

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PROFILAGE PROTÉOMIQUE ET MÉTABOLOMIQUE PAR
LC-MS/MS POUR DÉCOUVRIR DES CHANGEMENTS INDUITS
PAR LA FORMATION DE MÉTABOLITES RÉACTIFS *IN VIVO*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
GHAZALEH KAZEMDOKHTMOGHADDAM

MAI 2018

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier tous ceux qui ont participé à l'avancement de mes travaux, notamment ma directrice, la professeure Lekha Sleno, pour ses directives et ses conseils avisés.

Je remercie également les professeurs Isabelle Marcotte et Mathieu Frenette, qui ont fait partie de mon comité de thèse.

Mes amis, le Dr Makan Golizeh, Leanne Ohlund, Biao Ji, Maxime Sansoucy, Timon Geib, Amal Guesmi et Vivaldy Prinville, avec lesquels j'ai eu plusieurs discussions très enrichissantes concernant l'écriture de mon mémoire.

Je remercie tout spécialement mon mari, pour son soutien sans faille.

Sans oublier ma propre famille, pour leurs encouragements et leur patience.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	ix
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION	1
1.1 Les métabolites réactifs et le métabolisme xénobiotique (cytochrome P450)..	1
1.1.1 Formation d'adduits et protéines cibles	6
1.2 L'acétaminophène	7
1.2.1 Histoire et usages.....	7
1.2.2 Les protéines cibles de l'acétaminophène.....	11
1.3 L'analyse LC-MS/MS	12
1.3.1 Instrumentation et applications	12
1.3.2 L'analyse par scan de l'ion produit et MRM	23
1.3.3 L'analyse de peptides et de métabolites	23
1.4 Les études <i>omiques</i>	25
1.4.1 La protéomique.....	27
1.4.2 La métabolomique	32
CHAPITRE II.....	37
ARTICLE SCIENTIFIQUE: "IDENTIFICATION OF <i>IN VIVO</i> ACETAMINOPHEN COVALENT BINDING PROTEIN TARGETS IN RAT AND MOUSE LIVER USING 2D-LC-HRMS/MS"	37
2.3 ABSTRACT	39
2.3 Introduction.....	39
2.3 Methods	41

2.3.1	Materials and reagents	41
2.3.2	<i>In vivo</i> experiments.....	41
2.3.3	Sample preparation	42
2.3.4	Strong cation exchange (SCX) chromatography.....	43
2.3.5	LC-HRMS/MS analysis	43
2.3.6	Data processing	44
2.4	Results and discussion.....	45
2.4.1	Covalent binding of APAP reactive metabolites to liver proteins	45
2.4.2	Target proteins identified using a 1D-LC-MS/MS approach with an extended LC gradient	55
2.5	Conclusions.....	59
CHAPITRE III.....		61
ARTICLE SCIENTIFIQUE: “PROFILING ACETAMINOPHEN HEPATOTOXICITY USING LC-MS/MS BASED METABOLOMICS IN RAT MODEL”		61
3.1	ABSTRACT	63
3.2	Introduction.....	64
3.3	Methods	66
3.3.1	Materials	66
3.3.2	Animal study	66
3.3.3	Sample preparation	66
3.4	Results and discussion.....	69
3.4.1	Untargeted metabolomics	69
3.4.2	MS/MS optimization for targeted metabolomics assay.....	77
3.4.3	Time-course and dose-response of APAP metabolites.....	81
3.5	Conclusions.....	84
CHAPITRE IV		86
PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS.....		86

4.1 Perspectives et conclusions.....	86
4.1.1 Optimisations de techniques analytiques.....	87
4.1.2 Autres études futures	88
4.2 Conclusions.....	90
RÉFÉRENCES	122
APPENDIX A	96
APPENDIX B.....	98
APPENDIX C.....	119

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Cycle catalytique du cytochrome P450.....	3
1.2 Métabolisme modifié des médicaments et toxicité	4
1.3 Réaction de Michael du glutathion avec l'acroléine.....	5
1.4 Schéma du métabolisme de l'acétaminophène	9
1.5 Voies de production du NAPQI	10
1.6 Stress oxydatif de la mitochondrie durant l'hépatotoxicité par l'APAP.....	11
1.7 Diagramme d'une colonne d'échange de cations	15
1.8 Schéma d'une particule de type noyau-coquille	16
1.9 Schéma de l'ionisation par électrospray.....	18
1.10 La dissociation induite par collision (CID) dans un MS/MS de type triple quadripôle	19
1.11 Analyseur temps de vol (TOF).....	21
1.12 Structure chimique de la phase stationnaire HLB Oasis	25
1.13 Diagramme de technologies <i>omiques</i> incluant la génomique, la protéomique et la métabolomique.....	27
1.14 Étapes typiques pour une expérience ascendante protéomique en MS.....	30
1.15 PCA simulée effectuée sur deux données dimensionnelles observées sur les axes x et y.....	36
2.1 LC-UV chromatogram from SCX fractionation of a representative mouse liver protein digest (A) and total ion chromatogram from LC-MS/MS	

analysis of fraction 7 (B) showing peptide elution profile.....	47
2.2 Extracted ion chromatogram (A), high-resolution MS (B) and MS/MS spectra (C) from the APAP-modified peptide in rat (CLGELICTLNAAK) from triosephosphate isomerase, an identified <i>in vivo</i> APAP target protein	51
2.3 Representative total ion chromatogram from an extended LC gradient (3 h) method used for the LC-MS analysis of a trypsin-digested mouse liver homogenate.....	56
3.1 Venn diagrams of filtered lists of features between different modes (same column) and also between different columns (same mode)	71
3.2 Representative APAP dose-related features (MarkerView software)	72
3.3 PCA plots of features found to be related to toxicity (A) and decrease with dose (B) from HSS T3 and PFP columns in positive and negative modes.....	76
3.4 <i>N</i> -(4-hydroxyphenyl)-4-pentynamide structure	77
3.5 Structures and metabolic pathways of APAP and known APAP metabolites.....	79
3.6 Time-course of generation of APAP and its metabolites in rat plasma from MRM data. Analyte: IS peak area ratios are plotted against time following dosing. Error bars are for n=3 animals in 75, 150 and 300 mg/kg animals and n=4 for 600 mg/kg dose.....	82
4.1 Schéma de la séparation, fragmentation et analyse des peptides/métabolites par spectrométrie de masse utilisant le mode d'acquisition dépendante de données (IDA).....	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Exemples d'électrophiles durs et mous ainsi que de nucléophiles.....	5
1.2 Comparaison entre le piège ionique linéaire et le temps de vol.....	22
1.3 Protéases utilisées en protéomique ascendante.....	32
1.4 Étude sur les analyses métaboliques ciblées vs non-ciblées	34
2.1 Rat and mouse liver acetaminophen <i>in vivo</i> protein targets identified by 2D-LC-MS/MS	48
2.2 Rat and mouse liver acetaminophen <i>in vivo</i> protein targets identified using extended LC gradient (without ¹ and with pre-fractionation ² prior to LC- MS/MS analysis).....	58
3.1 Number of features (<i>m/z</i> , RT pairs) from different data filtering using MarkerView (MV) and MultiQuant (MQ).....	70
3.2 Lists of filtered features using MarkerView (MV) and MultiQuant (MQ) software (4 data sets: T3 HSS and PFP columns tested in positive and negative ion mode).....	73
3.3 Optimized MRM parameters of known APAP-metabolites, APAP and <i>N</i> - (4-Hydroxyphenyl)-4-pentynamide.....	80

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ALF	acute liver failure
ALT	alanine aminotransferase
APAP	tampon de bicarbonate d'ammonium
APCI	ionization chimique à pression atmosphérique (atmospheric-pressure chemical ionization)
API	ionization à pression atmosphérique
AST	aspartate aminotransférase
CE	énergie de collision (collision energy)
CID	dissociation induite par collision (collision-induced dissociation)
COX	cyclooxygénase
CPSM	carbamoyl-phosphate synthase
CXCR3	C-X-C chemokine receptor
CXP	Potentiel de collision de sortie (collision exit potential)
CYP	cytochrome P450
CYS	cysteine
DBS	soustraction de bruit de fond dynamique (dynamic background subtraction)
2DE	électrophorèse bidimensionnelle
DNA	acide désoxyribonucléique (deoxyribonucleic acid)
DP	declustering potential
DTT	dithiothréitol
ECD	dissociation par capture d'électrons
EI	ionisation par impact électronique (electron ionization)

EIC	chromatogrammes d'ions extraits (extracted ion chromatogram)
ESI	ionisation par électro-nébulisation (electrospray ionisation)
ETD	dissociation par transfert d'électron
FAB	bombardement à l'atome rapide
FABPL	fatty acid-binding protein
FDR	taux de fausses découvertes (false discovery rate)
FIBG	fibrinogen gamma chain
FT-ICR	résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (Fourier transform ion cyclotron resonance)
GC-MS	chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (gas chromatography-mass spectrometry)
GLUC	glucuronide
GS1	gaz de nébulisateur
GS2	gaz de séchage
GSH	glutathion (réduit)
HDX-MS	spectrométrie de masse échange d'hydrogène/deutérium
HILIC	chromatographie à interaction hydrophile (hydrophilic interaction chromatography)
HIUH	5-hydroxyisourate hydrolase
HLB	balance hydrophile/lipophile
HPLC	chromatographie liquide à haute performance (high-performance liquid chromatography)
HPXR	human pregnane xenobiotic receptor
HRMS	spectrométrie de masse en haute résolution (high resolution mass spectrometry)
HS90B	heat shock protein HSP
IAM	iodoacétamide

IDA	acquisition dynamique indépendante (independent dynamic acquisition)
IEX	chromatographie par échange d'ions
IP	intrapéritonéale
IS	standard interne (internal standard)
KE	énergie cinétique
LC	chromatographie liquide (liquid chromatography)
LC-ESI-MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse par électro-nébulisation (liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry)
LDHA	L-lactate dehydrogenase
LIT	piège à ions linéaire (linear ion trap)
MALDI	ionisation par désorption laser assistée par matrice
MRM	suivi de réactions multiples (multiple reaction monitoring)
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
MS	spectrométrie de masse (mass spectrometry)
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem (tandem mass spectrometry)
MTP	perméabilité mitochondriale
NAC	<i>N</i> -acétylcystéine
NAPQI	<i>N</i> -acétyl- <i>p</i> -benzoquinone imine
NMR	résonance magnétique nucléaire (nuclear magnetic resonance)
NSAID	anti-inflammatoire non stéroïdien
PAPS	3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate
PCA	analyse en composantes principales
PTM	modification post-traductionnel (post translational modification)
PXR	pregnane X receptor

Q	quadripôle
QIT	quadripôle piègeur d'ions
QqLIT	triple quadripôles piège à ions linéaire
QqQ	triple quadripôles
QqTOF	spectre de masse hybride quadripôles associé à un temps de vol (hybrid quadrupole time of flight mass spectrometer)
QTRAP	quadrupole-linear ion trap
RNS	espèces réactives oxygénées et azotées
ROS	espèces réactives oxygénées
RPLC	chromatographie en phase inverse (reversed-phase liquid chromatography)
rpm	rotations par minute (revolutions per minute)
SARDH	sarcosine dehydrogenase
SCN8A	sodium channel protein type 8 subunit alpha
SCX	échange de cations fort (strong cation exchange)
SDHA	succinate dehydrogenase
SPE	extraction en phase solide (solid phase extraction)
SRM	suivi de réaction sélectionnée (selected reaction monitoring)
SULF	sulfate
SULT	sulfotransférases
TFA	acide trifluoroacétique
TIC	chromatogramme de courant ionique total (total ion chromatogram)
TOF	temps de vol (time-of-flight)
TPDB	base de données sur les protéines cibles de métabolites réactifs
UHPLC-MS	chromatographie liquide à ultra performance couplée à la spectrométrie de masse (ultra-high-performance liquid chromatography mass spectrometry)

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

Å	angstrom
°C	degrés Celsius
Micro (μ)	10^{-6}
Da	Dalton
g	gramme
h	heure
kilo (k)	10^3
L	litre
M	moles/litres
milli (m)	10^{-3}
m/z	rapport masse (m) sur charge (z)
min	minutes
mol	mole
ppm	parties par millions
psi	unité de pression (pound per square inch)
V	Volt
%	pourcentage

RÉSUMÉ

L'acétaminophène (APAP) est la principale cause d'insuffisance hépatique aiguë en Amérique du Nord, liée à la formation de son métabolite réactif, *N*-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI). Cette étude est divisée en deux sections principales, comprenant une étude protéomique sur les protéines du foie de rat et de souris traités avec l'APAP (chapitre 2) et une étude métabolomique dans le plasma de rat en utilisant la chromatographie en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (RPLC-HR-MS/MS) (chapitre 3).

Lors d'études protéomiques, des protéines de foies de rat et de souris ont été digérées puis séparées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par échange de cations forts, et ensuite par chromatographie en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse en tandem à haute résolution. Les résultats obtenus montrent que plusieurs protéines ont été modifiées par le métabolite réactif de l'acétaminophène, le NAPQI. Fait intéressant, deux protéines modifiées ont été trouvées dans les deux espèces de rongeurs, à savoir l'anhydrase carbonique 3 et la triose-phosphate isomérase. La plupart des protéines identifiées ont un effet protecteur contre le stress oxydatif sur les cellules et sont impliquées dans des voies biologiques qui réduisent la mort cellulaire induite par des espèces réactives. Dans cette étude, une méthode de chromatographie en phase inverse extra longue, sans aucune étape de fractionnement, a également été effectuée.

Pour mieux caractériser les perturbations métaboliques qui se produisent après le dosage avec l'acétaminophène, une approche d'analyse métabolomique non-ciblée a été employée pour analyser des échantillons de plasma de rat. Ces listes filtrées, provenant d'études métabolomiques non-ciblées, ont été regroupées par «tendances de dose», y compris «augmenter ou diminuer avec la dose» ou «liées à la toxicité» si un pic n'a été significativement élevé que pour le taux de dosage le plus élevé d'acétaminophène (qui montrait des signes cliniques de toxicité). L'analyse en composantes principales a ensuite été utilisée pour visualiser le contrôle et les groupes dosés en utilisant uniquement les fonctions filtrées. Une fois que nous avons eu une liste de métabolites intéressants à partir de l'analyse métabolomique non-ciblée, une analyse ciblée par observation de réactions multiples (MRM) a été optimisée, en incluant aussi plusieurs métabolites d'APAP connus. Cette méthode a été appliquée sur des échantillons de plasma de rats à plusieurs doses et plusieurs temps après le dosage. Les graphiques montrent que les métabolites d'acétaminophène corrélaient bien avec le dosage et le temps. La combinaison de ces deux études (métabolomique et protéomique) peut potentiellement améliorer les connaissances actuelles des mécanismes responsables des lésions hépatiques induites par l'acétaminophène.

Mots-clés: Spectrométrie de masse, bio-analyse, acétaminophène, protéomique, cibles potentielles, métabolomique, métabolites réactifs, rat et souris

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les métabolites réactifs et le métabolisme xénobiotique (cytochrome P450)

Le foie est l'organe principalement responsable du métabolisme des médicaments, bien que d'autres processus s'effectuent dans le plasma, les poumons et la paroi intestinale (Dixon, *et al.* 2014). Puisque le corps peut être exposé à plusieurs xénobiotiques, un mécanisme de détoxification efficace est requis; celui-ci est effectué par le métabolisme, qui est la conversion enzymatique d'un composé chimique en un autre. Il convertit les médicaments, par exemple, en composés plus polaires afin qu'ils soient plus solubles dans l'eau; cette étape permet l'excrétion du médicament dans les fluides corporels tels que l'urine et la bile (Kirchmair, *et al.* 2015). Les hépatocytes ont la majorité des enzymes nécessaires au métabolisme des médicaments (ou xénobiotiques), qui est lui-même divisé en deux phases de réactions biochimiques: les phases I et II. Certains médicaments ne passent que par la phase I et d'autres, que par la phase II; cependant, ils passent souvent par les deux phases de façon séquentielle (Xu, *et al.* 2005).

