhibiteurs compétitifs peuvent ne pas échapper à cette règle.

Récemment Furth [7] a constaté que l'inhibition d'une β lactamase de *Pseudomonas aeruginosa* (souche Dalglish) par la cloxacilline s'interprète difficilement.

Au cours d'études approfondies de plusieurs céphalosporinases (cephalosporin amido- β -lactamhydrolase, EC 3.5.2.8), nous avons constaté un comportement assez singulier au niveau de la cinétique d'inhibition par la carbénicilline. Dans ce cas particulier, les faits expérimentaux trouvent une explication simple.

Matériel et Méthodes

1. *Souches bactériennes et extraction des β lactamases.* Les souches bactériennes utilisées sont les *P. aeruginosa* 1A9 et 18MOM, producteurs respectivement de céphalosporinases type A et B décrites précédemment [8], *Ps. aeruginosa* RL39, producteur de la céphalosporinase C [9], *Proteus morganii* F20B, *Escherichia coli* RL90 SOL et *Klebsiella pneumoniae* II.17.

Ces souches produisent toutes une seule β lactamase de type céphalosporinase. Les enzymes ont été systématiquement purifiées par chromatographie d'affinité suivant notre technique décrite. Le taux de purification est, dans tous les cas, supérieur à 100.

2. *Antibiotiques.* Les antibiotiques utilisées sont les suivants: pénicilline G lot No. 666, pureté 98% des Laboratoires Rhone Poulenc Specia, carbénicilline lot No. 272, pureté 94%, ampicilline sodique F379, pureté 96%, cloxacilline lot F 392, pureté 93% des Laboratoires Beecham Sévigné.

3. *Constantes cinétiques (K_m et V).* Pour les enzymes qui suivent les cinétiques de Michaelis et Menten, les constantes K_m et V sont déterminées par microacidimétrie couplée à l'ordinateur [3], à l'aide d'un "mini" ordinateur Wang 600.

4. *Calcul des constantes d'inhibition.* Dans le cas d'une inhibition compétitive et réversible, la réaction suit, en général, le schéma michaelien. Le V reste inchangé, par contre le K_m mesuré augmente en fonction de la concentration en inhibiteur, soit K'_m , K_m , K_i (constante d'inhibition et $[I]$ (concentration en inhibiteur) sont alors liés par la relation:

$$K'_m = K_m(1 + [I]/K_i)$$

ce qui permet de déterminer K_i connaissant K'_m et $[I]$.

K'_m peut être mesuré de deux façons: par le programme de calcul classique

[3] sur "mini" ordinateur Wang 600, ou par la mesure des vitesses initiales de réaction à diverses concentrations de substrats, à l'aide d'une représentation graphique du type Lineweaver-Burk. Cette méthode n'apporte rien par rapport à la technique couplée à l'ordinateur. Les calculs sont plus fastidieux et les résultats moins précis.

Cependant, ces deux méthodes de mesure supposent que la cinétique reste michaelienne. Nous verrons que dans le cas contraire, il est nécessaire: (a) soit d'utiliser un calcul plus élaboré, réalisé sur un ordinateur de la série Wang 2200, présentant une capacité de calcul plus grande que celle du Wang 600 utilisé jusqu'à présent, (b) soit d'utiliser la méthode manuelle de mesure des vitesses en fonction de $[S]$ en prenant non pas la vitesse initiale mais le maximum de la vitesse, la réaction étant conduite à un faible degré d'avancement.

Résultats

Nous avons observé un comportement similaire chez cinq céphalosporinases sur les six étudiées. Nous avons choisi d'approfondir l'étude du comportement sur une seule enzyme: la céphalosporinase B.

