

BBA 68568

## CINETIQUE DE L'INHIBITION DE BETA-LACTAMASES PAR L'ACIDE CLAVULANIQUE

ROGER LABIA et JEAN PEDUZZI

CNRS-CERCOA, 2 à 8, rue Henry Dunant, 94320 Thiais (France)

(Received March 1st, 1978)

### Summary

#### *Kinetics of beta-lactamase inhibition by clavulanic acid*

The mechanisms of action of 3 R-factors on  $\beta$ -lactamases (penicillin amido- $\beta$ -lactamhydrolase, EC 3.5.2.6) (TEM-1 pI = 5.4, TEM-2 pI = 5.6 and Pitton's type 2 pI = 7.7) have been kinetically analyzed for clavulanic acid inactivation. Clavulanic acid appears as a competitive and irreversible inhibitor ( $K_{cat}$  inhibitor) reacting in two steps: a, formation of a reversible enzyme · inhibitor complex (characterized by a  $K_i$ ); b, evolution of the reversible complex into a new derivative (covalent, stable and inactive) by monomolecular kinetics characterized by a  $k_6$  (or  $K_{cat}$ ) related to half-life.

The kinetic constants are: TEM-1:  $K_i = 0.8 \mu\text{M}$ ,  $k_6 = 0.027 \text{ s}^{-1}$ ; TEM-2:  $K_i = 0.7 \mu\text{M}$ ,  $k_6 = 0.03 \text{ s}^{-1}$ ; type 2:  $K_i = 0.6 \mu\text{M}$ ,  $k_6 = 0.046 \text{ s}^{-1}$ .

These results justify the 'progressive and irreversible' character of the inhibition generally described.

### Introduction

L'acide clavulanic (BRL 14151) est une nouvelle molécule naturelle de structure originale [1–3]. Divers travaux ont montré que cette molécule est un puissant inhibiteur de certaines  $\beta$ -lactamases, par contre elle ne présente, par elle-même, que de faibles propriétés antibiotiques. De ce fait, son utilisation en association avec d'autres  $\beta$ -lactamines montre souvent une synergie exceptionnelle.

L'impact de l'acide clavulanic semblant être essentiellement localisé au niveau de l'inhibition des  $\beta$ -lactamases (penicillin amido- $\beta$ -lactamhydrolase, EC 3.5.2.6), nous avons porté nos efforts au niveau du mécanisme de cette inhibition afin de voir si elle permet d'interpréter les faits bactériologiques. Pour cela, nous avons utilisé 3  $\beta$ -lactamases plasmidiques bien connues [4] et très fréquemment rencontrées au niveau des isolements réalisés aux services de bactériologie.

## Materiel et Methodes

1. *Souches bactériennes et  $\beta$ -lactamases.* *Escherichia coli* P111 produit la  $\beta$ -lactamases type 1 de Pitton encore nommée TEM-1 (pI = 5.4), *E. coli* RP4 produit de la  $\beta$ -lactamase TEM-2 (pI = 5.6) et *E. coli* P453 produit de la  $\beta$ -lactamase type 2 de Pitton (pI = 7.7); ces enzymes sont toutes plasmidiques et leur pI est apparu comme un critère fondamental au niveau de leur différenciation. Après purification, elles présentent respectivement des activités spécifiques de 860, 3000 et 150 U/mg. Ces différences semblent plutôt être dues à des 'turnover numbers' différents qu'à des puretés différentes. Ces enzymes présentent vis à vis de la pénicilline G des  $K_m$  respectifs de 21.7, 15 et 10.6  $\mu$ M, valeurs utilisées dans les calculs ultérieurs.

2. *Antibiotiques.* L'acide clavulanique (BRL 14151), sel de sodium, nous a été fourni par les Laboratoires Beecham-Sévigné et la pénicilline G par les Laboratoires Rhône-Poulenc Spécia.

3. *Constantes cinétiques.* Les cinétiques enzymatiques sont suivies par micro-acidimétrie couplée à l'ordinateur [5]. Les mesures sont réalisées à pH 7 dans une cellule de 10 ml thermostatée à 37°C. La burette du pH-stat (1 ml) est chargée de soude  $5 \cdot 10^{-3}$  M. Le programme de calcul permet entre autre de déterminer soit  $K_m$  et  $V_m$  dans le cas des cinétiques qui suivent Michaélis et Menten, soit une constante de temps pour les réactions exponentielles (mono-moléculaires). L'ordinateur utilisé est un Wang 2200 (16 K octets de mémoire RAM) qui permet une grande souplesse dans l'interprétation des données numériques.