Dans la phase I, l'oxydation est le processus biochimique le plus commun, mais il peut tout de même y avoir une réduction, déalkylation ou une hydrolyse. Dans la phase II, on y retrouve de la conjugaison, où il y a attachement d'un groupe polaire sur le médicament tel le glucuronide ou un sulfate (Gibson and Skett 2001). La conjugaison le rend en général plus polaire, favorisant ainsi son élimination par les

fluides corporels et diminuant son activité pharmacologique. Plusieurs facteurs peuvent affecter le métabolisme par le foie. La vieillesse diminue le nombre d'hépatocytes et les activités enzymatiques, et certaines défaillances telles que l'insuffisance cardiaque ou le choc cardiogénique réduisent le flux sanguin hépatique. Il peut également être altéré par la déficience génétique d'une enzyme spécifique. S'additionnant à l'utilisation de médicaments, les facteurs alimentaires et environnementaux influencent la fonction métabolique du foie (La Du, *et al.* 1971; Walgren, *et al.* 2005). La réaction métabolique de médicaments la plus étudiée à ce jour est celle d'oxydation par les cytochromes P450 (CYP). Ces cytochromes représentent un groupe de protéines membranaires liant deux atomes d'oxygène en libérant une molécule d'eau afin de former un métabolite plus polaire que le substrat de départ. Ils jouent un rôle majeur dans la phase I du métabolisme pour beaucoup de composants chimiques et médicaments et sont localisés dans le réticulum endoplasmique ou dans la membrane interne mitochondriale des hépatocytes. Environ 60 isoformes de CYPs ont été identifiées chez l'humain (Anzenbacher and Anzenbacherová 2001). Elles sont regroupées en familles, tout dépendant de leur homologie génétique. Environ 15 isoformes des CYPs entrent dans le métabolisme de plusieurs xénobiotiques. Pour le métabolisme de l'acétaminophène, les isoformes importantes sont CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4 et CYP2D6. Contrairement à la plupart des sous-familles de P450, la sous-famille CYP2E est composée d'une seule isoforme, la CYP2E1, qui est exprimée dans plusieurs tissus hépatiques et extra-hépatiques. L'éthanol est son inducteur principal (Nebert and Russell, 2002; Zuber *et al.*, 2002). Le site actif du cytochrome P450 contient un groupement d'hème ferreux. Le cycle catalytique se déroule généralement en quatre étapes. Tout d'abord, le substrat se lie près du groupe hème, du côté opposé au thiolate axial, induisant un changement dans la conformation du site actif en déplaçant souvent une molécule d'eau de la position de coordination axiale distale de l'atome de fer de l'hème et modifiant son état du bas-spin au haut-spin. Il y a transfert d'électrons par une enzyme cytochrome P450 réductase ou autre réductase associée. Par la suite,

l'oxygène se lie au centre de l'hème ferreux, résultant à une position de coordination axiale distale tout en générant initialement un produit d'addition Fe-O₂ semblable à l'oxymyoglobine. Puis, la cytochrome P450 réductase, les ferrédoxines ou le cytochrome b5 transfère un deuxième électron, réduisant Fe-O₂ à un état peroxydé temporaire. L'état peroxydé formé à la quatrième étape est rapidement protoné deux fois, libérant une molécule d'eau et formant du Composé 1 P450, soit une espèce fortement réactive. Ce dernier est une espèce composée d'oxo-fer (IV) (ou ferryl) avec un équivalent oxydant supplémentaire délocalisé sur les ligands de porphyrine et de thiolate. Les enzymes P450 catalysent une variété de réactions selon le substrat impliqué, telles que l'hydroxylation hypothétique illustrée dans la figure ci-bas (figure 1.1). Enfin, l'enzyme revient à son état initial lorsque le produit est libéré du site actif et qu'une molécule d'eau réoccupe la position de coordination distale du noyau ferreux (De Montellano 2005; Denisov, *et al.* 2005).

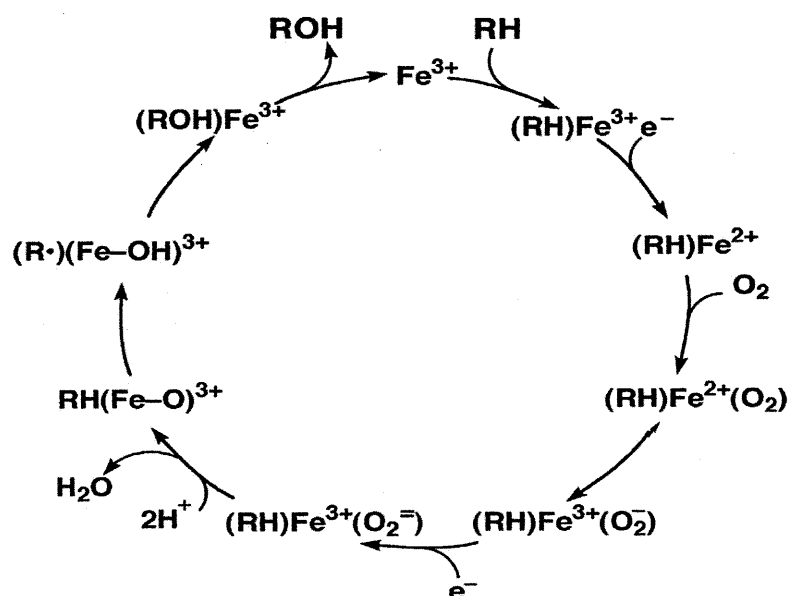


Figure 1.1. Cycle catalytique du cytochrome P450

Comme mentionné plus haut, la majorité des médicaments sont transformés en métabolites plus polaires et stables pour être excrétés par des réactions de bioactivation (désintoxication). Néanmoins, plusieurs xénobiotiques produisent des électrophiles capables de réagir avec les protéines, l'ADN et autres biomolécules en s'y liant de manière covalente (figure 1.2). Ces métabolites réactifs sont souvent de courte durée, vu leur réactivité; par contre, des intermédiaires réactifs peuvent être transportés d'un tissu à l'autre, où ils entraînent leurs effets néfastes (Baillie 2014; Pelkonen, *et al.* 2015).

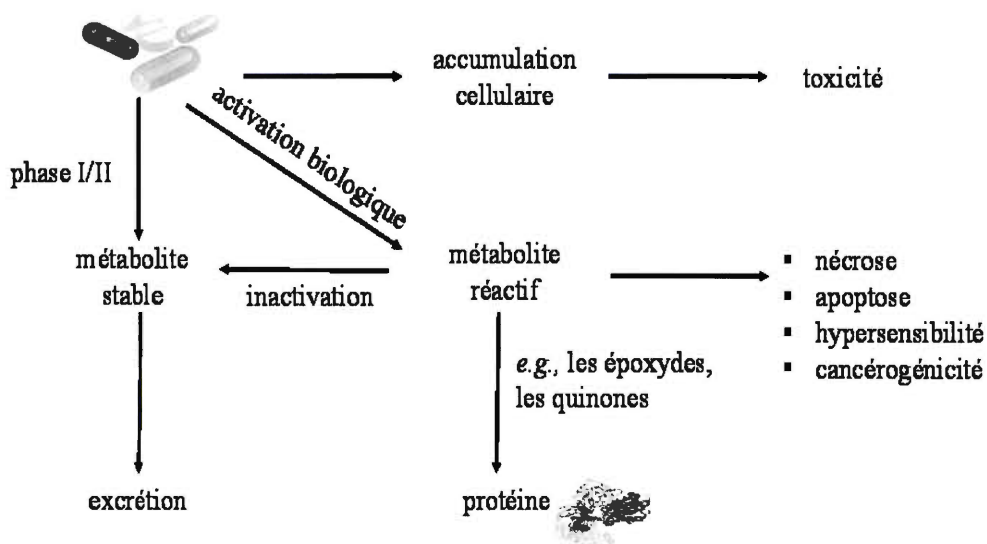


Figure 1.2. Métabolisme modifiée des médicaments et toxicité

Les métabolites réactifs sont classés comme électrophiles ou radicaux libres. Les électrophiles sont réactifs par leur déficience en électrons et peuvent avoir une densité de charge positive élevée (électrophiles durs) ou basse (électrophiles mous) en leur centre (Baillie 2014; Parkinson and Ogilvie 2001) (tableau 1.1).

Tableau 1.1. Exemples d'électrophiles durs et mous ainsi que de nucléophiles

Type	Électrophiles	Nucléophiles
Mou	accepteur de Michael, <i>méthide-quinone</i> , iminoquinone, quinones	RSH, glutathion, RS^- , I^- , RSe^- , alcènes, R_3P
Dur	carbocation d'alkyle, carbonyle, carbocation, ion nitrénium	$R-NH_2$, $R-OH$, RO^- , SO_4^{2-} , Cl^-

Lorsque l'accepteur de Michael, un électrophile mou, a une double liaison d'un alcène polarisé par conjugaison avec un groupe carbonyle avoisinant, cette dernière devient électrophile et réagit avec les thiols nucléophiles. Un exemple d'un accepteur de Michael connu est l'acroléine, qui est également connu comme étant cancérigène (figure 1.3) (Talalay, *et al.* 1988). Suivant le même procédé, les iminoquinones, les quinones méthides et les quinones deviennent réactives. Par conséquent, les médicaments contenant ces groupements ou étant facilement métabolisés en ce type de structure nécessitent une attention particulière (Zhou, *et al.* 2005a) .

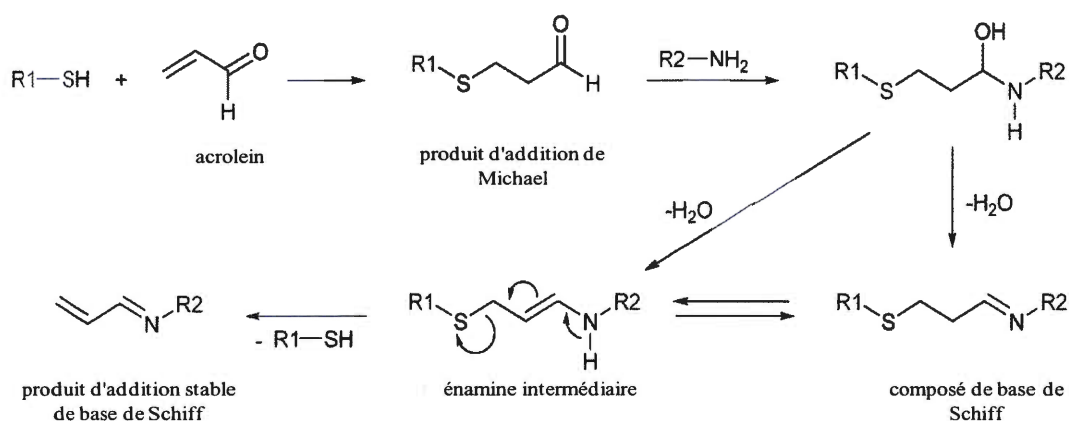


Figure 1.3. Réaction de Michael du glutathion avec l'acroléine

1.1.1 Formation d'adduits et protéines cibles

Les xénobiotiques produisent des métabolites électrophiles très réactifs se liant de manière covalente à des protéines; nous désignons ces modifications par liaison covalente ou adduction de protéines. Ce type de liaison déclenche le mécanisme se rapportant à la cytotoxicité et cause un stress oxydatif pouvant mener à plusieurs procédés tels que la glycation, l'oxydation de protéines par l'azote ou l'oxygène et l'addition protéine-électrophile. L'acylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation sont altérés par ces procédés, diminuant ainsi l'efficacité de la régulation endogène des protéines (Zhou, *et al.* 2005b).

La plupart des métabolites réactifs modifiant des protéines sont des agents électrophiles alkylants ou acylants. Ils réagissent avec des sites nucléophiles dans les protéines cellulaires et se retrouvent le plus fréquemment sur les chaînes latérales des acides aminés de cystéine (S), lysine (N) et histidine (N). Il y a également des formations d'adduits connus sur la méthionine (S), le tryptophane (C), la tyrosine (C), la sérine (O), la thréonine (O) acide aspartique (O) et glutamique (C) (Koen and Hanzlik 2002).

Afin de comprendre les mécanismes de cytotoxicité, il est utile de savoir quelles protéines deviennent adduites et sont des cibles potentielles communes de plusieurs toxines. La littérature sur ce domaine est largement éparpillée, mais la base de données Target Protein Database (TPDB) (<http://targetprotein.res.ku.edu>) a été compilée et est disponible en ligne contenant les cibles *in vivo* de métabolites réactifs provenant de produits chimiques et de médicaments (Gao, *et al.* 2008).

1.2 L'acétaminophène

1.2.1 Histoire et usages

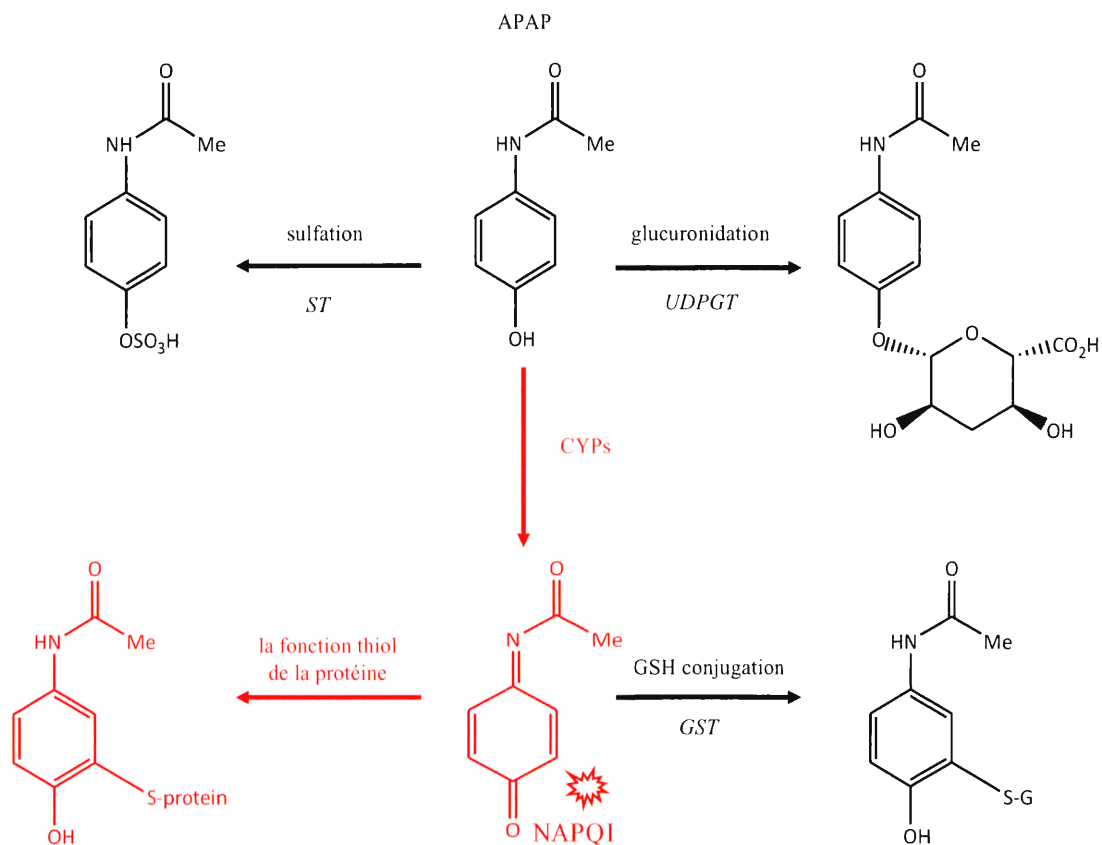
L'acide arachidonique, un acide gras polyinsaturé à 20 atomes de carbone, est présent dans la membrane cellulaire et sa voie constitue l'un des principaux mécanismes de la douleur et de l'inflammation, ainsi que le contrôle de la fonction homéostatique. Les enzymes cyclo-oxygénase (COX), qui sont connues sous les formes COX-1 et COX-2, métabolisent l'acide arachidonique en prostanoïdes.

COX-1 est constitutivement exprimée dans les tissus biologiques et joue un rôle dans l'entretien des voies homéostatiques, alors que l'expression de COX-2 est induite par des cytokines dans des cellules inflammatoires sur des sites localisés. Lorsque présente dans une cellule, COX-2 catalyse la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines, qui augmentent la sensibilité des nocicepteurs, réduisant le seuil de la douleur. Puisque l'acétaminophène n'affecte pas vraiment l'extérieur du système nerveux central, certains pensent qu'il pourrait exister une troisième isoforme de la COX, soit COX-3, qui se trouverait uniquement dans le système nerveux central. De plus, puisqu'il inhibe sélectivement la COX-2, il ne devient pas toxique pour le tractus gastro-intestinal, le rendant plus attrayant que d'autres médicaments similaires (Botting 2003; Hinz and Brune 2006).