Carbénicilline

Avec la céphalosporinase type B, en utilisant la pénicilline G comme substrat de référence et la carbénicilline comme inhibiteur, nous avons fait les constatations suivantes:

(a) Si l'on introduit dans la cellule de mesure, dans l'ordre: enzyme, pénicilline G immédiatement suivie par la carbénicilline, la cinétique observée correspond assez bien à une inhibition compétitive suivant le schéma michaelien. Toutefois, lorsque l'on compare des expériences conduites avec des concentra-

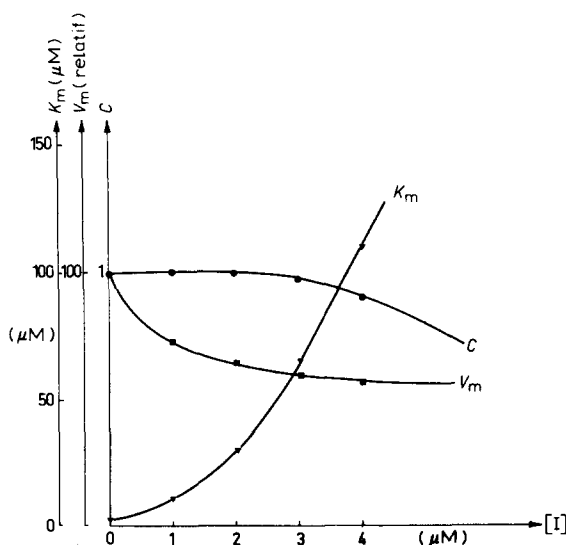


Fig. 1. Variation de k_m , V et corrélation (C) de la cinétique d'hydrolyse de la pénicilline G par la céphalosporinase type B, en présence de quantités croissantes de carbénicilline.

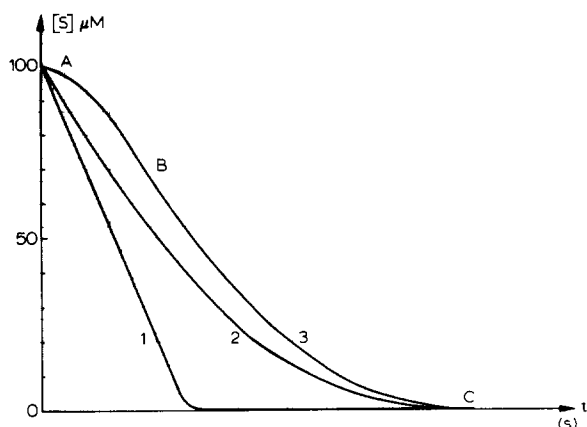


Fig. 2. Allure des cinétiques d'inhibition en fonction des conditions expérimentales utilisées 1: Réaction enzymatique en absence d'inhibiteur. 2: Conditions a. 3: Conditions b.

tions croissantes d'inhibiteur, on constate que (Fig. 1): (i) le coefficient de corrélation mesuré selon la façon classique [3] se dégrade; ce qui signifie que la cinétique n'est plus réellement michaelienne, (ii) la constante de Michaelis mesurée K'_m ne varie pas linéairement en fonction de la concentration en inhibiteur, comme devrait l'indiquer la formule: $K'_m = K_m(1 + [I]/K_i)$. (iii) la vitesse maximale mesurée diminue sensiblement.

(b) Si l'ordre d'introduction des réactifs est modifié: enzyme, carbénicilline, puis pénicilline G, l'allure de la cinétique est totalement différente. Sur Fig. 2, nous avons regroupé: (1) hydrolyse normale de la pénicilline G en l'absence de tout inhibiteur (réaction parfaitement michaelienne), (2) hydrolyse de la pénicilline G dans les conditions a, (3) hydrolyse de la pénicilline G dans les conditions b.

La courbe 3 peut se diviser en deux parties: dans la partie A—B, la vitesse V de la réaction initialement faible mais non nulle, augmente progressivement pour atteindre un maximum V_b inférieur à la vitesse maximale prévue. Si, dans la zone A—B, la concentration relative en substrat n'a pas trop varié, on peut constater que $\log(V_b - V)$ varie linéairement en fonction du temps t : $\log(V_b - V) = t/\theta$; θ est donc homogène à un temps. La paramètre θ mesuré est fonction des conditions expérimentales; on constate (Fig. 3) que $1/\theta$ dépend linéairement de $[I]$ et de $1/[S]$.

La partie BC se rapproche de la courbe 2 et les mesures réalisées sur cette portion de courbe posent les mêmes problèmes que ceux constatés avec la réaction, déroulée dans les conditions a (courbe 2).

Ces phénomènes se retrouvent également quand on utilise la ticarcilline comme inhibiteur.