4. *Cinétiques d'inhibition.* Les inhibiteurs usuels des  $\beta$ -lactamases conduisent à une inhibition souvent compétitive et réversible de l'activité catalytique [6]. L'action de l'acide clavulanique est très différente puisqu'elle présente un caractère irréversible. Ceci entraîne donc une cinétique d'inhibition très spéciale. Nous avons respecté le protocole suivant:

La  $\beta$ -lactamase (environ 0.3 U) est mise en présence d'un excès de substrat (10 ml d'une solution à 0.2 mg/ml de pénicilline G). En l'absence de tout inhibiteur, la vitesse de réaction reste pratiquement constante pendant la consommation de la majorité du volume de soude de la burette.

L'action de l'acide clavulanique est mise en évidence par introduction de celui-ci quelques secondes après le début de la réaction de l'enzyme sur la pénicilline G. On constate alors (Fig. 1) une rapide chute de l'activité enzymatique, puis son arrêt total, bien avant la fin de la consommation de tout le substrat. Dans ces conditions, la disparition de l'activité enzymatique suit une loi exponentielle que l'on peut caractériser par sa demi-vie.

## Résultats

### 1. *Cinétique de l'inhibition*

Fig. 1 montre, dans le cas de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 (pI = 5.4), la consommation de soude en fonction du temps. Ce paramètre est directement relié à la disparition du substrat. La courbe  $[I] = 0$  représente l'hydrolyse de la pénicilline G en l'absence de tout inhibiteur; dans ce cas, le volume de soude consommé après arrêt de la réaction (environ 1 ml) correspond à l'hydrolyse de la totalité

de la pénicilline mise en jeu. En présence d'acide clavulanique, on constate une disparition progressive, puis pratiquement totale, de l'activité enzymatique bien avant la disparition de toute la pénicilline présente dans la cellule. Des phénomènes analogues s'observent avec les deux autres  $\beta$ -lactamases.

Qualitativement, lorsque la quantité d'acide clavulanique mise en jeu augmente on constate que: a, la quantité totale de pénicilline hydrolysée diminue; b, le temps nécessaire pour obtenir l'arrêt de l'activité enzymatique est plus court.

Afin de simplifier l'interprétation des données expérimentales, on a pris en compte dans les calculs, uniquement les courbes correspondant au plus à l'hydrolyse de 10% de la pénicilline G. On peut alors supposer que cette concentration reste constante pendant toute la durée de l'expérience. Ceci implique d'utiliser une concentration d'acide clavulanique au moins égale à  $5 \mu\text{M}$ . Dans ces conditions, on vérifie que la concentration d'acide clavulanique ne varie pas de façon notable au cours de l'expérience. En effet, après l'inhibition totale de l'activité enzymatique, l'ajout d'une nouvelle quantité d'enzyme dans la cellule conduit à la répétition du phénomène.

On vérifie alors que la consommation de soude en fonction du temps suit une loi exponentielle, pouvant être caractérisée par une demi-vie ( $t_{1/2}$ ) mesurable avec une bonne précision.

Par contre, la mesure de la quantité totale de pénicilline hydrolysée (paramètre lié au précédent) est moins précise du fait d'une certaine erreur systématique liée au début de la réaction. Fig. 2 montre que, pour les 3 enzymes

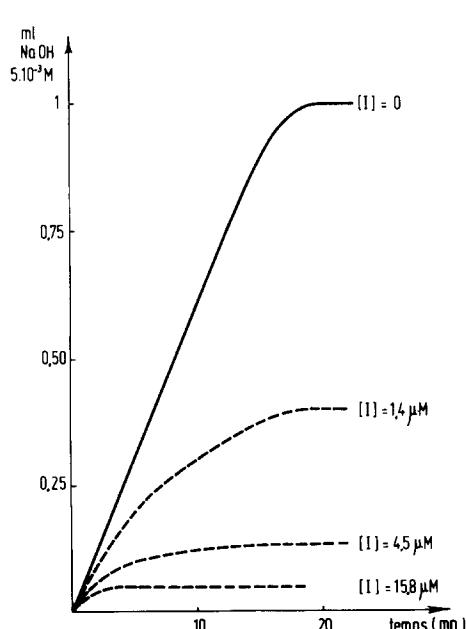


Fig. 1. Influence de quelques concentrations d'acide clavulanique sur l'hydrolyse de la pénicilline G par la  $\beta$ -lactamase TEM-1. Le volume de soude consommé est proportionnel à la quantité de substrat hydrolysé.