Bien qu'il ait des propriétés analgésiques et antipyrétiques, l'APAP n'a pas de propriétés anti-inflammatoires; il n'est donc pas un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (NSAID). Alors que le mécanisme d'action de l'APAP n'est pas tout à fait clair, il pourrait interférer avec la production des prostaglandines dans le système nerveux central en inhibant l'action de la COX, ce qui augmenterait le seuil de la douleur. Également, l'inhibition de la synthèse de prostaglandines dans l'hypothalamus (partie du cerveau où la température corporelle est régulée) est

probablement la cause des effets antipyrétiques observés chez les patients fiévreux (Graham and Scott 2003; Hinz and Brune 2006).

L'acétaminophène (paracétamol, *N*-acétyl-*p*-aminophénol, APAP) est un analgésique et antipyrétique largement utilisé et disponible en vente libre. Une dose de 1-4 g/jour est censée être non-toxique chez l'humain et sa demi-vie dans le sang est de 1,5-3 h. L'élimination s'effectue dans le foie, où la majorité du médicament est glucuronidé ou sulfaté, puis excrété dans l'urine (voir Fig 1.4). L'APAP-Glucuronide représente 50-70% du médicament administré par dose thérapeutique, et 25-35% est généralement récupéré sous forme d'APAP-sulfate. La glucuronidation est catalysée par des UDP-glucuronosyl transférases (UGT), qui transfèrent le groupe glucuronosyl de l'acide uridinique 5'-diphospho-glucuronique (UDP-acide glucuronique) sur les molécules cibles, les rendant plus polaires, alors que la sulfatation est catalysée par des sulfotransférases (SULT). Le coenzyme est 3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) (figure 1.4) (Bertolini, *et al.* 2006; Lancaster, *et al.* 2015; Zhao and Pickering 2011).



UDP-glucuronosyltransferases (*UDPGT*), sulfotransferases (*ST*), glutathione S-transferase (*GST*)

Figure 1.4. Schéma du métabolisme de l'acétaminophène

Environ 8-10% d'APAP peut être métabolisé en NAPQI, un intermédiaire électrophile mou qui est toxique et réactif (figure 1.5).

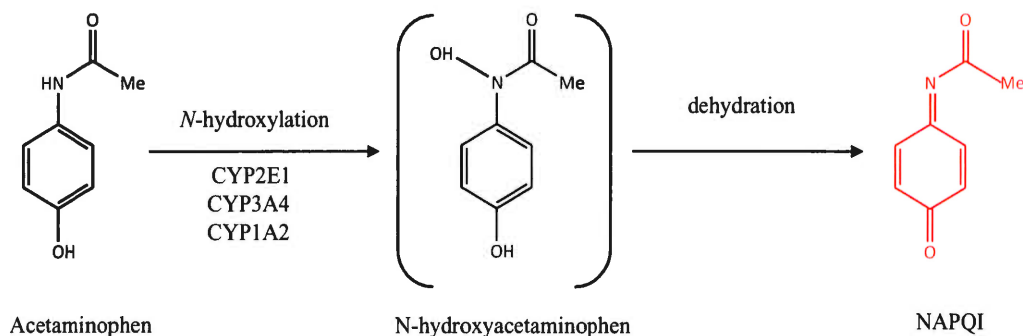


Figure 1.5. Voies de production du NAPQI (Dahlin, *et al.* 1984)

La désintoxication du NAPQI se produit généralement par la conjugaison avec le glutathion (GSH). Toutefois, s'il y a un excès de NAPQI, les réserves de GSH peuvent être épuisées et des adduits protéiques sont formés en se liant au thiol de la cystéine des protéines cellulaires. L'intoxication par l'APAP est la cause la plus fréquente d'insuffisance hépatique aiguë aux États-Unis et au Royaume-Uni (Jaeschke, McGill *et al.* 2012, Gum et Cho 2013, Yuan et Kaplowitz 2013). En effet, elle est reconnue pour être hépatotoxique lorsque prise en doses supérieures à 150 mg/kg/24h (>7,5g–10g) (Winnike 2010).

La *N*-acétylcystéine (NAC) est un antidote efficace pour la surdose d'acétaminophène chez l'humain. Elle est choisie avant le glutathion ou la cystéine pour la conjugaison, puisque ces derniers ne peuvent pas entrer facilement dans les hépatocytes. Elle est plus efficace si elle est administrée dans les 8 heures qui suivent une surdose, mais reste tout de même bénéfique si administrée après 24-72h. L'acétaminophène est rapidement et presque totalement absorbé dans le tractus gastro-intestinal et la concentration sanguine maximale est atteinte 30 à 60 minutes suivant l'ingestion (Atkuri, *et al.* 2007; Marzullo 2005; Zafarullah, *et al.* 2003).

1.2.2 Les protéines cibles de l'acétaminophène

Comme mentionné précédemment, le NAPQI produit par les hépatocytes très instables et réagit généralement rapidement avec le glutathion. Lorsque le NAPQI excède le glutathion (lors d'une surdose), il peut se lier de manière covalente aux groupes thiols des protéines cellulaires et peut ainsi former des adduits de protéines (cystéine-S-yl)-APAP, pouvant nuire à leurs fonctions. Ces adduits peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'exposition à l'acétaminophène. Ils produisent un stress oxydatif qui résulte en dommages mitochondriaux en enclenchant la transition de la perméabilité mitochondriale (MTP), causant une perte de potentiel de la membrane menant à la mort cellulaire (figure 1.6). Les adduits ont été jugés être les principaux mécanismes de lésion hépatique induite par l'APAP (Jaeschke, *et al.* 2012; Qiu, *et al.* 1998; Shin, *et al.* 2007a)

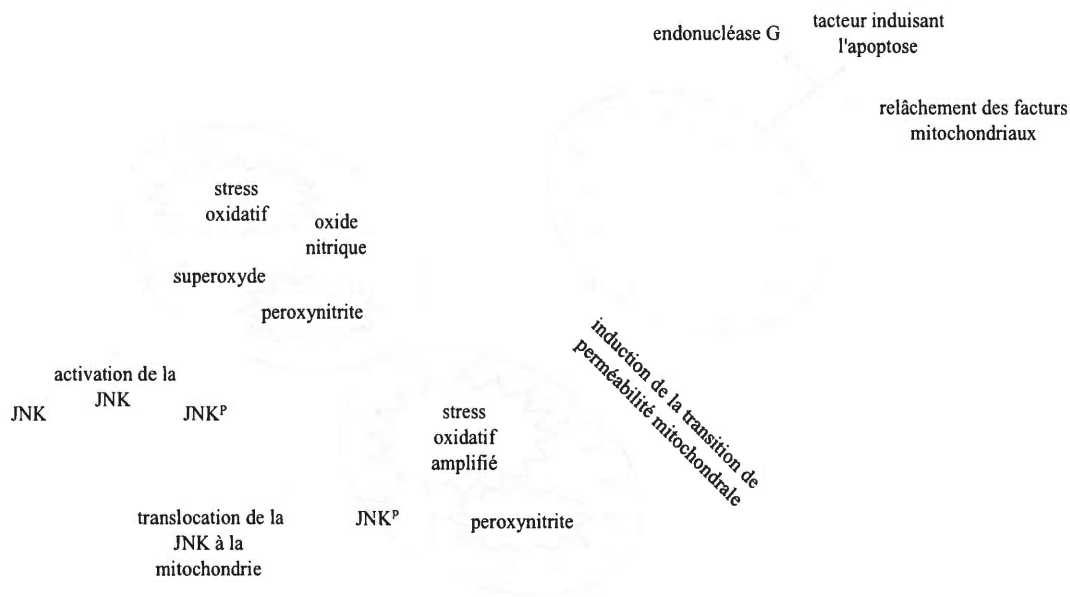


Figure 1.6. Stress oxydatif de la mitochondrie durant l'hépatotoxicité par l'APAP, adapté de (Woolbright and Jaeschke 2016)

L'annexe 1.1 illustre la liste des protéines qui ont déjà été trouvées comme cibles de l'APAP à partir de la TPDB (<http://targetprotein.res.ku.edu>).

1.3 L'analyse LC-MS/MS

1.3.1 Instrumentation et applications

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est une technique analytique comprenant une séparation chromatographique et une détection par spectrométrie de masse sensible et spécifique; leur combinaison peut alors permettre l'identification et la détermination quantitative de composés. L'échantillon est séparé par LC et les molécules passent dans une source d'ionisation, par exemple une source electrospray (ESI), où elles forment des ions en phase gazeuse. L'analyseur de masse filtre ensuite les ions en fonction de leur ratio masse/charge (m/z). Le détecteur compte et peut également amplifier le signal généré pour chaque ion; on crée alors un spectre de masse pouvant aider à la détermination de la structure chimique ou la formule élémentaire des molécules (Zhou, *et al.* 2005a).

En LC-MS/MS, le signal obtenu pour un analyte dépend de sa polarité, sa structure, sa concentration (quantité), ainsi que de la nature et concentration des additifs dans la phase mobile. L'analyte doit être sous forme ionisée afin d'être détecté par le spectromètre de masse. Le pH de la solution/phase mobile est également important : un faible pH améliore la protonation *et* la détection des bases en mode positif et vice versa pour détecter des acides, afin de maximiser la sensibilité de l'analyse. Par conséquent, le choix d'une phase mobile en ESI-MS est un aspect important du procédé d'ionisation. En ESI, un haut voltage est utilisé afin de permettre le passage des analytes de la phase liquide à la phase gazeuse. La polarité

de la phase mobile est importante pour la formation d'ions; une phase mobile plus polaire facilite l'ionisation. Il faut également qu'elle soit facilement évaporée. La première étape en ESI est la dispersion des gouttelettes; ces dernières sont créées en sortant du capillaire, à l'aide du courant électrique. Elles seront également chargées au même voltage que le courant, et seront portées par un jet d'azote (N_2), pouvant augmenter le débit. Ensuite, vient l'évaporation du solvant par la chaleur et à l'aide d'un autre courant d'azote; cela aura pour effet d'augmenter la charge des gouttelettes, puisque leur volume diminue. Enfin, les gouttelettes atteignent un stade où les ions à sa surface peuvent s'évaporer et être analysés par MS (Gross 2006). Il est à noter que des sels tampons volatils sont nécessaires dans la phase mobile pour une pulvérisation stable et pour l'évaporation des gouttelettes de solution. Également, les charges de tous les ions/molécules entourant l'analyte peuvent influencer sa capacité à bien s'évaporer de la surface des gouttelettes, puisque tous les sels tampons seront en concurrence avec l'analyte pour l'espace disponible sur leur surface (Gross 2006; Ho, *et al.* 2003). De bons solvants utilisables en ESI-MS sont surtout l'eau, le méthanol, l'éthanol, l'isopropanol et l'acétonitrile, alors que le choix des additifs est plus limité par les exigences de volatilité. Les sels tampons non volatils tels que les phosphates et les borates sont couramment utilisés en HPLC, mais ne conviennent pas au ESI-MS et doivent alors être remplacés; on utilise plutôt du formate d'ammonium, de l'acétate d'ammonium, de l'acide formique, de l'acide acétique, de l'acide trifluoroacétique (TFA) ou de l'ammoniac comme additifs en LC-MS (Korfmacher 2005). La méthode ESI sera discutée en plus de détails dans la section suivante.

Il y a surtout deux modes de séparation utilisés couramment en HPLC, soit le mode de désorption en phase normale ou en phase inverse. La phase normale se fait avec une phase stationnaire polaire et une phase mobile non polaire alors que la phase inverse se fait avec une phase stationnaire non polaire et une phase mobile polaire. Le mode en phase normale n'est pas pratique pour la recherche biomédicale et les

applications pharmaceutiques, puisque la majorité des médicaments sont de nature polaire et prendront alors plus de temps pour être élués et détectés. Les colonnes les plus couramment utilisées ont une phase stationnaire de silice chimiquement modifiée qui détermine la polarité de la colonne. En chromatographie en phase inverse, les colonnes ont une phase stationnaire hydrophobe qui fonctionne bien pour la rétention de la plupart des analytes organiques. Également, l'eau peut être utilisée comme phase mobile conjointement avec des solvants polaires comme l'acétonitrile et le méthanol, pouvant être ajustés à des débits et des gradients très précis afin d'améliorer la performance chromatographique. Par conséquent, la HPLC en phase inverse n'est pas seulement plus simple, mais également plus rentable. Son principal avantage est qu'elle est flexible; parce qu'elle a une phase stationnaire hydrophobe, on peut l'utiliser avec les échantillons hydrophobes et hydrophiles. Enfin, la chromatographie en phase inverse offre plus de possibilités quant au choix de la phase stationnaire que celle en phase normale (Korfmacher 2005; Rauh 2012).

La chromatographie par échange d'ions est utilisée pour séparer les molécules en fonction de leur charge nette de surface. Pour l'échange de cations, elle utilise une résine échangeuse d'ions chargée négativement, montrant une affinité pour des molécules ayant des charges positives. Elle peut séparer une grande gamme de molécules, incluant les acides aminés, nucléotides et les protéines de grande taille (Jungbauer and Hahn 2009). En chromatographie d'échange de cations forts (SCX), la charge de surface nette de la protéine change avec le pH, tout dépendant de son pKa (figure 1.7). Si le pH du tampon est égal au pKa, la protéine sera neutre; s'il est inférieur au pKa, elle aura une charge nette positive et s'il est supérieur au pKa, elle aura une charge nette négative. Une résine échangeuse de cations chargée négativement est alors choisie si la protéine d'intérêt a une charge nette positive au pH choisi. Par conséquent, différentes protéines se lient à la résine avec des forces différentes, facilitant ainsi leur séparation; lorsqu'on a le pH voulu, les protéines chargées de la manière appropriée vont se lier à la résine. On utilise ensuite un

gradient de sel pour séparer les protéines d'intérêt des autres protéines s'étant liées moins fortement à la résine; elles seront éluées en fonction de leur charge nette (Mohammed and Heck 2011; Williams and Frasca 2001).

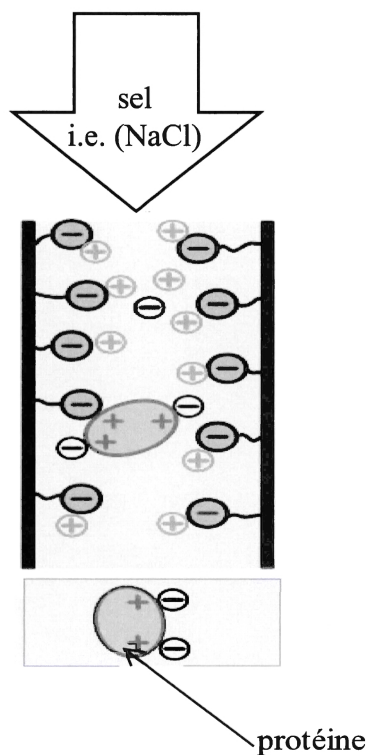


Figure 1.7. Diagramme d'une colonne d'échange de cations

Au cours des dernières années, les colonnes ont connu des avancées au niveau de leurs phases stationnaires. Une des avancées importantes est l'invention des particules noyau-coquille, qui ont gagné une grande importance dans la chromatographie liquide. Elles sont composées des noyaux solides, mais enveloppés d'une couche poreuse de silice modifiée (phase stationnaire) (figure 1.8). Cette

combinaison offre des colonnes avec des performances et une efficacité semblable aux colonnes de particules poreuses emballées, tout en conservant une plus basse contre-pression. En outre, la diminution drastique du temps d'analyse (jusqu'à 4 fois moins long), du temps de rééquilibrage et des volumes de solvant utilisés dans la chromatographie sont des avantages importants de ces colonnes, tout en n'ayant pas de pertes de performance de séparation (Hayes, *et al.* 2014).