Les céphalosporinases produites par les autres souches se comportent de façon similaire, à l'exception de la céphalosporinase de *K. pneumoniae* qui ne présente aucun état prestataire visible.

Détermination manuelle des K_i

Etant dans l'impossibilité de déterminer les K_i de la carbénicilline à l'ordina-

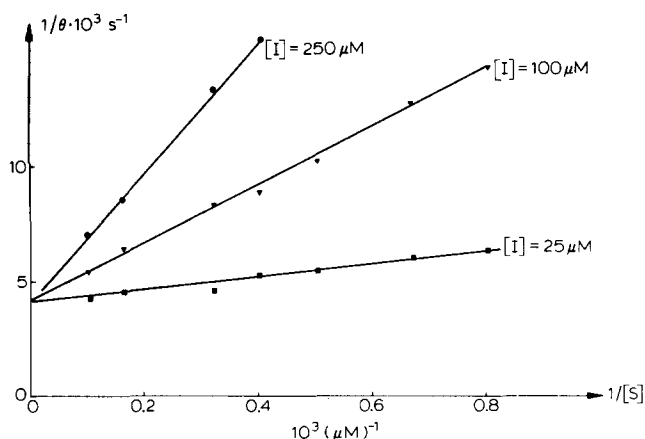


Fig. 3. Variation du paramètre $1/\theta$ en fonction de $1/s$ pour diverses concentrations d'inhibiteurs.

teur, nous avons envisagé l'utilisation d'une technique manuelle utilisant une représentation graphique du type Lineweaver-Burk. Toutefois, la vitesse initiale, correspondant à un état stationnaire, ne peut servir à la détermination du K_i .

Par contre, si dans le calcul manuel, on prend la précaution, pour chaque expérience, de laisser évoluer la réaction un temps assez long pour que la vitesse de réaction atteigne son maximum (soit V_b de la courbe 3), on obtient alors des mesures de K_i valables, c'est-à-dire indépendantes de la concentration d'inhibiteur utilisée (Tableau I).

Les mesures réalisées deviennent significatives pour la céphalosporinase B vis-à-vis de la carbénicilline et de la ticarcilline. On obtient respectivement des K_i de $1.19 \cdot 10^{-2}$ et $0.98 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}$, c'est-à-dire des valeurs presque identiques pour ces deux antibiotiques.

Ampicilline et cloxacilline

Contrairement aux antibiotiques précédents, l'ampicilline et la cloxacilline ont des comportements "normaux", c'est-à-dire: l'allure des cinétiques est la même quelque soit l'ordre d'addition des réactifs (conditions a et b), et dans l'une ou l'autre de ces conditions expérimentales, si l'on augmente progressivement la concentration en inhibiteur, les coefficients de corrélation restent

TABEAU I

Détermination du K_i de la carbénicilline pour la méthode des vitesses initiales, après stabilisation, pour diverses concentrations d'inhibiteur. Substrat pénicilline G 1 mM. Enzyme type B.

Concentration en inhibiteur (μM)	K_i (μM)
20	$1.2 \cdot 10^{-2}$
50	$1.3 \cdot 10^{-2}$
100	$1.08 \cdot 10^{-2}$

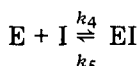
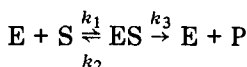
supérieurs à 0.98, ce qui signifie que la cinétique globale reste toujours michaelienne.

De plus, le calcul classique [3] réalisé à l'ordinateur montre une bonne linéarité entre K'_m et $[I]$. Nous avons trouvé respectivement les K_i suivant pour l'ampicilline et la cloxacilline: $0.2 \mu M$ et $4.5 \cdot 10^{-3} \mu M$ pour la céphalosporinase type B. Ces résultats diffèrent de ceux que nous avons déjà décrits en 1974 [8], surtout dans le cas de l'ampicilline. Dans l'état actuelle des choses, ces différences ne peuvent être imputées qu'à la pureté relative des antibiotiques utilisés (93% pour l'ampicilline et 87% pour la cloxacilline). Les impuretés résiduelles sont toujours susceptibles de contenir des substances perturbant les cinétiques enzymatiques.

Nous avons fait des constatations similaires sur les céphalosporinases produites par toutes les autres souches.