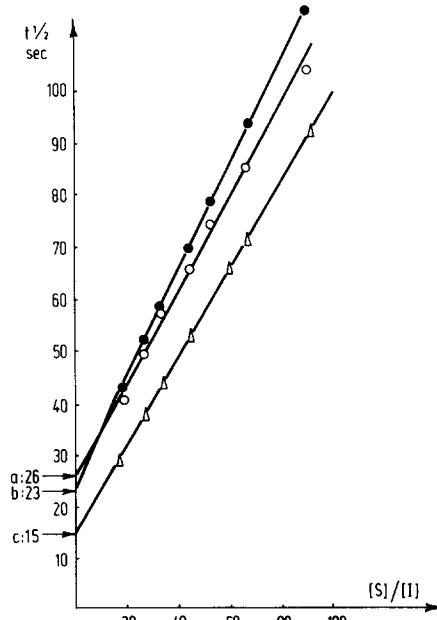


Fig. 2. Evolution des  $t_{1/2}$  en fonction du rapport  $[S]/[I]$  pour les 3  $\beta$ -lactamases étudiées: a, TEM-1, b, TEM-2, c, type 2.

étudiées, la  $t_{1/2}$  définie précédemment varie linéairement en fonction du rapport  $[S]/[I]$ . Dans les limites définies par les impératifs expérimentaux, on constate que  $t_{1/2}$  ne varie qu'en fonction de ce rapport, indépendamment des valeurs respectives de  $[S]$  et  $[I]$ , dans la mesure où la concentration en substrat est très supérieure au  $K_m$  correspondant. L'extrapolation des courbes à  $[S]/[I] = 0$  conduit aux valeurs limites suivantes: TEM-1  $t_{1/2} = 26$  s, TEM-2  $t_{1/2} = 23$  s et type 2  $t_{1/2} = 15$  s. Comme le justifie le calcul théorique développé dans la discussion, ces valeurs sont assimilables aux demi-vies de disparition de  $\beta$ -lactamase en l'absence de substrat et à des conditions saturantes du site actif par l'inhibiteur. Cet aspect serait difficilement accessible avec précision par des mesures directes, en raison de la rapidité du phénomène.

## 2. Nature de l'inhibition

L'allure des courbes (Fig. 1) montre clairement que l'action de l'acide clavulanique sur les  $\beta$ -lactamases diffère totalement de celle des inhibiteurs 'classiques', compétitifs réversibles comme par exemple la cloxacilline. On constate que l'hydrolyse du substrat est pratiquement totalement abolie, bien avant l'hydrolyse totale de celui-ci.

Par ailleurs aux concentrations utilisées, on constate que l'acide clavulanique n'est pas un substrat détectable des  $\beta$ -lactamases: aucune absorption de soude n'est mise en évidence au cours de la réaction de l'enzyme et de l'acide clavulanique seul. De plus, l'ajout d'une nouvelle quantité de  $\beta$ -lactamase après réaction antérieure, conduit à un phénomène d'inhibition reproductible. Ceci montre que la concentration d'acide clavulanique n'a pas varié de façon notable et que l'inactivation de l'enzyme par l'acide clavulanique est liée à une interaction directe de ces deux éléments et non pas à la libération dans le milieu réactionnel d'un produit de dégradation de l'acide clavulanique par la  $\beta$ -lactamase (métabolite) qui viendrait ensuite l'inactiver par un mécanisme non spécifique.

Par contre, si l'on utilise des concentrations très faibles en acide clavulanique, on constate que l'allure de l'inhibition devient très différente. A la concentration de  $0.5 \mu\text{M}$  en acide clavulanique ou moins, on constate dans un premier stade une inhibition rapide, mais partielle de l'activité enzymatique ( $t_{1/2} = 2$  min dans le cas du TEM-1) puis une seconde phase d'inhibition bien plus lente ( $t_{1/2} = 20$  min) qui finit par abolir totalement l'activité enzymatique. Dans cette seconde phase, on constate que: 1, l'acide clavulanique a alors totalement disparu; 2, ce second type d'inhibition peut être totalement aboli par addition, dans le milieu réactionnel, de cystéine à la concentration finale de  $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ . A ces concentrations, la cystéine donne aucune interaction avec l'acide clavulanique proprement dit, la  $\beta$ -lactamase ou le substrat (la pénicilline G). On voit donc que les produits d'hydrolyse de l'acide clavulanique peuvent conduire à une certaine inhibition lente et non spécifique des  $\beta$ -lactamases.