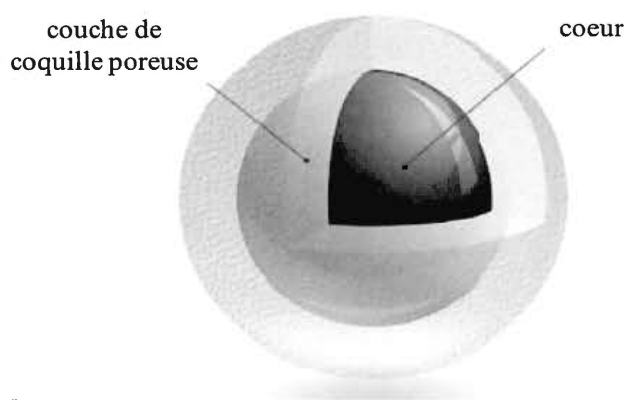


Figure 1.8. Schéma d'une particule de type noyau-coquille

L'émergence de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) durant les dernières décennies ont permis une grande variété d'analyses; elle couvre un plus grand éventail d'analytes que son prédécesseur, qui est la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Un MS/MS comporte deux analyseurs (quadripôles) en tandem. Dans la première étape (MS1), les ions sont formés dans la source d'ionisation et séparés selon leur ratio masse-sur-charge (m/z). Certains ayant un m/z particulier (ions précurseurs) seront sélectionnés, puis filtrés avant l'étape de

fragmentation, souvent dans une cellule de collision. Dans le cas de la dissociation par collisions (CID), les ions fragmentés (ions produits) sont formés après les collisions avec le gaz neutre dans la cellule de collision. Le deuxième analyseur (par exemple, un autre quadripôle ou un temps de vol), est positionné suite à la cellule de collision et sépare les ions produits formés à partir de leurs ratios m/z respectifs.

De nombreux types d'ionisations sont utilisés en MS. Il y a les méthodes classiques connues par la plupart des chimistes, soit l'impact électronique (EI) et le bombardement à l'atome rapide (FAB). Le EI est souvent utilisé en GC-MS, mais les analytes doivent être volatils et thermostables, qui n'est pas le cas pour la plupart de métabolites ou biomolécules. Il y a également les méthodes dites modernes, soit l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), l'ionisation par électrospray (ESI), l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) et d'autres méthodes dérivées qui ont pris la place des méthodes classiques dans les laboratoires de MS. L'avantage de ces techniques, dites douces, par rapport à l'EI, est qu'elles peuvent ioniser les molécules non-volatiles et moins thermostables. Le ESI et l'APCI sont aussi compatibles avec le couplage de la chromatographie liquide (LC).

En ESI-MS, l'échantillon doit être soluble dans un solvant préférablement polaire, pouvant être infusé dans la source d'ionisation par une mince aiguille sous pression atmosphérique. Un fort potentiel électrique est appliqué sur l'aiguille (3-5 kV), entraînant ainsi la formation de gouttelettes fortement chargées (nébulisation). Ces dernières sont conduites électriquement et vaporisées par un gaz neutre chaud (généralement de l'azote) (figure 1.9). L'utilisation de l'ESI se fait principalement pour l'analyse d'espèces chargées; c'est une méthode d'ionisation douce (de très faible énergie), gardant habituellement la molécule mère intacte en lui donnant une ou plusieurs charges. L'APCI est utilisée pour les espèces non chargées ou moins polaires. Après ionisation, la sélection de l'ion précurseur avec le premier analyseur et de l'ion produit avec le deuxième analyseur en MS/MS résulte en une détection hautement spécifique pour une molécule donnée.

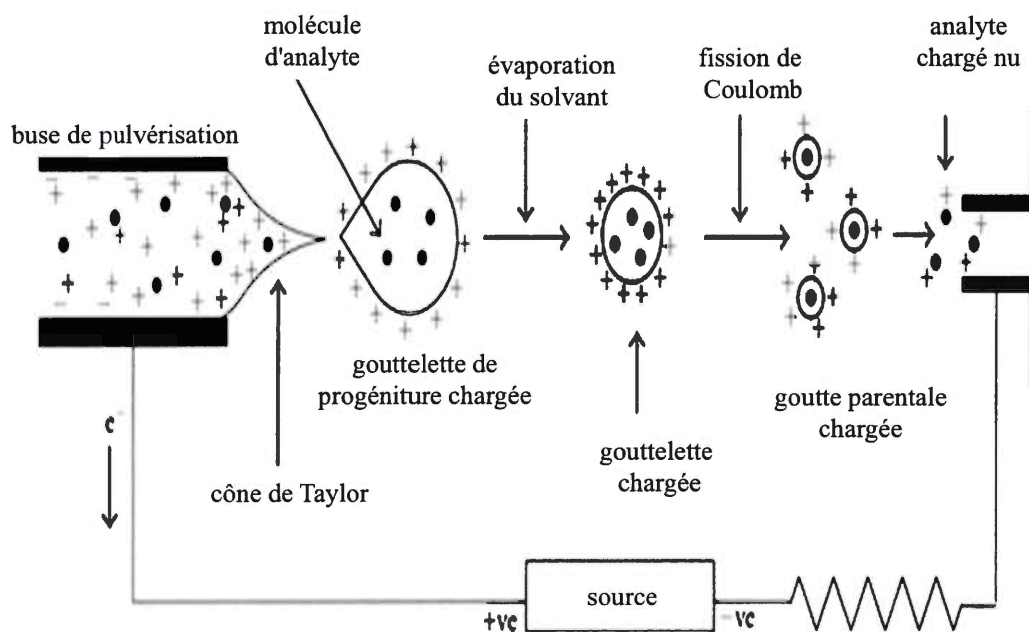


Figure 1.9. Schéma de l'ionisation par électrospray

La dissociation induite par collision (CID) est la méthode de fragmentation la plus utilisée en MS/MS. Dans cette méthode, l'ion précurseur subit une ou plusieurs collisions avec des atomes de gaz neutres, contribuant à l'énergie vibrationnelle qui se transmet sur les ions des protéines/peptides. En protéomique, par exemple, l'énergie vibrationnelle peut causer une dissociation ionique aux liens amides au long de la chaîne principale des peptides, générant des fragments d'ion de type b ou y ou la perte de molécules neutres telles que l'eau, l'ammoniac ou d'autres fragments provenant des chaînes latérales (Awad, *et al.* 2015; Snyder 1996).

Que ce soit lorsqu'une grande sensibilité et spécificité est nécessaire ou quand il est question de produire une seconde fragmentation afin d'obtenir plus d'informations sur les ions choisis, les analyseurs MS à triple quadripôles sont de

mise. Ils permettent l'acquisition de données MS simples, ainsi que des données sur les fragmentations en scan à pleine échelle (*full-scan*), ions précurseurs, pertes neutres et sur les ions fragmentés spécifiques (*selected reaction monitoring*). Les ions choisis passent dans trois quadripôles placés de façon linéaire. Le premier (Q_1) trie les ions d'intérêt créés dans la source d'ionisation, le deuxième (q_2) est une chambre de collision remplie d'un gaz (généralement du N_2 , mais l'argon peut aussi être utilisé, dû à sa plus grande densité et pouvoir de fragmentation) où les ions sont fragmentés en ions produits, et le troisième quadripôle (Q_3) trie les ions produits d'intérêt pour les acheminer vers le multiplicateur d'électrons (figure 1.10). L'utilisation du q_2 est facultative, tout dépendant de si les données impliquant les ions produits sont nécessaires (MS/MS) ou pas (MS).

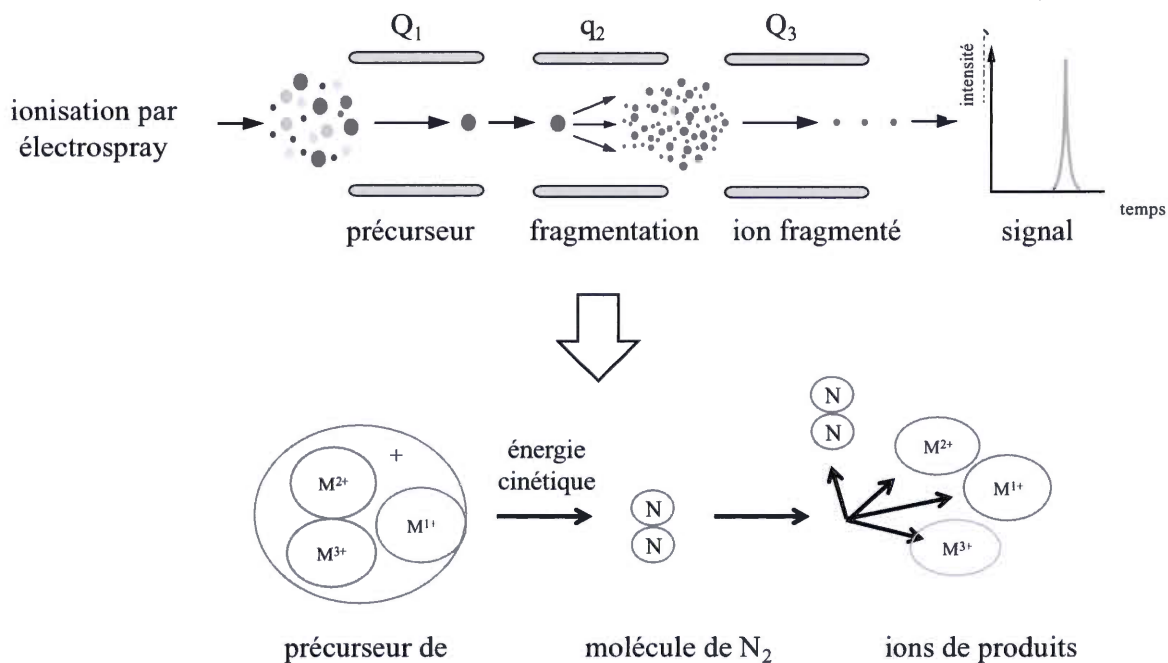


Figure 1.10. La dissociation induite par collision (CID) dans un MS/MS de type triple quadripôle

L'analyseur temps de vol consiste au vol des molécules ionisées dans un tube de 1-2m de longueur avant de se rendre au détecteur. Si deux ions (A1 et A2) sont formés au même moment avec la même charge, mais que la masse de $A1 < A2$, A1 se rendra au détecteur avant A2. L'avantage du TOF est que tous les ions formés vont se rendre au détecteur, contrairement au quadripôle et autres instruments sectoriels. L'équation corrélant le ratio m/z avec le temps de vol total (t_f) est la suivante:

$$m/z = t_f^2 \cdot 2Es / (2s + x),$$

où E est le voltage appliqué, s est la longueur de la région d'accélération de l'ion, et x est la longueur de la région de vol. E, s et x sont théoriquement constants; l'équation peut donc être simplifiée à

$$m/z = K t_f^2,$$

où K est le facteur de calibration. La relation directe entre m/z et le temps de vol peut être observée. Même si le TOF permet d'analyser un grand éventail de masses, la linéarité du tube d'un TOF conventionnel peut influencer son pouvoir de résolution; les ions entrants ont différentes énergies cinétiques (KE), ce qui affecte la résolution et les mesures d'ions moléculaires. Ce défaut a été surmonté par le réflectron (miroir à ions électrostatique), qui modifie la trajectoire des ions dans le TOF, comme montré à la figure 1.11. Les ions ayant une plus grande KE vont enfoncer plus profondément dans le miroir et seront graduellement repoussés, augmentant ainsi la résolution du spectre TOF. Également, le réflectron-TOF offre une meilleure résolution due à la distance de vol qui est augmentée, augmentant également le temps de vol (Gross 2006).

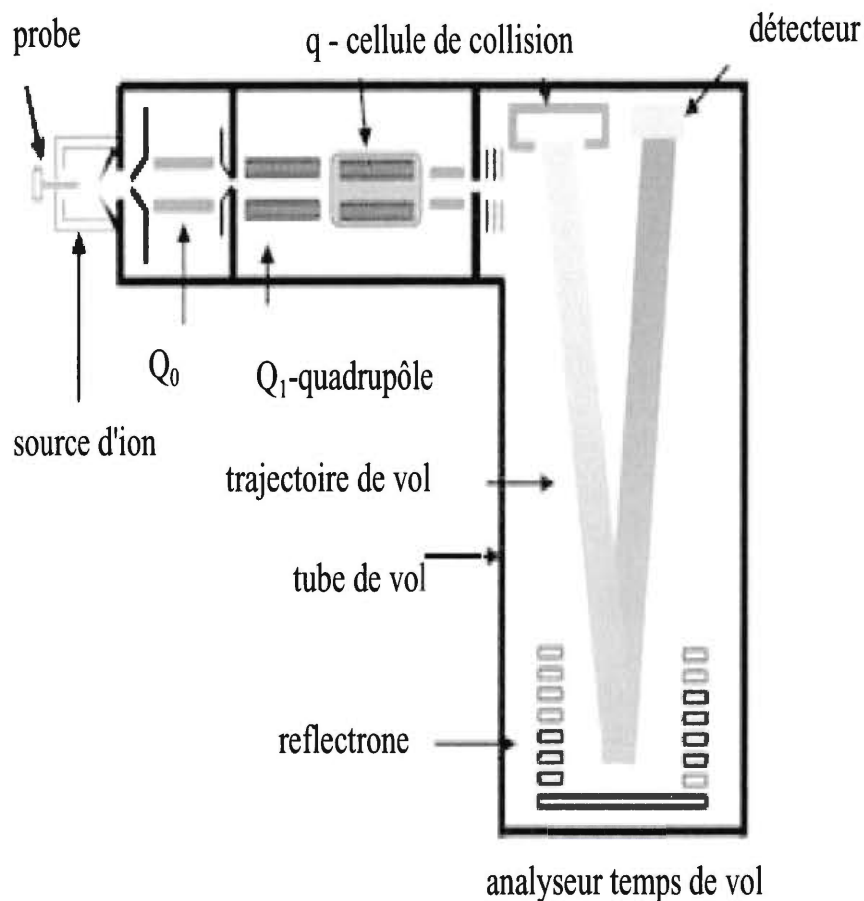


Figure 1.11. Analyseur temps de vol (TOF)

La spectrométrie de masse à triple quadripôle est couramment utilisée à des fins quantitatives, notamment grâce à sa linéarité; le mode d'acquisition de données par observation de réactions multiples (multiple reaction monitoring, MRM) est souvent utilisé pour sa grande sensibilité et spécificité. Toutefois, la grande résolution de masse du TOF appartenant au QqTOF dépasse celle du triple quadripôle. Le piège ionique linéaire (LIT) et le temps de vol (TOF) sont comparés dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2. Comparaison entre le piège ionique linéaire et le temps de vol

caractéristiques	piège ionique linéaire ou quadripôle (LIT)	temps de vol (TOF)
résolution (FWMH)	1000-10000	Plus de 30000 mais 15000 sont typiques
précision de masse (ppm)	50-100	2-50
gamme de masse (m/z)	jusqu'à 4 000 mais généralement inférieur à 2000	jusqu'à 10000
plage dynamique linéaire	100-100000	100-1000000
vitesse de balayage (s)	~1	0.001
fréquence de balayage (Hz)	1-300	10-1000000
sensibilité (g)	10-15	10-12
efficacité	1% to 99%	1% to 95%
pression (torr)	10^{-3}	10^{-6}
avantage	-tolérant la haute pression -petite taille -coût relativement faible -bien conçu pour tandem MS	-la plus haute gamme de masse -vitesse de balayage très rapide -bonne adaptabilité à MALDI -prix
désavantage	-plage de masse limitée -faible vitesse de balayage	-couplage LC (CE) -MS difficile
coût	faible à modéré	de faible à élevé

La LC-MS/MS a un grand nombre d'applications. Contrairement au GC-MS, son application n'est pas limitée aux molécules volatiles (souvent avec un poids moléculaire sous 500 Da). Il est mieux équipé pour la plupart des molécules biologiquement actives, puisqu'elles sont majoritairement polaires, thermolabiles et non-volatiles. Il peut donc analyser des métabolites de médicaments, des protéines et des lipides complexes et permet des diagnostics cliniques. De plus, la préparation des échantillons est simple et ne requiert pas de dérivation. Les essais en LC-MS/MS sont souvent optimisés pour avoir une plus courte durée; plus d'échantillons peuvent être passés en moins de temps que le GC-MS. Le LC-MS/MS est utilisé dans la recherche sur la porphyrie, en dépistant des troubles de métabolisme des purines et pyrimidines chez les patients à risque. Concernant le contrôle thérapeutique de

médicaments, ces méthodes sont valides pour plusieurs classes de médicaments (Gross 2006; Ishihara 2001; Li and Hieftje 1997).