Discussion

L'inhibition compétitive réversible correspond aux équations:



Avec les notations classiques [10]: $[E]$ = concentration en enzyme libre, $[S]$ = concentration en substrat, $[I]$ = concentration en inhibiteur, $[ES]$ = concentration en complexe enzyme substrat, $[EI]$ = concentration en complexe enzyme inhibiteur, $[E]_0$ = concentration totale enzyme. On pose en outre:

$$V = k_3[E]_0$$

$$K_m = (k_2 + k_3)/k_1$$

$$K_i = k_5/k_4$$

On est amené à résoudre le système suivant:

$$\frac{1}{k_1} \frac{d[ES]}{dt} = [E] \cdot [S] - K_m[ES] \quad (1)$$

$$\frac{1}{k_4} \frac{d[EI]}{dt} = [E] \cdot [I] - K_i[EI] \quad (2)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] \quad (3)$$

Si les phénomènes sont rapides, on peut poser $1/k_1 = 0$ et $1/k_4 = 0$, ce qui conduit à la solution classique.

Dans notre cas, on peut supposer toujours $1/k_1 = 0$ puisqu'en absence d'inhibiteur la durée de l'établissement du régime stationnaire n'est pas décelable par nos techniques. Par contre, l'hypothèse $1/k_4 = 0$ n'est peut-être plus valable. Dans ce cas, la vitesse de réaction est toujours la solution du système:

$$v = \frac{-d(S)}{dt} = V[1 - [E]/[E]_0] \cdot [S]/([S] + K_m) \quad (4)$$

$$\frac{d[EI]}{dt} = k_4[I] \frac{K_m}{[S] + K_m} [[E]_0 - [EI]] - k_5 \cdot [EI] \quad (5)$$

L'intégration de ce système n'est en général pas possible. C'est pourquoi nous avons commencé par faire une hypothèse simplificatrice.

(1) Hypothèse simplificatrice

On convient de conduire la réaction à un faible degré d'avancement de façon à pouvoir considérer $[S]$ constant dans l'Eqn. 5. Dans ce cas, on peut aussi supposer $[S] \gg K_m$, ce qui est particulièrement facile à réaliser dans le cas de la céphalosporinase type B puisque le K_m de la pénicilline G est particulièrement bas ($0.63 \mu\text{M}$) les concentrations d'antibiotique pouvant varier entre 1 et 10 mM. Posant $[S] = [S]_0$, l'Eqn. 5 devient:

$$\frac{d[EI]}{dt} = k_4 \frac{[I]K_m}{[S]_0} [[E]_0 - [EI]] - k_5 \cdot [EI]$$

L'intégration conduit à:

$$[EI] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{K_i[S]_0}{K_m[I]}} - \left[[EI]_0 - \frac{[I][E]_0}{[I] + \frac{K_i[S]_0}{K_m}} \right] e - \left[k_4 \frac{[I]K_m}{[S]_0} + k_5 \right] t$$

Où, $[EI]_0$ est la concentration en complexe enzyme inhibiteur à l'instant $t = 0$ où, l'on introduit le substrat dans la cellule.

Si, à cet instant, la formation de $[EI]_0$ est à l'équilibre, un calcul simple permet de déterminer sa concentration:

$$[EI]_0 = [E]_0 \cdot [I]/([I] + K_i)$$

Si l'on ne fait pas d'hypothèse sur $[EI]_0$, l'expression de la vitesse est donc:

$$V = V \frac{K_i[S]_0}{K_i[S]_0 + K_m[I]} - \left(\frac{[EI]_0}{[E]_0} - \frac{K_m[I]}{K_m[I] + K_i[S]_0} \right) e - (k_5 + k_4 K_m [I]/[S]_0) t$$

Cette expression rend compte de la variation exponentielle de la vitesse observée au début de la réaction dans le cas b.

rapport $[I]/[S]$ permet de déterminer k_4 , k_5 et par suite $K_i = k_5/k_4$. Dans le Tableau II, nous avons regroupé les résultats obtenus dans le cas de l'enzyme type B, vis-à-vis de la carbénicilline et la ticarcilline.