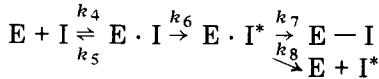
## Discussion

Nous proposons d'adapter un schéma réactionnel compatible avec les faits expérimentaux. Conformément aux propositions antérieures [7,8], l'inhibition compétitive et irréversible correspond aux équations:

hydrolyse du substrat:



inhibition de l'enzyme



Utilisant les notations classiques, on notera, en termes de concentration:  $[S]$ , substrat;  $[I]$ , inhibiteur;  $[E]_0$ , enzyme initialement mise en oeuvre;  $[E]$ , enzyme 'libre';  $[E \cdot S]$ , complexe enzyme · substrat;  $[E \cdot I]$ , complexe enzyme · inhibiteur dans la phase réversible et non covalente (l'inhibiteur est toujours sous la forme de l'acide clavulanique proprement dit);  $[E \cdot I^*]$ , complexe enzyme · inhibiteur 'activé' (précisé plus loin);  $[E - I]$ , complexe final, covalent, irréversible et inactif. On utilisera aussi:  $V = k_3 [E]_0$ ,  $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$  et  $K_i = (k_5 + k_6)/k_4$ .

Les faits expérimentaux permettent de négliger l'influence de  $k_8$  car l'acide clavulanique n'est pas hydrolysé de façon appréciable. On prendra donc  $k_8 = 0$  et on prendra dans la suite  $[I] = \text{constant}$ . De plus, on supposera, bien que cela ne soit pas strictement nécessaire, que  $k_6 < k_7$ , la phase 'd'activation' de l'inhibiteur est donc l'étape limitante [7,8]. On peut alors négliger la concentration en  $[E \cdot I^*]$  ce qui conduit au système le plus général:

$$(1/k_1)d[E \cdot S]/dt = [E][S] - K_m[E \cdot S]$$

$$(1/k_4)d[E \cdot I]/dt = [E][I] - K_i[E \cdot I]$$

$$d[E - I]/dt = k_6[E \cdot I]$$

$$V = -d[S]/dt = k_3[E \cdot S]$$

$$[E]_0 = [E] + [E \cdot S] + [E \cdot I] + [E - I]$$

Classiquement [6] l'hypothèse de l'état stationnaire conduit, après élimination de  $[E \cdot S]$  et  $[E \cdot I]$ :

$$d[E - I]/dt = (k_6/K_i)[E][I]$$

$$V = -d[S]/dt = (k_3/K_m)[E][S]$$

$$[E]_0 = [E](1 + [S]/K_m + [I]/K_i) + [E - I]$$

On voit que l'élimination de  $[E]$  conduit à un système d'équations différentielles en  $[S]$  et  $[E - I]$  en général non intégrable. Par contre, si l'on suppose  $[S]$  constant, correspondant à une faible proportion d'hydrolyse du substrat, l'intégration devient alors possible, ce qui permet d'obtenir pour  $[E - I]$  l'expression:

$$[E - I] = [E]_0(1 - \exp(-t/A))$$

où

$$A = \frac{1}{k_6} \left( 1 + \frac{K_i}{[I]} \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \right)$$

On en déduit alors l'expression de la vitesse d'hydrolyse du substrat (la pénicilline G en l'occurrence) en fonction du temps, soit, après arrangement des expressions:

$$V = V_m \frac{[S] \cdot K_i}{[I] k_6 K_m A} \exp(-t/A)$$

où  $A$  a la même signification que précédemment. La mesure de la demi-vie de la disparition de l'activité enzymatique est donc très accessible et en outre, dans l'hypothèse où  $[S] \gg K_m$ , l'expression de  $A$  se simplifie pour devenir:

$$A = \frac{1}{k_6} \left( 1 + \frac{[S]}{[I]} \frac{K_i}{K_m} \right)$$

L'expression de  $A$  est donc une ligne droite qui coupe l'axe  $[S]/[I]$  au point  $-K_m/K_i$  et l'axe des ordonnées à un point correspondant à la demi-vie de l'enzyme dans des conditions saturantes en inhibiteur ( $\log_2/k_6$  ou  $1/k_6$  selon que le graphique représente le  $t_{1/2}$  où la constante de temps). Fig. 2 montre la variation du  $t_{1/2}$ .