1.3.2 L'analyse par scan de l'ion produit et MRM

Le scan de l'ion produit est l'un des scans les plus communs en MS/MS, où le premier analyseur de masse est réglé à l'ion précurseur et le deuxième analyseur scanne à un grand domaine de masse, donnant un spectre contenant tous les ions produits. Les ions produits servent à l'analyse qualitative, puisqu'ils donnent de l'information structurale (Gross 2006).

Le MRM ou le scan de réaction sélectionnée (Selected Reaction Monitoring, SRM) sont des méthodes très sensibles et sélectives pour la quantification ciblée de protéines/peptides dans les échantillons biologiques complexes. Le MRM est souvent employé pour l'analyse de petites molécules et où la sensibilité est cruciale. Tout d'abord, les ions sont sélectionnés afin de passer dans le premier quadripôle; ce sont les ions précurseurs. Ces ions sont ensuite fragmentés dans la chambre de collision, et certains fragments seront appelés des ions produits ou filles. Le passage d'ion précurseur à ion produit s'appelle la transition d'ions. Ces ions produits seront finalement sélectionnés pour passer dans le deuxième quadripôle (Domon and Aebersold 2006; Kitteringham, *et al.* 2009).

1.3.3 L'analyse de peptides et de métabolites

Les expériences LC-MS/MS sont des atouts majeurs pour l'identification des protéines et métabolites. Des protéines intactes ou en complexe produiront des ions

fragmentés par activation ionique en phase gazeuse (séquençage descendant), des peptides par digestion enzymatique ou chimique (cartographie de masse), et des ions fragmentés des ions peptidiques à masse choisie par activation ionique en phase gazeuse (séquençage ascendant). La scission varie selon la structure, la charge et la grosseur de l'analyte.

La détection de peptides ou protéines par MS peut être essentiellement divisée en deux étapes, soit la préparation de l'échantillon et l'analyse LC-MS. Les principaux défis quant à la détection des protéines/peptides facilitant la croissance est leur faible concentration, la complexité de la matrice et la présence de protéines endogènes et isoformes. La complexité de la matrice fait en sorte que la préparation d'échantillon doit être effectuée et ce, en ne rendant pas l'échantillon incompatible avec l'analyse en MS. Certains problèmes fréquents sont résumés dans la prochaine section.

L'extraction en phase solide (SPE) est souvent utilisée dans la préparation d'échantillons. Elle peut concentrer l'échantillon et réduire sa complexité. Les composés sont séparés selon leurs propriétés physiques et chimiques, déterminant leur distribution dans la phase mobile liquide et la phase stationnaire solide. Suite à cette distribution, les composés restants seront enlevés et les composés s'étant liés à la phase stationnaire seront élués en substituant la solution de lavage pour une solution d'élution. Le matériel servant à faire la SPE est habituellement à usage unique. Il n'y a pas de gradient d'élution (élution en une étape) et seulement certains analytes sont isolés, tout dépendant de la phase solide. Pour les études en protéomique, on l'utilise surtout pour retirer les sels qui pourraient causer la suppression d'ions. En choisissant la bonne phase solide, on peut avoir une très bonne sélectivité, considérant que seulement les analytes s'y liant seront analysés. Les cartouches à balance hydrophile/lipophile (HLB) (figure 1.12) sont souvent utilisées. Elles sont produites par une copolymérisation spéciale, contenant des proportions spécifiques de groupements hydrophiles et lipophiles retenant les analytes polaires et non polaires. Les cartouches sont compatibles à l'eau; on peut alors les ajuster de

façon à avoir la sélectivité voulue. La méthode SPE a un bon recouvrement pour les groupements non polaires à moyennement polaires, acides, basiques et neutres, surtout sur les matrices complexes comme le sang, l'urine et la nourriture (Callesen, *et al.* 2009; Lancaster, *et al.* 2015; Rogeberg, *et al.* 2014; Sigdel, *et al.* 2014).

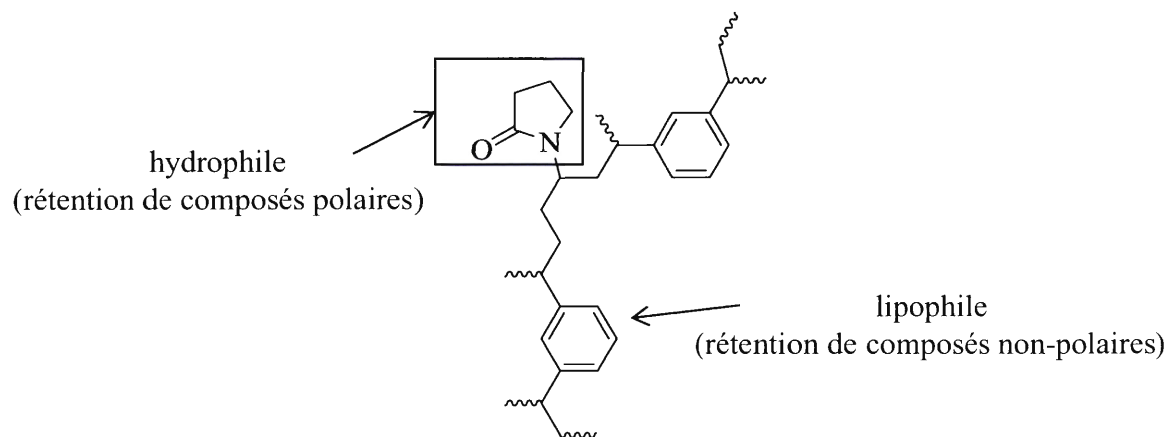


Figure 1.12. Structure chimique de la phase stationnaire HLB Oasis

1.4 Les études *omiques*

Au cours des dernières années, des avancements majeurs dans les techniques omiques (génomique, protéomique, métabolomique, etc.) ont permis de mesurer à haut débit divers processus au niveau de l'organisme et au niveau moléculaire. Elles ont également été appliquées de manière à identifier des variants biologiques tel que les biomarqueurs, afin d'étudier des procédés pathophysiologiques et d'étudier des systèmes biochimiques complexes. Tout d'abord, la génomique est une étude génétique qui a pour cible les génomes des organismes. Elle est la recherche des séquences d'ADN complètes des génomes et la mise en place de cartes génétiques. L'étude d'un seul gène n'entre pas dans la génomique, à moins que sa génétique, sa voie et son information fonctionnelle permettent d'élucider son effet sur le génome et

la réponse qu'il a face à ce dernier. Ensuite, la protéomique est l'étude à grande échelle de la structure et fonction des protéines. Le protéome est l'ensemble des protéines, à savoir les modifications apportées à un certain groupe de protéines par l'organisme ou le système. Il varie avec le temps et le stress que vit la cellule ou l'organisme. Enfin, la métabolomique est l'étude des processus chimiques impliquant des métabolites et plus spécifiquement 'l'étude systématique des empreintes chimiques uniques produites par des processus cellulaires spécifiques '. Le métabolome est la totalité des métabolites (qui représente les produits de procédés cellulaires) dans une cellule, un tissu, un organe ou un organisme. Alors que les données du gène d'expression de l'ARNm et la protéomique ne peuvent pas couvrir tout ce qu'il peut se passer dans une cellule, la métabolomique permet de connaître sa physiologie à un moment donné. Un des objectifs des études 'omiques' est de combiner la génomique, la protéomique, la transcriptomique et la métabolomique afin d'avoir l'information nécessaire pour avoir un meilleur portrait des organismes (Horgan and Kenny 2011) (Saavedra, *et al.* 2013). La figure 1.13 illustre le diagramme de technologies *omiques*.

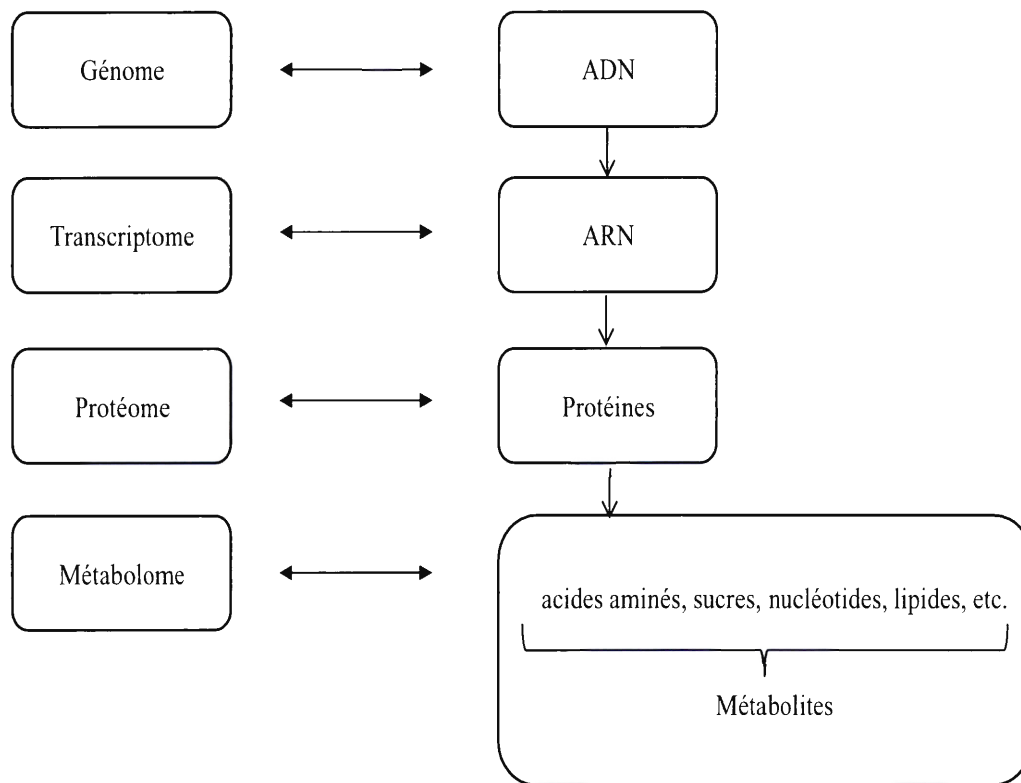


Figure 1.13. Diagramme de technologies *omiques* incluant la génomique, la protéomique et la métabolomique

1.4.1 La protéomique

Les protéines sont des substances complexes qui se retrouvent dans tous les êtres vivants. Ce sont des polymères d'acides aminés qui jouent un grand rôle dans le métabolisme. Leur structure primaire est déterminée par leur séquence d'acides aminés, qui est elle-même déterminée par l'ARN messager (ARNm), apportant un repliement particulier indiquant la structure secondaire. Cette structure est directement influencée par les acides aminés composant la protéine et on y retrouve

deux types : les hélices alpha (en forme d'hélice) et les feuillets bêta (structures linéaires de polypeptides qui s'assemblent pour former un feuillet plat). Ces structures donnent de nouvelles opportunités de liaison aux acides aminés (ponts disulfures, liaisons hydrogène/hydrophobe, etc.), formant ainsi la structure tertiaire. Certaines protéines ont plusieurs sous-unités tertiaires qui, lorsqu'elles se lient ensemble, forment la structure quaternaire, ou finale de la protéine. Un des développements de la protéomique les plus prometteurs est la découverte de médicaments par l'étude du génome humain et de ses protéines. En effet, en connaissant le génome et le protéome humain, nous serions en mesure d'identifier des protéines en lien avec certaines maladies. Le terme 'protéome' a été introduit en 1995 pour définir l'ensemble protéique d'une lignée cellulaire, d'un tissu ou d'un organisme. La protéomique est l'étude à grande échelle des compositions, structures, fonctions et interactions des protéines dirigeant les activités cellulaires. Elle offre une meilleure compréhension de l'organisme que la génomique, puisque cette dernière donne une estimation grossière de l'expression d'une protéine, alors que la protéomique prend en compte les interactions entre protéines, qui fonctionnent souvent en collaboration. Elle est souvent considérée comme étant la deuxième étape dans l'étude des systèmes biologiques, juste après la génomique. Elle est aussi plus compliquée que cette dernière, car alors que le génome d'un organisme est plus ou moins constant, le profil d'expression des protéines change avec le temps, avec les conditions environnementales.

La protéomique d'expression est l'étude qualitative et quantitative de l'expression des protéines totales. On peut comparer une cellule saine ou traitée avec une cellule malade afin de comprendre quelles protéines causent cet état. Elle est utilisée pour trouver des patrons d'expression dans des cellules anormales et permet de comprendre leurs structures complexes, de même que les fonctions des protéines. Elle permet également de comprendre quelles interactions entre protéines peuvent causer un certain mécanisme moléculaire dans les cellules. La spectrométrie de masse

peut être appliquée pour identifier ou quantifier des protéines connues ou inconnues, soit par l'analyse d'échantillons protéiques non-ciblée (qualitative) ou par analyse ciblée de protéines explicitement incluses.

La protéomique est pertinente pour tous les procédés biologiques et pourrait permettre l'utilisation efficace des protéines exprimées. Elle est utilisée en biologie (surtout en oncologie, biologie des cancers), biomédecine, agriculture et en microbiologie alimentaire (Aebersold and Goodlett 2001; Aebersold and Mann 2003).

1.4.1.1 L'approche ascendante

L'approche ascendante (ou *bottom-up* en anglais) en spectrométrie de masse protéomique est la plus utilisée pour caractériser et quantifier les protéines dans des tissus malades ou des liquides biologiques. Elle est aussi appelée «shotgun proteomics», puisque l'analyte de départ est caractérisé à partir des fragments qui ont été obtenus. En effet, la protéine est lysée en plus petits peptides, et ce sont ces peptides qui seront analysés et qui permettront d'identifier la protéine de départ. Elle permet de mesurer indirectement la quantité de protéines, puisque la quantité de peptides relâchés est proportionnelle à la quantité de protéines initiales. Dans une expérience typique, le mélange protéique est digéré par une protéase et ensuite, injecté dans un LC-MS/MS (figure 1.14). L'identification se fait en comparant le spectre de masse obtenu en tandem suite à la fragmentation du peptide au spectre de masse théorique. L'identification se fait en assignant les séquences peptidiques aux protéines; puisque les peptides peuvent être partagés par plusieurs protéines ou être assignés à une seule protéine de manière unique, les protéines identifiées peuvent être groupées selon leurs peptides. L'approche ascendante est très avantageuse quant à sa

couverture complète des protéines et par l'obtention d'une séparation à haute résolution (Gross 2006; Zhang, *et al.* 2013).

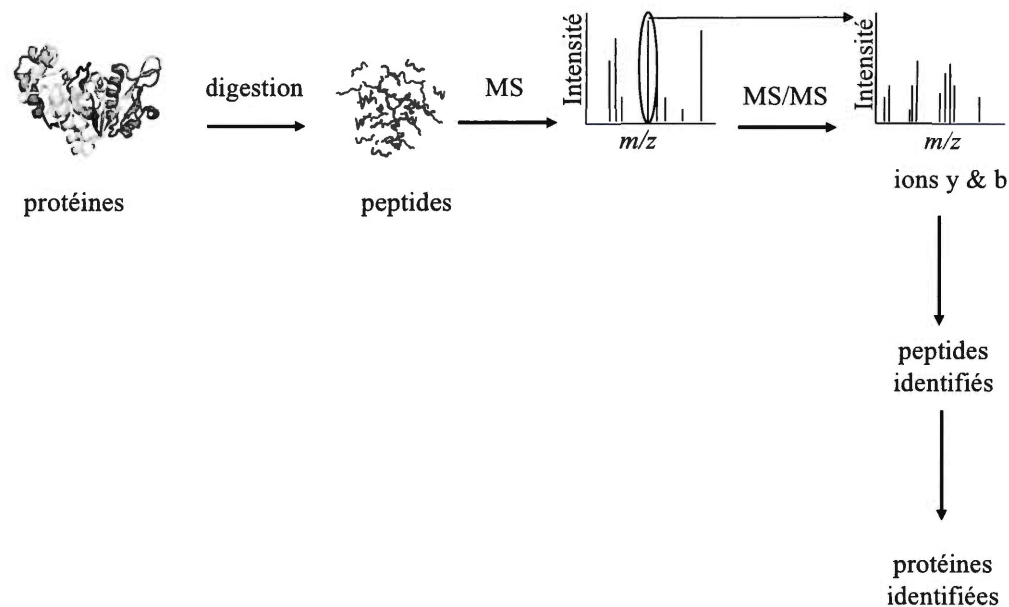


Figure 1.14. Étapes typiques pour une expérience ascendante protéomique en MS

1.4.1.2 Les enzymes disponibles et la complémentarité entre la trypsine et la pepsine

La trypsine, une sérine protéase, est la plus utilisée en préparation d'échantillons en gel/solution pour la spectrométrie de masse. Elle est produite dans l'intestin grêle et a une grande affinité pour les extrémités C-terminales des lysines et arginines. Elle clive les protéines de manière spécifique, de façon à générer des peptides de 7-20 acides aminés et ainsi créer une charge positive à leur C-terminal.