On peut profiter de ces mesures pour vérifier que la formation du complexe EI, en l'absence de tout substrat est une réaction très rapide. En effet, la formation de EI suit la loi:

$$[EI] = \frac{[E]_0 [I]}{[I] + K_i} \cdot [1 - e^{-(k_4 I + k_5)t}]$$

Dans le cas de la carbénicilline et la céphalosporinase B, pour $[I] = 10 \mu\text{M}$, l'ex-

TABLEAU II

Détermination de k_4 , k_5 , K_i à partir du coefficient $1/\theta$, pour l'enzyme type B.

	Carbénicilline	Ticarcilline
k_4 ($l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$)	248 000	470 000
k_4 (s^{-1})	$4 \cdot 10^{-3}$	$5.8 \cdot 10^{-3}$
K_i ($mol \cdot l^{-1}$)	$1.6 \cdot 10^{-8}$	$1.06 \cdot 10^{-8}$

pression $A = k_{4I} + k_5$ vaut environ $1.7 s^{-1}$, c'est-à-dire, qu'au bout de 2 s l'équilibre est atteint à 3% près, et à 4 s à 10^{-3} près.

Les équations précédentes montrent ainsi toujours dans l'hypothèse où $[S]$ a peu varié, que la vitesse d'hydrolyse V atteint un maximum (au point B de la courbe 3 de Fig. 2):

$$V = V_b = V[S]_0 / ([S]_0 + K_m [I]/K_i)$$

Cette expression correspond à la vitesse de réaction classique dans l'hypothèse $[S] \gg K_m$. Ceci justifie, d'un point de vue théorique, que la détermination du K_i par la méthode dite "des vitesses initiales" donne des résultats valables, à condition d'attendre le maximum de la vitesse de réaction.

(2) Cas général

Connaissant V , K_m et à chaque instant $[S]$, $d[S]/dt$, il faut calculer k_4 et k_5 . Posant $[E]/[E]_0 = i$, l'équation suivante permet de déterminer à chaque instant i et par la suite di/dt

$$\frac{-d[S]}{dt} = V(1 - i) \cdot ([S]/[S] + K_m)$$

k_4 et k_5 sont liés par la relation:

$$\frac{1}{i} \cdot \frac{di}{dt} = k_5 + k_4 \frac{[I][S]}{[S] + K_m} \cdot \frac{1 - i}{i}$$

qui permet leur calcul au moyen d'un programme apparenté à une régression de type moindres carrés. Le calcul donne également un coefficient de corrélation qui permet d'apprécier la validité des déterminations.

Les résultats obtenus sont en excellent accord avec ceux obtenus graphiquement avec l'hypothèse simplificatrice (Tableau III).

Les cinétiques d'inhibition par la carbénicilline des céphalosporinases A, C et de l'enzyme produite par la souche RL90 SOL sont de même type. Nous les avons étudiées à l'ordinateur par le programme d'inhibition. Le Tableau IV montre les résultats obtenus. Les coefficients de corrélation correspondants peuvent être considérés comme excellents.

Dans le cas de la souche *P. morganii* F20B, le très petit K_i de la carbénicilline correspond à un grand k_4 , ce qui rend difficile et peu précise la mesure directe à l'ordinateur. Le calcul fait par l'intermédiaire de θ permet, cependant, de déterminer k_5 d'où $k_4 = k_5/K_i$.

La souche *K. pneumoniae* II.17 ne présente aucun état stationnaire déce-

TABLEAU III

Détermination de k_4 , k_5 , K_i à l'ordinateur pour l'enzyme type B. (1): Carbénicilline, (2): ticarcilline.

	(1)	(2)
k_4 ($l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$)	284 300	388 500
k_5 (s^{-1})	$2.77 \cdot 10^{-3}$	$3.67 \cdot 10^{-3}$
K_i ($mol \cdot l^{-1}$)	$1.01 \cdot 10^{-8}$	$0.95 \cdot 10^{-8}$
Corrélation	0.93	0.98

lable par nos techniques, alors que son K_i est pourtant voisin de celui des céphalosporinases A, B et C. La simulation des courbes à l'ordinateur et leur traitement ont montré que dans ces cas, si l'on multiplie k_4 et k_5 par un même facteur supérieur ou égal à 10, (conservant donc le même K_i), les vitesses sont suffisantes pour que l'état prestationnaire ne soit plus décelable.