Les deux paramètres  $k_6$  et  $K_i$  sont donc aisément accessibles. Vis à vis 3  $\beta$ -lactamases, les valeurs obtenues, à l'aide d'une régression linéaire par moindres carrés, sont:

TEM-1:  $K_i = 0.8 \mu\text{M}$ ;  $k_6 = 0.027 \text{ S}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 26 \text{ S}$ )

TEM-2:  $K_i = 0.7 \mu\text{M}$ ;  $k_6 = 0.03 \text{ S}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 23 \text{ S}$ )

type-2:  $K_i = 0.6 \mu\text{M}$ ;  $k_6 = 0.046 \text{ S}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 15 \text{ S}$ )

Le calcul montre que dans la Fig. 2, l'ordonnée à l'origine ( $t_{1/2}$ ) correspond à la demi-vie de l'enzyme en l'absence de substrat et en quantités saturantes d'acide clavulanique. En effet, on peut montrer que les deux approches mathématiques sont totalement compatibles (calcul avec ou sans substrat). En présence d'acide clavulanique, seul, l'expression de la disparition de l'enzyme suit la loi:

$$[E] = \frac{[E]_0 \exp(-t/B)}{1 + [I]/K_i}$$

où

$$B = \frac{1}{k_6} (1 + K_i/[I])$$

$B$  est donc l'expression de  $A$  avec  $[S] = 0$ .

On remarquera que si  $t = 0$   $[E] \neq [E]_0$ . En effet, l'enzyme est alors partagée sous forme libre et de complexe réversible (échange supposé très rapide).

On retrouve ici les équations de Kitz et Wilson [9] définies dès 1962, dans un domaine différent.

Examinons deux cas limites:

a,  $[I] \gg K_i$ ; l'enzyme est alors en présence de quantités saturantes d'acide clavulanique  $[E]$  devient:

$$[E] = [E]_0 (K_i/[I]) \exp(-k_6 t)$$

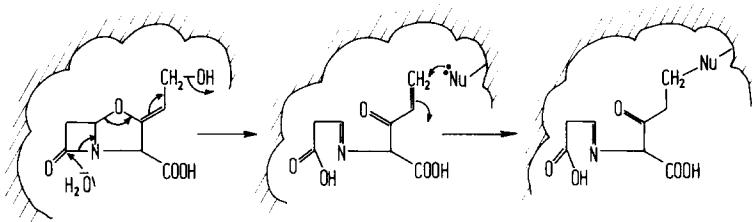


Fig. 3. Mécanisme proposé pour l'inactivation des  $\beta$ -lactamases par l'acide clavulanique.

la demi-vie de l'enzyme est donc  $\log_2/k_6$ . Dans le cas précis des  $\beta$ -lactamases étudiées on voit que la mesure directe de ce paramètre n'aurait été possible qu'avec des techniques de cinétique rapide.

b,  $[I] \ll K_i$ ; l'expression de la disparition de E devient:

$$[E] = [E]_0 \exp(-tk_6[I]/K_i)$$

La disparition de [E] est alors une réaction d'ordre un par rapport à [I], (dans le cas précédent elle était d'ordre zéro) et la cinétique est analogue à celle d'une réaction bimoléculaire, de constante de vitesse  $k_6/K_i$ . Ce rapport est lié à la concentration d'acide clavulanique nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de la  $\beta$ -lactamase en un temps donné:  $I_{50}$  [2] cette donnée est incomplète.

Ces études cinétiques justifient un mécanisme en trois étapes, dont deux seulement sont quantifiables:

1, Formation rapide et réversible d'un complexe enzyme · inhibiteur, cet aspect est caractérisé par une constante d'équilibre  $K_i$ ;

2, Hydrolyse lente, ou progressive, de l'acide clavulanique en dérivé contenant une cétone éthylénique (Fig. 3), cette phase est caractérisée par le paramètre  $k_6$ .