Elle est idéale pour l'analyse par spectrométrie de masse puisque les peptides créés ont une longueur optimale et peuvent facilement être ionisés. La digestion par la trypsine est effectuée à un pH neutre ou très légèrement basique (autour de 8). Suite à la digestion, les peptides produits sont alors injectés dans le spectromètre de masse et identifiés par l'identification des fragments peptidiques ou par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Tout de même, il y a certaines protéines pour lesquelles la digestion par la trypsine est insuffisante, telles que les protéines membranaires et les modifications post-traductionnelles chez les histones. D'ailleurs, certains peptides post-digestion sont trop courts ou trop longs pour être analysés en spectrométrie de masse. Lorsque c'est le cas, la digestion peut être effectuée avec une autre protéase, avec ou sans combinaison avec la trypsine. Cette autre protéase peut engendrer d'autres peptides que ceux produits avec la trypsine, pouvant ainsi devenir un outil d'identification; la superposition des fragments obtenus avec différentes enzymes permettrait de couvrir et confirmer la séquence de la protéine.

La pepsine est une enzyme alternative pour la digestion des protéines pour les études protéomiques. Elle est moins spécifique que la trypsine et certaines autres protéases (Lys-C, Glu-C, Asp-N, etc.). Elle est produite dans l'estomac, fonctionne à un pH très acide (moins que 3) et est irréversiblement inactivée au-dessus d'un pH de 5-6. Dû à cette propriété, elle est souvent utilisée dans la préparation d'échantillons en spectrométrie de masse échange d'hydrogène/deutérium (HDX-MS), où la digestion est effectuée à un pH d'environ 2,5 de manière à retenir le plus de deutérium possible durant l'analyse. La pepsine clive surtout de gros résidus d'acides aminés hydrophobes. Elle clive majoritairement après la phénylalanine et la leucine, et plus rarement après l'histidine et la lysine, lorsque celles-ci sont adjacentes aux deux premières. Puisque la pepsine est moins spécifique que la trypsine, elle peut atteindre des portions inaccessibles à cette dernière. Elle permet donc d'identifier des protéines membranaires en clivant des parties enchâssées dans les membranes

Il est évident que l'utilisation de la trypsine ou de la pepsine en protéomique ascendante (identification d'une protéine à partir de ses fragments) ait certaines limites quant à la connaissance d'un protéome complet, en délaissant des sites de modifications post-traductionnelles, de segments ou même des sous-groupes de protéines. Pour remédier à la situation, des protéases alternatives peuvent être utilisées. Dans le tableau 1.3, huit protéases ayant déjà fait leurs preuves en protéomique sont décrites, à savoir la chymotrypsine, Lys-C, Glu-C, Arg-C, la trypsine, Asp-N, Lys-N et la pepsine (Giansanti, *et al.* 2016; Golizeh and Sleno 2013).

Tableau 1.3. Protéases utilisées en protéomique ascendante

Protéases	Spécificité	pH
le côté C-terminal		
Chymotrypsine	F, Y, L, W, M	8
Lys-C	K	8
Glu-C	E (D)	8
Arg-C	R (K)	8
Trypsine	R, K	8
le côté N-terminal		
Asp-N	D (E)	8
Lys-N	K	8
Pepsine	F, Y, W, L	2

1.4.2 La métabolomique

La métabolomique est l'étude à grande échelle des petites molécules. Comme mentionné plus haut, l'ensemble de ces petites molécules dans système biologique est

appelé métabolome. La métabolomique emploie des méthodes analytiques afin d'aider à la compréhension de divers événements et dynamiques biochimiques en se basant sur la caractérisation des métabolites. C'est une approche efficace parce que contrairement aux autres mesures omiques, les concentrations des métabolites indiquent directement l'état des cellules, tissus et activités biochimiques. Par conséquent, elle représente le mieux le phénotype moléculaire.

La métabolomique est utilisée notamment pour tester les produits et le stress dans les industries alimentaires, c'est-à-dire le contrôle des pesticides et l'identification de souches bactériennes potentiellement nuisibles, pour la recherche dans le milieu de l'agriculture (protection des récoltes et ingénierie) et pour les diagnostics médicaux dans le domaine de la santé. Elle a également des applications en voie de développement en médecine et en découverte de biomarqueurs médicamenteux (Dettmer, *et al.* 2007).

1.4.2.1 Les analyses métabolomiques ciblées vs non-ciblées

La métabolomique peut être divisée en deux approches distinctes, soit par les analyses ciblées et non-ciblées, ayant chacun leurs avantages et désavantages.

Les analyses métabolomiques non-ciblées, ou «globales», sont décrites comme impartiales dans le contrôle des métabolites. Elles sont essentiellement utilisées dans la recherche de biomarqueurs, où l'identification claire du métabolite n'est pas nécessairement recherchée. Quant aux analyses métabolomiques ciblées, elles sont utilisées pour mesurer quantitativement un groupe de métabolites choisi (acides aminés, lipides, glucides et/ou acides gras) de façon à étudier certaines voies métaboliques. Elles requièrent une connaissance a priori des métabolites étudiés. Lorsque l'analyse métabolomique ciblée est utilisée, la méthode de préparation des

échantillons peut être optimisée, pouvant ainsi réduire la présence des molécules moins intéressantes. Ainsi, les analyses métabolomiques non-ciblées fournissent plus d'information sur les métabolites, alors que les analyses ciblées sont plus quantitatives (tableau 1.4).

Tableau 1.4. Étude sur les analyses métaboliques ciblées vs non-ciblées

Méthode d'analyse	But	Propriétés
Analyse non-ciblée (globale)	Mesure le plus de métabolites possibles	- Couverture vaste
	Scan complet en MS (à haute résolution)	- Analyse moins sensible
Analyse ciblée	(QqTOF, FT-ICR, OrbiTRAP)	- Besoin d'intégrer et aligner les pics
		- Identification des métabolites peut être incomplète
Analyse ciblée	Listes spécifiques des métabolites	- Sensibilité optimale
	Méthode MRM	- Métabolites connus
	(QqQ/QTRAP)	- Résultats limités à une liste spécifique
		- Pas de données sur les nouveaux composés

Bien que plusieurs techniques analytiques puissent être utilisées pour les deux essais, la LC-MS/MS incluant des pièges à ions et des spectromètres de masse haute résolution est la plus utilisée, due à leur grande sensibilité et spécificité. Même si les deux essais incluent une étape de préparation d'échantillons, il y a souvent des différences clés quant à cette étape ainsi qu'aux techniques de séparation utilisées. Alors que les analyses métabolomiques globales utilisent une méthode de préparation d'échantillons moins sélective afin de s'assurer qu'un grand intervalle de métabolites

ayant des propriétés physicochimiques différentes puissent être analysés, les analyses métabolomiques ciblées utilisent plutôt une méthode d'extraction basée sur les propriétés physicochimiques des analytes recherchés afin d'avoir la meilleure sensibilité et spécificité pour les métabolites d'intérêt. Les analyses ciblées sont souvent quantitatives et peuvent être certifiées à une plus grande ampleur, alors que les analyses non-ciblées n'engendrent que des données semi-quantitatives. Cependant, les analyses non-ciblées sont souvent utilisées comme une première étape dans les études de découverte de biomarqueurs, et seulement les métabolites montrant des changements ou différences considérables seront analysés par des analyses quantitatives (Dettmer, *et al.* 2007; Gika, *et al.* 2014; Villas-Bôas, *et al.* 2005)

1.4.2.2 L'analyse en composantes principales (PCA)

L'analyse en composantes principales, ou transformation Karhunen-Loève, est une méthode de réduction de données où les données multivariées sont simplifiées en choisissant des nouveaux axes orthogonaux qui maximisent la variance des nouveaux axes. L'axe décrivant la composante principale 1 (PC 1) est la dimension dans la grappe de données dans laquelle il y a le plus de variance. PC 2, le deuxième axe, est orthogonal au premier. Il englobe la majorité de la variance restante. Il va de même pour PC 3, PC 4, PC 5, etc (figure 1.15).

La PCA est une méthode d'identification de patrons et d'expression des données de façon à faire ressortir leurs ressemblances et différences. Elle est efficace pour analyser les données, puisque les patrons dans les données dimensionnelles élevées peuvent être difficiles à trouver. L'avantage principal de la PCA est qu'une fois les patrons trouvés, les données peuvent être compressées en réduisant le nombre de dimensions, sans grande perte d'information. Globalement, elle peut être effectuée sur des données présentées de cette manière afin de rendre possible la visualisation de la plupart de celles-ci (Qureshi, *et al.* 2017; Shlens 2014; Winnike 2010).

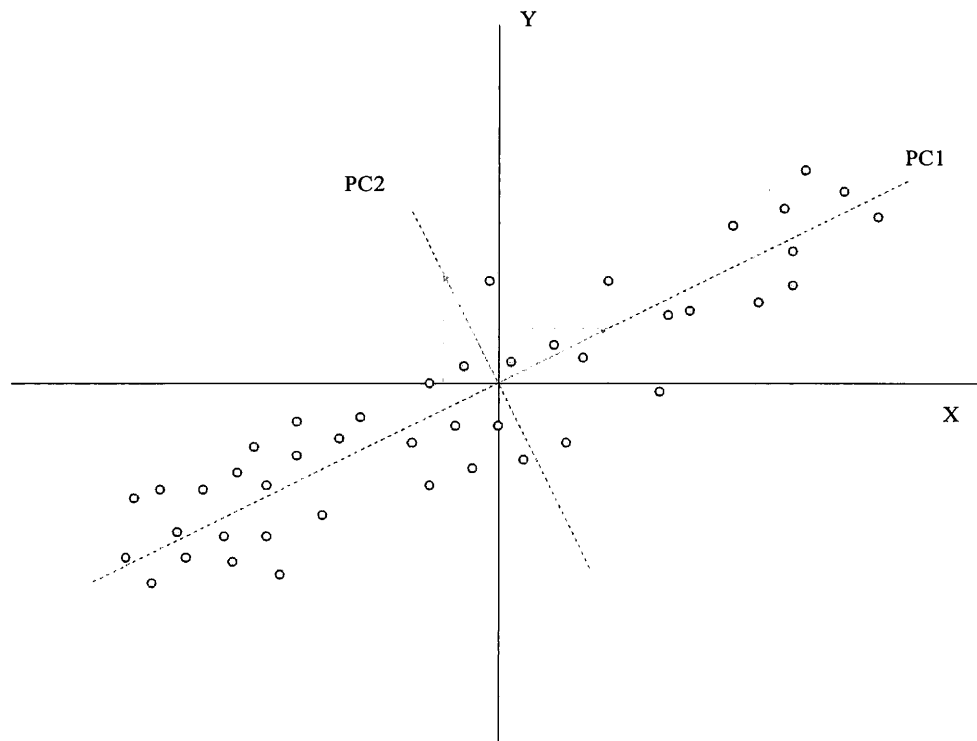


Figure 1.15. PCA simulée effectuée sur deux données dimensionnelles observées sur les axes x et y

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE: “IDENTIFICATION OF *IN VIVO* ACETAMINOPHEN COVALENT BINDING PROTEIN TARGETS IN RAT AND MOUSE LIVER USING 2D-LC-HRMS/MS”

Ghazaleh Moghaddam, Makan Golizeh, Lekha Sleno*

Université du Québec à Montréal, Chemistry Department, Montréal (Qc), Canada

Supporting information included in Appendixes

Article submitted to:

Chemical Research in Toxicology 2018

Submitted: April 15, 2018

L'acétaminophène (APAP) est un analgésique et antipyrétique doux populaire aux États-Unis et dans les pays développés. Alors qu'il est considéré sûr et efficace, il est la cause principale d'insuffisance hépatique aiguë; son hépatotoxicité est due à la liaison covalente entre les protéines et le *N*-acétyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI), le métabolite réactif de l'APAP. Le but de cette étude *in vivo* était d'identifier les protéines cibles et comparer les résultats obtenus chez le rat et la souris. La préparation d'échantillons de foie de rat et souris ont été effectuées avec une approche protéomique ascendante. Une digestion a été effectuée avec la trypsine et la pepsine séparément. Les échantillons ont ensuite été fragmentés par chromatographie d'échange de cations forts (SCX) afin de les analyser pour UHPLC-MS/MS en phase inverse. Des logiciels ont été utilisés afin de trouver des peptides potentiellement modifiés, vérifier l'intégration des pics et comparer les échantillons traités avec des contrôles afin de supprimer les faux positifs. Certaines protéines connues pour être impliquées dans des voies biologiques importantes à la survie cellulaire pendant le stress oxydatif ont été identifiées comme étant modifiées par le NAPQI, ce qui pourrait être lié à l'hépatotoxicité de l'APAP.

Sous la supervision du professeur Lekha Sleno, j'ai été responsable de toutes les manipulations, expériences et analyses de données. La préparation de homogénats de foie a été effectuée par Makan Golizeh, ainsi que l'ai de avec les étapes initiale devant le développement de méthode.

2.3 Abstract

Acetaminophen (*N*-acetyl-*para*-aminophenol; APAP) is a popular mild analgesic and antipyretic in the United States and most of the developed world. Although APAP is safe and effective, it is the leading cause of acute liver failure. This hepatotoxicity has been related to the covalent binding of APAP's reactive metabolite, *N*-acetyl-*para*-benzoquinoneimine (NAPQI), to the proteins. The aim of this *in vivo* study was to identify APAP protein targets in both rat and mouse models and to compare the results from both species using a bottom-up proteomics approach. Proteins were extracted from rat and mouse liver and digested with trypsin and pepsin, separately, then fractionated via strong cation exchange chromatography prior to reversed-phase UHPLC-MS/MS. Data processing involved finding potentially modified peptides, verifying peak integration and comparing APAP-treated to control samples to remove potential false positives. Several proteins were found to be modified by NAPQI. These proteins are known to be involved in important biological pathways that play a key role in cell survival during oxidative stress and could be linked to APAP hepatotoxicity.

2.3 Introduction

Drugs are generally metabolized into biologically inactive forms and principally eliminated from the body by the liver. However during this process, they can also be bioactivated by hepatic enzymes into reactive electrophilic intermediates, which can subsequently react with nucleophilic sites of the proteins to form covalent adducts (Park, *et al.* 2011b; Xu, *et al.* 2005). Reactive metabolites can in turn cause oxidative stress and lead to the formation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) increasing free radical production and glutathione

(GSH) depletion, and affect energy metabolism by adducting to mitochondrial protein complexes (Pessayre 1995; Srivastava, *et al.* 2010).

Acetaminophen (*N*-acetyl-*para*-aminophenol; APAP) is one of the most commonly used painkillers and is known to be the number one cause of acute liver failure in North America (Bateman 2016). APAP is deemed safe as long as recommended doses are not exceeded, but very high doses can cause severe hepatotoxicity, liver injury and even death in both children and adults (Tittarelli, *et al.* 2017).

APAP metabolism primarily occurs in the liver. A major portion of it is converted into sulfate and/or glucuronide conjugates to form water-soluble and readily excretable phase II metabolites. Approximately 10 to 15% of APAP is oxidized by cytochromes P450 (CYPs). CYP2E1 is the major CYP responsible for the conversion of APAP to NAPQI (Laine, *et al.* 2009). This oxidation is responsible for the production of *N*-acetyl-*para*-benzoquinoneimine (NAPQI), APAP's toxic reactive metabolite. NAPQI can generally be detoxified via GSH conjugation. If our GSH reservoir is depleted, excess NAPQI can bind to sulfhydryl groups of cellular proteins, leading to protein dysfunction and potentially acute liver failure (Graham and Scott 2005; James, *et al.* 2003).

Although protein adduction by reactive metabolites is a first step toward liver injury, it is not deemed sufficient to directly cause cell death. Proteomics analysis of the modified proteins in biological samples could help better understand the metabolic processes involved in APAP-related hepatotoxicity and potentially lead to the detection of its biomarkers (Bissell, *et al.* 2001; Cohen, *et al.* 1997).