Il semble que le phénomène de réversibilité lente n'ait encore jamais été observé dans le domaine des β -lactamases. Par contre, dans le cas de la monoamine oxydase, Fuller [11] a constaté que la réaction d'inhibiteurs avec cette enzyme est particulièrement lente (beaucoup plus que dans notre cas). Il en résulte que les études d'inhibition de la monoamine oxydase ont conduit à des résultats très variables selon les auteurs et les conditions expérimentales.

Il reste à discuter le cas de l'ampicilline et de la cloxacilline qui ne permettent pas d'observer le phénomène trouvé avec la carbénicilline ou la ticarcilline. Dans ces deux cas, en présence d'inhibiteur, l'établissement du régime stationnaire n'est pas décelable par nos techniques. Dans les équations précédentes, cela revient à faire $1/k_4 = 0$. Par contre, il est très probable qu'avec des techniques plus fines ("stopped flow", par exemple), on devrait pouvoir l'observer. Toutefois, il faut encore vérifier, à ce stade, si l'hypothèse $1/k_1 = 0$ reste toujours valable.

TABLEAU IV

Détermination des constantes k_4 ($l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$), k_5 (s^{-1}) et K_i (μM) à l'ordinateur (1) et K_i (μM) par la méthode de Lineweaver et Burk (2) pour les autres céphalosporinases étudiées (vis-à-vis de la carbénicilline).

	k_4	k_5	K_i (1)	K_i (2)
A	145 000	$4.6 \cdot 10^{-3}$	$3.15 \cdot 10^{-2}$	$2.2 \cdot 10^{-2}$
C	248 000	$4.5 \cdot 10^{-3}$	$1.64 \cdot 10^{-2}$	$1.6 \cdot 10^{-2}$
RL90 SOL	420 000	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$0.6 \cdot 10^{-2}$	$0.4 \cdot 10^{-2}$
<i>P. morganii</i> F20B	$5 \cdot 10^6$	$4.5 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$
<i>Klebsiella</i> II-17	pas d'état prestationnaire			$4.8 \cdot 10^{-2}$

Conclusion

Dans le cas de l'inhibition d'une enzyme par un inhibiteur compétitif qui réagit lentement, la mesure des constantes K_i s'avère particulièrement délicate. Les techniques habituelles ne sont plus valables et comme on peut le voir sur Fig. 1, le calcul classique montre une variation simultanée du K_m et V , ce qui est anormal. Toutefois, la méthode des vitesses initiales est encore utilisable, à condition d'attendre la stabilisation de la vitesse de réaction ($dV/dt = 0$) mais, dans ce cas, la concentration en substrat n'est plus définie avec précision.

Le calcul à l'ordinateur que nous proposons permet de résoudre ces difficultés. Connaissant les constantes cinétiques K_m et V du substrat de référence, une seule expérience d'inhibition permet de calculer K_i et les deux termes de son rapport k_4 et k_5 . Nous étudions actuellement d'autres céphalosporinases qui présentent le même phénomène.

Références

- 1 Citri, N. (1972) dans *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), Vol. 4, 3e edn., pp. 23—46, Academic Press, New York
- 2 Banfield, J.E. (1957) *Experientia* 13, 403—404
- 3 Labia, R., Andrillon, J. et Le Goffic, F. (1973) *FEBS Lett.* 33, 43—44
- 4 Koshland, D.E., Jr. et Neet, K.E. (1968) *Ann. Rev. Biochem.* 37, 359—410
- 5 Citri, N. (1973) dans *Advances in Enzymology* (Meinster, A., ed.), 37, pp. 397—648, Wiley-Interscience, New York
- 6 Samuni, A. et Citri, N. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62, 7—11
- 7 Furth, A.J. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 377, 431—443
- 8 Labia, R., Le Goffic, F., Faye, J.C. et Philippon, A. (1974) *Biochimie* 56, 1333—1337
- 9 Labia, R., Guionie, M. et Fabre, C. (1976) *Biochimie*, sous la presse
- 10 Mahler, H.R. et Cordes, E.H. (1976) *Biological Chemistry*, pp. 228—277
- 11 Fuller, R.W. (1972) *Adv. Biochem. Pharmacol.* 5, 339—354