3, Alkylation immédiate au site actif de la  $\beta$ -lactamase selon une réaction de type Michael. La cinétique de cette réaction n'est pas mesurable par nos techniques.

## Conclusion

L'acide clavulanique est un inhibiteur compétitif et irréversible des  $\beta$ -lactamases. Il rentre donc dans la catégorie des inhibiteurs ' $K_{cat}$ ' [7,8] décrits antérieurement dans d'autres domaines. Cet aspect le distingue donc considérablement des inhibiteurs 'classiques' des  $\beta$ -lactamases, comme la cloxacilline ou ses analogues. Le protocole expérimental proposé, ainsi que sa justification théorique permet d'accéder aux deux paramètres  $K_i$  et  $k_6$  (assimilable au ' $K_{cat}$ ' de cette inhibition, contrairement aux autres méthodes ( $I_{50}$  en particulier) qui ne permettent, au mieux, d'obtenir qu'un terme lié à leur rapport.

D'un autre côté, comme les enzymes étudiées correspondent à des entités à reproduction rapide: bactéries dont la duplication intervient pour des temps de l'ordre de dix à vingt minutes, on voit que les inhibiteurs ' $K_{cat}$ ' intéressant à ce niveau doivent faire intervenir des  $t_{1/2}$  courts par rapport à cette durée (de l'ordre de la minute). Cet aspect devra être impérativement pris en compte vis à vis des germes résistant à cet inhibiteur.

Des études complémentaires, en cours, utilisant des dérivés radioactifs devraient permettre de préciser définitivement le mécanisme d'action de l'acide clavulanique.

### Résumé

La cinétique d'action de l'acide clavulanique a été précisée sur 3  $\beta$ -lactamases (penicillin-amido- $\beta$ -lactamhydrolase, EC 3.5.2.6) plasmidiques: TEM-1 (pI = 5.4), TEM-2 (pI = 5.6) et type 2 de Pitton (pI = 7.7). L'acide clavulanique apparaît comme inhibiteur compétitif et irréversible de ces enzymes (inhibiteur  $K_{cat}$ ; cette action bien particulière permet de distinguer deux phases essentielles: a: formation réversible et rapide d'un complexe enzyme · inhibiteur de type Michaélien. Cette phase est caractérisée par un  $K_i$ ; b: évolution, selon une cinétique monomoléculaire, de ce complexe en dérivé covalent, dénué d'activité enzymatique (caractérisé par une constante de vitesse  $k_6$  ou  $K_{cat}$ , inversement proportionnelle à une demi-vie). Les constantes obtenues sont: TEM-1:  $K_i = 0.8 \mu M$ ,  $k_6 = 0.027 s^{-1}$ ; TEM-2:  $K_i = 0.7 \mu M$ ,  $k_6 = 0.03 s^{-1}$ ; type 2:  $K_i = 0.6 \mu M$ ,  $k_6 = 0.046 s^{-1}$ . Ces faits permettent de justifier le caractère 'progressif et irréversible' de l'inhibition généralement observée.

Additif en épreuve (reçu le 2 août, 1978)

Recentement, Knowles et al. ont publié deux articles relatifs au mode d'action de l'acide clavulanique [10,11].

### Références

- 1 Howarth, T.T., Brown, A.G. et King, T.J. (1976) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 266-267
- 2 Reading, C. et Cole, M. (1977) *Antimicrob. Agents Chemother.* 11, 852-857
- 3 Brown, A.G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J.D. et Reading, C. (1976) *J. Antibiot.* 29, 668-669
- 4 Labia, R., Bartélémy, M., Fabre, C., Guionie, M. et Péduzzi, J. (1978) dans *Beta-lactamases* (Hamilton-Miller, J.M.T., ed.), Academic Press, New York, sous la presse
- 5 Labia, R., Andrillon, J. et Le Goffic, F. (1973) *FEBS Lett.* 33, 42-44
- 6 Labia, R. et Fabre, C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 452, 209-218
- 7 Rando, R.R. (1974) *Science* 185, 320-324
- 8 Rando, R.R. (1975) *Biochem. Pharmacol.* 24, 1153-1160
- 9 Kitz, R. et Wilson, B. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 3245-3249
- 10 Fisher, J., Charnas, R.L. et Knowles, J.R. (1978) *Biochemistry* 17, 2180-2184
- 11 Charnas, R.L., Fisher, J. et Knowles, J.R. (1978) *Biochemistry* 17, 2185-2189