In this study, a two-dimensional liquid chromatographic separation coupled to high-resolution tandem mass spectrometry (2D-LC-HR-MS/MS) has been employed to identify APAP reactive metabolite protein targets in mouse and rat *in vivo*. Using a previously developed proteomics approach (Golizeh and Sleno 2013), extracted liver proteins were digested by two complementary proteases (trypsin and pepsin) and

subjected to solid-phase extraction (SPE) and strong cation exchange (SCX) fractionation prior to reverse phase LC-MS/MS analysis.

This study is an extension of previous work where we investigated APAP's *in vitro* protein targets using rat liver microsomal incubations (Golizeh, *et al.* 2015). This comparative analysis in rats and mice not only helps future selection of animal models, but also provides novel mechanistic insight into different aspects of the APAP toxicity pathways. The present study aims to assess the applicability of LC-HRMS/MS methodology for *in vivo* biomonitoring of proteins adducted by reactive metabolites.

2.3 Methods

2.3.1 Materials and reagents

Urea was purchased from BioRad (Mississauga, ON). HPLC-grade methanol was from Millipore-Sigma (Billerica, MA). APAP, trypsin (TPCK-treated, from bovine pancreas), porcine gastric mucosa pepsin, sodium *n*-dodecyl sulfate (SDS) and all other reagents and solvents including acetonitrile (ACN) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ultra-pure water was produced by a Millipore Synergy UV system (Billerica, MA).

2.3.2 *In vivo* experiments

Sprague-Dawley male rats (450–550 g) were dosed at 75 and 600 mg/kg APAP. The 75 mg/kg dosing was conducted at the Biopharmacy Platform of the University of Montreal. Rats were first pre-dosed with 35 mg/kg/day of Aroclor 1254 (in corn oil) for four days and on the fifth day, the animals (n=2) were given 75 mg/kg APAP intraperitoneally (IP) in a 60% PEG 200 solution. Aroclor 1254

depletes glutathione reserves. The CYP oxidation of Aroclor 1254, a polychlorinated biphenyl, leads to electrophilic products that can covalently modify proteins and react with glutathione (Dragnev, *et al.* 1994). Livers were collected 2 h after acetaminophen dosing. Rat dosing at 600 mg/kg (IP, solubilized in 60% PEG 200) was performed at the *INRS Centre de Biologie Expérimentale* (Laval, QC). Livers were collected 4 h and 24 h (n = 2 each) post dosing.

Male C57BL/6 mice (27–35 g) were treated (IP, in saline) with 75 mg/kg (2 h), 150 mg/kg (2 and 6 h) and 300 mg/kg (2 and 6 h) (n = 2 each). Each animal study also had a corresponding control group (vehicle only).

2.3.3 Sample preparation

Frozen liver pieces were homogenized in 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 8) at 5 mL/g tissue using a hand-held homogenizers and sonicator, aliquoted (200 µL), and stored at –80°C. Upon thawing, aliquots were solubilized by adding 50 µL of 2% SDS (heated for 3 min, 95°C) followed by 65 µL 7M:2M urea/thiourea mixture (15 s in ultrasonic bath). Then 200 µL of 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 8.5) was added. Reductive alkylation was performed by adding dithiothreitol (DTT) (20 µL, 0.2 M, 20 min, 40°C) followed by iodoacetamide (IAM) (20 µL, 0.5 M, 30 min, 37°C, dark). Samples were then digested by trypsin and pepsin, separately. The first group were diluted with ammonium bicarbonate buffer to a total volume of 1 mL and incubated with trypsin (40 µg, 18 h, 37°C). The second group were diluted with 2% formic acid in 20% methanol to a total volume of 1 mL and incubated with pepsin (40 µg, 4 h, 37°C). Digestion was stopped by the addition of 2% formic acid (20 µL) and 5% ammonium hydroxide (25 µL) for trypsin and pepsin groups, respectively. Digests were then cleaned-up by solid phase extraction (SPE) on OASIS HLB cartridges (1 cc (30 mg sorbent per cartridge), Waters, Milford, MA) with a water

wash and methanol elution (1 mL). Eluates were dried under vacuum and stored at -30°C .

2.3.4 Strong cation exchange (SCX) chromatography

Dried SPE extracts were reconstituted in buffer A (120 μL) and 100 μL was injected onto a Zorbax 300-SCX column (2.1×150 mm, 5 μm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) using an Agilent 1200 series HPLC equipped with a temperature-controlled autosampler, binary pump, degasser, diode array detector and refrigerated fraction collector. SCX fractionation was performed at a flow rate of 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ with a gradient of 0–8% B in 6 min, increasing to 30% at 11 min, 65% at 20 min, 95% at 25 min, and held for 10 min at 95% B, where buffers A and B were 10 mM KH_2PO_4 in 25% ACN (pH 2.75), and 1 M KCl in buffer A (pH 2.75), respectively. UV absorbance was monitored at 220 and 280 nm. Nine fractions were aliquoted from 8.5 to 21.5 min. Fractions were reconstituted with 5% ACN up to 1 mL and subjected to SPE (as above) prior to LC-HRMS/MS analysis. Eluates were dried under vacuum and then reconstituted in 100 μL 10% ACN.

2.3.5 LC-HRMS/MS analysis

Samples were injected (20 μL) onto an Aeris PEPTIDE column (XB-C18, 100×2.1 mm, 1.7 μm) (Phenomenex, Torrance, CA) using a Nexera UHPLC system (Shimadzu, Columbia, MD) with water (A) and ACN (B), both containing 0.1% formic acid, at a flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ (40°C). The gradient started at 5% B, held for 2.5 min, and was linearly increased to 30% B at 40 min, to 50% B at 50 min, then to 85% B at 55 min. A Rheodyne switch valve (IDEX Health and Science, Oak

Harbor, WA) was used to send eluate to waste during the first 2 min of the gradient. MS and MS/MS spectra were collected on a high-resolution quadrupole-time-of-flight TripleTOF 5600 mass spectrometer (Sciex, Concord, ON) equipped with a DuoSpray ion source in positive mode set at 5 kV source voltage, 500°C source temperature and 50 psi GS1/GS2 gas flows, with a declustering potential of 80 V. The instrument performed a survey TOF-MS acquisition from m/z 140–1250 (250 ms accumulation time), followed by MS/MS on the 15 most intense precursor ions from m/z 250–1250 (excluded for 20 seconds after two occurrences) using information-dependent acquisition (IDA) with dynamic background subtraction. Each MS/MS acquisition had an accumulation time of 50 ms and collision energy of 30 ± 10 V. The total cycle time was 1.05 s. The MS instrument was calibrated every 4 injections using a calibration mix with m/z range of 121.0509 to 922.0098 in TOF-MS mode, with reserpine (m/z 609.28) product ion spectra for MS/MS mode (from m/z 74–609).

A Extended LC gradient was also tested (with or without pre-fractionation by SCX) on certain samples with the same above-mentioned MS parameters using two Aeris PEPTIDE (XB-C18, 100×2.1 mm, $1.7 \mu\text{m}$) columns in series (20 cm total). Gradient started at 3% B (B), followed by an increase to 30% B until 120 min, then to 50% B at 160 min, and 85% at 170, held for another 7 min prior to re-equilibration of the column. Column temperature and flow rate were set at 45°C and 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectively.

2.3.6 Data processing

LC-HRMS/MS files were searched against the UniProtKB/Swiss-Prot protein database (downloaded on 2015, updated on 2017) using ProteinPilot software (version 4.1, Sciex, Concord, ON) for *rattus norvegicus* and *mus musculus*, based on

the sample type. To increase the detection of potential APAP adducts, a new custom modification was added to the Paragon algorithm (Shilov, *et al.* 2007) with a probability of 50% for APAP modification ($\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_2$ replacing H, $\Delta m = 149.04766$ Da) on cysteine residues. The search was performed for +2 to +4 charge states at a MS tolerance of 0.05 Da on precursor ions and 0.1 Da on fragments. The target-decoy approach was applied at 1% false discovery rate (FDR) for protein identifications. From the complete list of APAP-modified peptides, only hits with spectral confidence above 95% and $\Delta m < 10$ ppm were retained. Each peak was also manually verified using peak integration and quantitative analysis software (MultiQuantTM version 2.1, Sciex) to ensure that modified peptides were unique to treated samples, and not in controls. The final list of modified peptide candidates were manually confirmed using PeakView software (version 2.2, Sciex) based on the accurate monoisotopic mass and charge state of the precursor ion and high resolution MS/MS spectra.

2.4 Results and discussion

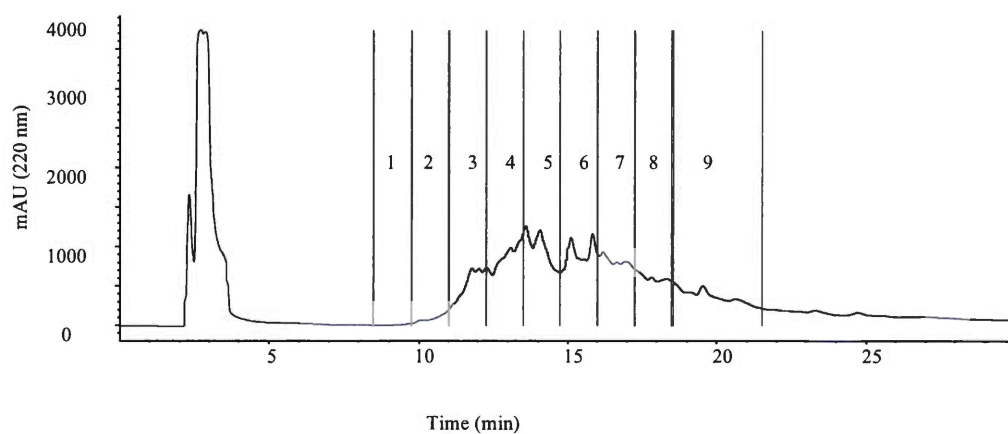
A 2D-LC-HRMS/MS approach was employed to identify APAP reactive metabolite protein targets in mouse and rat liver to help better understand the mechanisms of APAP-induced toxicity by protein covalent binding. Extensive data processing was later carried out to identify and confirm these covalent modifications, as described in the Methods section.

2.4.1 Covalent binding of APAP reactive metabolites to liver proteins

Following digestion, peptides were first separated by strong cation exchange chromatography to simplify the complex sample into fractions prior to injecting onto

the LC-HRMS/MS system. By fractionating the digests, it has been found by our group and others that better protein identification and coverage can be obtained based on the fact that there is less ion suppression as well as more potential for choosing lower level peptides for MS/MS using an information-dependent approach (IDA), often employed in shotgun proteomics workflows (Gillette and Carr 2013; Golizeh and Sleno 2013). Figure 2.1 presents a SCX fractionation LC-UV chromatogram and total ion chromatogram (TIC) from LC-MS/MS analysis from one fraction of a representative mouse sample. Table 2.1 summarizes the identified APAP target proteins, including their accessions numbers, spectral confidence, sequence of the modified peptide, mass accuracy and the site of modification. Also present in this Table is a list of reactive metabolites found to covalently bind to these same proteins from other studies, reported by the Target Protein Database (TPDB) (Hanzlik, *et al.* 2007). TPDB provides information on *in vivo* reported protein targets of the known reactive metabolites.

A



B

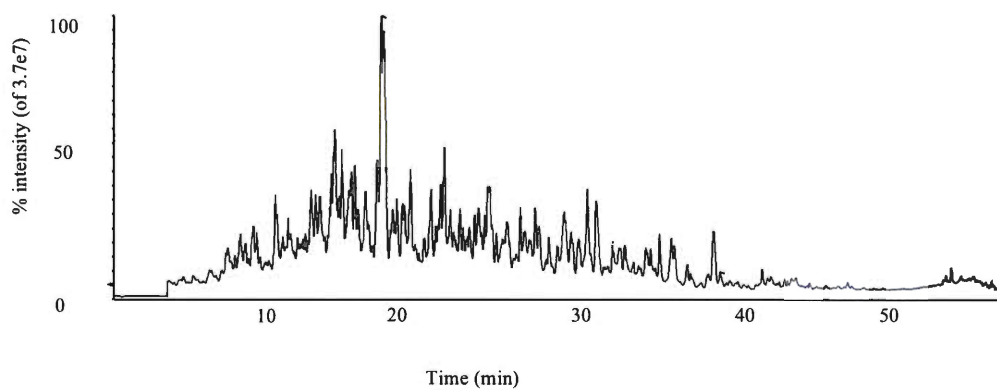


Figure 2.1. LC-UV chromatogram from SCX fractionation of a representative mouse liver protein digest (A) and total ion chromatogram from LC-MS/MS analysis of fraction 7 (B) showing peptide elution profile.

Table 2.1. Rat and mouse liver acetaminophen *in vivo* protein targets identified by 2D-LC-MS/MS

Accession	Target protein	Confidence (%)	APAP-modified peptide	Mass accuracy (ppm)	Modification site	TPDB hits*
CAH3_RAT	Carbonic anhydrase	99.0	EAPFNHFDPSCLFPACR	6.6	C-187	1-5
TPIS_RAT	Triosephosphate isomerase	99.0	CLGELICTLNAAK	1.5	C-21	2, 6-9
ST1E1_RAT	Estrogen sulfotransferase	99.0	NNPCTNYSMLPETMIDLK	5.2	C-237	-
SODC_RAT	Superoxide dismutase**	99.0	AVCVLKGDPVQGVVHF	9.6	C-7	3, 5, 8
DIDH_RAT	3 α -hydroxysteroid dehydrogenase	97.3	SIGVSNFNCR	0.9	C-170	2, 3, 10
CAH3_MOUSE	Carbonic anhydrase	99.0	EAPFTHFDPSCLFPACR	6.2	C-187	1-6
TPIS_MOUSE	Triosephosphate isomerase	99.0	CLGELICTLNAANVPAGTEVVCAPPTAYIDFAR	7.9	C-71	2, 6-9
HIUH_MOUSE	5-hydroxyisourate hydrolase	99.0	LSRLEAPCQQWMELR	5.6	C-35	-
FABPL_MOUSE	Fatty acid-binding protein	99.0	VVRNEFTLGEECELETMTGEK	0.6	C-69	11
ES1_MOUSE	ES1 protein homolog	98.4	KPIGLCCIAPVLAAG	8.0	C-175	-
BHMT1_MOUSE	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	99.0	QVADEGDALVAGGVVSQTPSYLSCK	5.0	C-131	-

* Data from <http://targetprotein.res.ku.edu>

1. Acetaminophen, 2. Bromobenzene, 3. Thiobenzamide, 4. Acrylonitrile, 5. Thioacetamide S-oxide, 6. Quinone methide, 7. 4-Bromophenol, 8. Tienilic acid, 9. Thioacetamide, 10. Furan, 11. Isoniazid

** Identified from pepsin digest. (All other peptides listed are tryptic).

A total of 9 covalently-labeled APAP protein targets were found using this untargeted 2D-LC-MSMS strategy (Appendix B). Two of these proteins were found in both rodent species tested while there more were detected only in rat samples and four proteins were unique in our mouse dataset. None of the modified proteins found in this study has been reported in our previous *in vitro* study using rat liver microsomal incubations (Golizeh, *et al.* 2015).

The two modified proteins were found in both rodent species were carbonic anhydrase 3 (CAH3) and triosephosphate isomerase (TPIS). CAH3 is highly enriched in tissues that synthesize and store fat, such as the liver. CAH3 has a functional role in promoting fatty acid synthesis and lipid accumulation (Mitterberger, *et al.* 2012). As a zinc metalloenzyme, it catalyses the interconversion of CO_2 to HCO_3^- and accelerates the diffusion of $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ through the mitochondrial membrane. Protein levels of CAH3 in the liver can be decreased by dietary stressors and alcohol consumption on rodents (Renner, *et al.* 2017). In this study, Cys-187 of CAH3 use found to be APAP-modified in rat and mouse liver samples. The tryptic peptide EAPFNHFDPSCLFPACR was detected in rat (m/z 719.6487, 3+, 32.8 min) and EAPFTHFDPSCLFPACR was detected in mouse (m/z 715.3170, 3+, 32.6 min). In a previous study by Qiu *et al.* (Qiu *et al.*, 1998), mice were treated with radiolabelled acetaminophen, and the proteins in the liver tissue were separated using 2D-polyacrylamide gel electrophoresis. Tryptic peptides from in-gel digestion, were analysed using matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry. CAH3 was one of the found drug-labelled proteins from more than 20 modified proteins (Qiu, *et al.* 1998). CAH3 has been reported as a covalent target of a variety of reactive metabolites including bromobenzene (Koen, *et al.* 2007), thiobenzamide (Ikehata, *et al.* 2008), acrylonitrile (Nerland, *et al.* 2003) and thioacetamide *S*-oxide (Koen, *et al.* 2013).

TPIS is an essential enzyme in the glycolytic pathway and is necessary for energy production. It reversibly converts aldose glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) to the ketose dihydroxyacetone phosphate (DHAP). TPIS deficiency causes glycolytic enzymopathy especially in early childhood (Rieder and Rose 1959). Moreover, TPIS protein level was previously found to be down-regulated as a consequence of transient expression of *S*-HDAg and *L*-HDAg, separately (Mota, *et al.* 2008). *S*-HDAg (small form) and *L*-HDAg (large form) are two types of hepatitis delta virus (HDV) delta antigens (HDAg). *S*-HDAg is essential for HDV RNA replication, and *L*-HDAg has inhibition role by a dominant-negative inhibitory mechanism (Modahl and Lai 2000). CLGELICTLNAAK (m/z 777.8864, 2+, 30.1 min) and CLGELICTLNAANVPAGTEVVCAPPTAYIDFAR (m/z 914.6953, 4+, 40.1 min) were detected as modified peptides in mouse and rat, respectively. The rat peptide has a much longer sequence since the lysine has been replaced with asparagine, therefore removing a tryptic cleavage site. TPIS has also been reported as a covalent target of other small molecules including bromobenzene (Koen, *et al.* 2007), 4-bromophenol (Koen, *et al.* 2012), tienilic acid (Methogo, *et al.* 2007) and thioacetamide (Koen, *et al.* 2013). TPIS detection in rats dosed with 75 mg/kg APAP revealed that APAP can bind proteins even in lower doses, however these animals had been induced with Aroclor to increase CYP activity therefore producing higher NAPQI levels than non-induced rats. It has been hypothesized that a certain protein binding threshold has to be reached to induce toxicity (McGill, *et al.* 2013). MS and MS/MS spectra from the mouse TPIS APAP-modified peptide are illustrated in Figure 2.2. Two previously reported APAP-cysteine adduct-related MS/MS product ions at m/z 208.0433 and 225.0707 (Golizeh, *et al.* 2015) help confirm APAP-modification of this peptide.

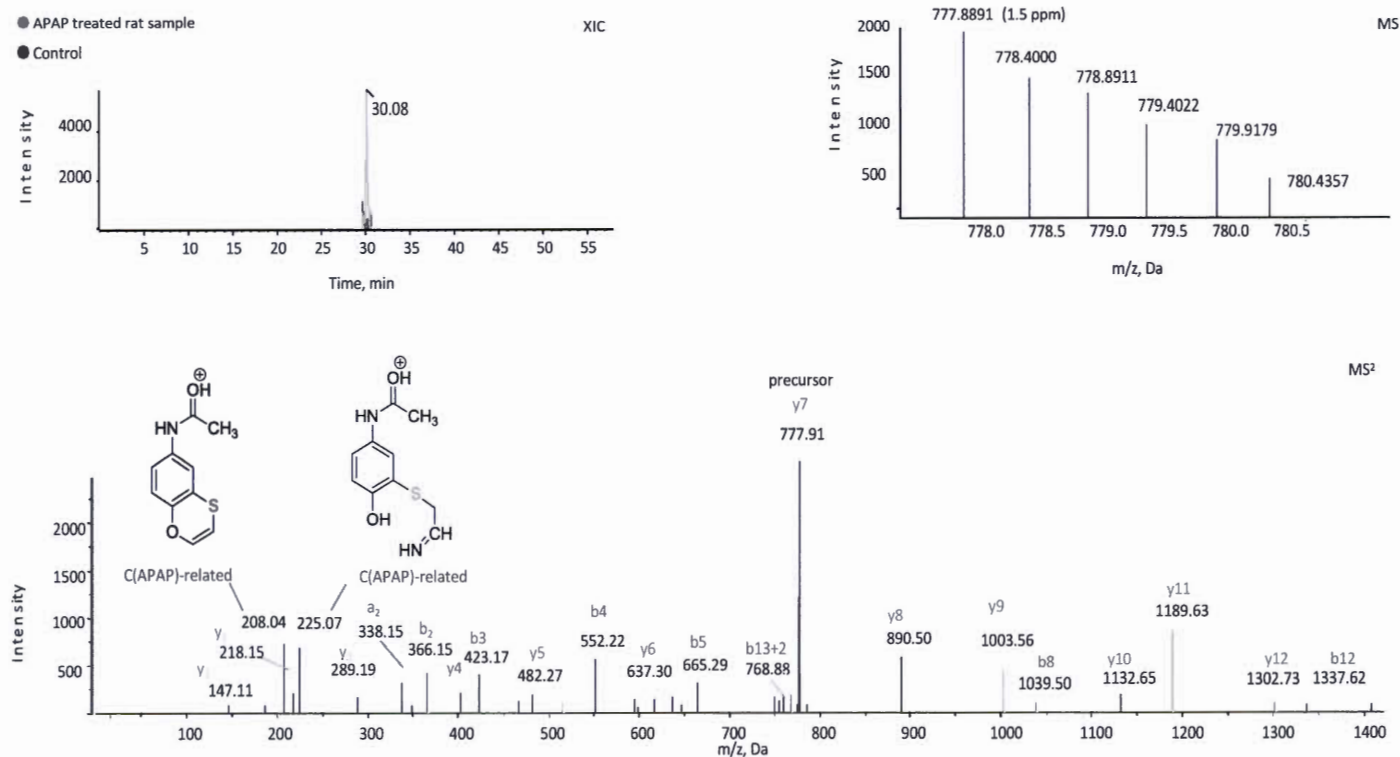


Figure 2.2. Extracted ion chromatogram (A), high-resolution MS (B) and MS/MS spectra (C) from the APAP-modified peptide in rat (CLGELICTLNAAK) from triosephosphate isomerase, an identified *in vivo* APAP target protein

Estrogen sulfotransferase (EST), detected as a modified proteins in rat liver, is a cytosolic enzyme that inhibits estrogen activity by conjugating a sulfonate group to it (Strott 1996). Previous studies have suggested that EST expression in rodent liver depends on age and gender and it is only prominent in mature young males (Song, *et al.* 1998). Expression of EST in the liver is dramatically induced in genetically obese and diabetic mice (Leiter and Chapman 1994; Song, *et al.* 1995). Potential correlation has been reported between EST expression, activity and alcohol consumption (Camporez, *et al.* 2013; Leiter and Chapman 1994). The APAP-modified tryptic peptide NNPCTNYSMLPETMIDLK (m/z 745.0040, 3+, 30 min) from rat ST1E3 (EST isoform 3) was identified. To our knowledge, EST has not been previously reported as a reactive metabolite covalent target.

Superoxide dismutase (SOD) is another identified APAP target found in rat samples. Mitochondria are the major source of SOD as it is an important antioxidant enzyme against ROS, thus SOD plays an important role in reducing oxidative stress. It has been reported that SOD treatment can decrease hepatotoxicity in diabetic animals by reducing liver oxidative stress and increasing antioxidant activity (Oberley and Buettner 1979; Riley 1999). High APAP doses in mice has been shown to elevate SOD hepatic levels to remove superoxide anions and hydrogen peroxide (Su, *et al.* 1995). It has also been reported that decreasing SOD levels in rats can cause APAP-induced hepatotoxicity with protein carboxylation and lipid peroxidation being significantly increased in SOD knock-down rats. Aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) were increased dramatically in SOD2-knockdown rats treated by APAP (1000 mg/kg) against the control adenovirus infected groups (Yoshikawa, *et al.* 2009). Peroxynitrite is a critical toxicant in APAP-induced liver injury (Knight, *et al.* 2002). Even partial deficiency of SOD dramatically exacerbates peroxynitrite formation and cytotoxicity following an APAP overdose (Fujimoto, *et al.* 2009; Ramachandran, *et al.* 2011). In our study, the SOD-related peptide AVCVLKGDGPVQGVIHF (m/z 629.9977, 3+, 26.1 min) was found to be APAP-modified in rat. Intentionally, this modified peptide was only modified sequence

found after through pepsin digestion. The tryptic peptide for site would have been GDGPVQGVIHFEQK but was not detected as modified. Thiobenzamide (Ikehata, *et al.* 2008), thioacetamide *S*-oxide (Koen, *et al.* 2013) and tienilic acid (Methogo, *et al.* 2007) are previously *in vitro* previous reported to cause SOD modification.

3-Alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD or DIDH in rat) catalyzes NAD(P)⁺-dependent oxidoreduction of steroids and dihydrodiols. Multiple forms of 3 α -HSD have been identified in rat liver emphasizing its role in xenobiotic metabolism and intracellular transport of bile acids (Turley and Dietschy 1978). In rat liver, 3 α -HSD is capable of metabolizing polycyclic aromatic hydrocarbons which are known carcinogens. This enzyme is also an important determinant of bile acid transport across hepatocytes (Dufort, *et al.* 2001). Accumulation of bile acids in cholestasis leads to liver injury and inflammation (Palmer 1972). In the present study, the tryptic peptide SIGVSNFNCR (*m/z* 623.3, 2+, 17.3 min) was found to be APAP-modified. 3 α -HSD previously been identified as a target protein of bromobenzene (Koen, *et al.* 2007), and thiobenzamide (Ikehata, *et al.* 2008).

Four protein targets were are identified in mouse samples exclusively in this study. These include 5-Hydroxyisourate hydrolase (HIUH), mammalian fatty acid-binding protein (FABPL), ES1 protein homolog and betaine-homocysteine *S*-methyltransferase (BHMT). HIUH deficiency has been reported to cause hepatomegaly and hepatocellular carcinoma in mice (Stevenson, *et al.* 2010). The tryptic peptide containing Cys-35, LSRLEAPCQQWELR (*m/z* 670.3292, 3+, 24.4 min) was found to be APAP-modified in mouse. Although HIUH mutation was shown to develop hepatomegaly in rodents (Stevenson, *et al.* 2010), this protein has not been reported as a reactive metabolite target protein previously.

FABPL is a small cytosolic protein mainly in the liver but also found in small quantities in kidney and small intestine. It has a crucial role in intracellular fatty acid trafficking and metabolism (Martin, *et al.* 2013). Mouse hepatocyte studies revealed that FABPL participates in the metabolism of long chain polyunsaturated fatty acids

and also has a role in binding of xenobiotic ligands to the nucleus (McIntosh, *et al.* 2010; Richieri, *et al.* 1994). FABPL is expressed in hepatocytes (Bass, *et al.* 1989; Glatz and van der Vusse 1996). Rat FABPL contains one cysteine group at position 69 (Gong, *et al.* 2014). In this study, the tryptic peptide VVRNEFTLGEECELETMTGEK (m/z 637.0451, 4+, 21.3 min) was modified by APAP on Cys-69. APAP overdose is known to induce oxidative stress through increasing mitochondrial membrane permeability, matrix swelling, and outer membrane lysis (Jaeschke, *et al.* 2003). FABP1 was previously shown to react with free radicals in both hydrophilic and lipophilic domains of the cell (Gong, *et al.* 2014).

ES1 protein homolog, a 31 kDa protein, is a mitochondrial protein. Human and mouse orthologues of ES1 are expressed in heart, kidney and muscle. It was shown that ES1 may promote the enlargement of individual mitochondria (Masuda, *et al.* 2016). It is also found to be elevated in Down's syndrome potentially due to a compensatory antioxidant response to increased mitochondrial ROS production (Shin, *et al.* 2004). In this study, KPIGLCCIAPVLAACK (m/z 851.9728, 2+, 26.8 min) was detected in mouse liver. No reactive metabolites have been reported that result in ES1 modification.

Betaine-homocysteine S-methyltransferase (BHMT) BHMT catalyzes the conversion of betaine to homocysteine during the biosynthesis of dimethylglycine and methionine. In rodents, high BHMT activity was found in the liver (Strakova, *et al.* 2011). BHMT deficiency has been linked to hepatocellular carcinoma, as well as nonalcoholic and alcohol-induced fatty liver disease (Teng, *et al.* 2011). In our study, BHMT's Cys-13-containing tryptic peptide, QVADEGDALVAGGVQSQTPSYLSCK (m/z 848.736, 3+, 25.9 min), was found to be APAP-modified in rat.

Reactive metabolites can covalently bind to the proteins causing downstream immune reactions and/or cell damage (Poprac, *et al.* 2017). APAP protein adduction

has long been studied and plays a significant role in the study of drug-induced hepatotoxicity, however, its mechanism of action is not yet fully understood (Heard, *et al.* 2016). Identifying which proteins could be modified by APAP can lead to a better understanding of APAP-induced toxicity (Qiu, *et al.* 1998).

Each target was found in one or multiple samples however no protein was identified as modified in all samples for given species. This fact is important to keep in mind when we want to consider “unique” targets. Obviously, the identified targets can be proven, but the absence of a modified peptide for a given target cannot fully prove that it is not modified in a given species or sample. Liver homogenates are highly complex samples, therefore ion separation and matrix effects make it extremely difficult to comprehensively identify covalent targets. We can overcome these issues with sample clean-up and sample pre-fractionation, however they will always be a possibility of missing an unknown peptides using this workflows.

2.4.2 Target proteins identified using a 1D-LC-MS/MS approach with an extended LC gradient

The workflow chosen for this study was a 2D-LC-MS/MS approach using an offline fractionation step by strong cation exchange followed by a 60 min reverse-phase gradient coupled to the mass spectrometer.

Longer elution gradients often improve LC separations and thus can provide better proteome coverage for non-targeted proteomics studies. In the present work, an extended RP- LC gradient was also tested to ascertain the effect of cation exchange fractionation on the efficiency of peptide modification detection by testing both fractionated and non-fractionated samples. An extended separation was achieved by doubling column length, decreasing flow rate and lengthening the total gradient time

to 3 hours. Figure 2.3 illustrates a representative TIC from a trypsin-digested rat liver homogenate using the extended LC gradient. Eight non-fractionated mouse samples (150 mg/kg (2 and 6h), 300 mg/kg (2 and 6 h) (n = 2 each) and two rat samples (600 mg/kg 24 h, n = 2) as well as two pre-fractionated mouse samples with the highest number of identified proteins from our original 2D-LC-MS/MS method (300 mg/kg, 2h, and 150 mg/kg, 2 h) were selected for analysis using the extended LC gradient.

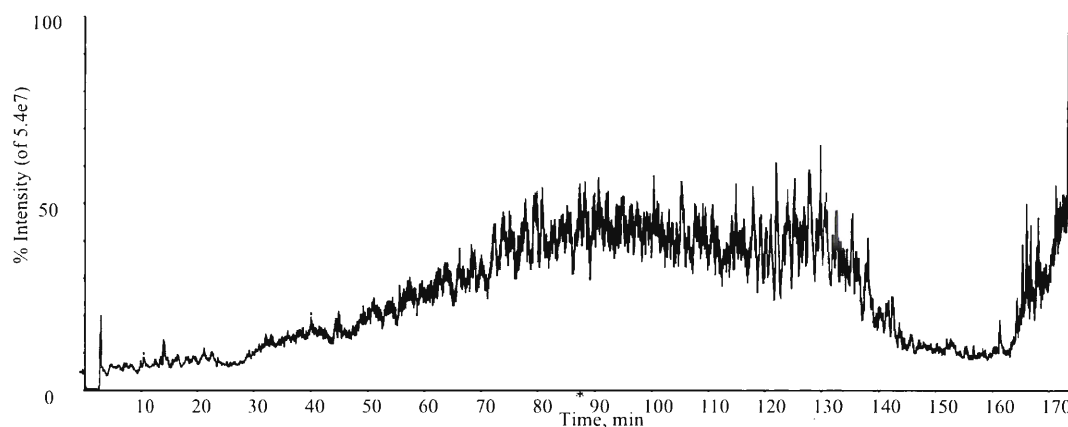


Figure 2.3. Representative total ion chromatogram from an extended LC gradient (3 h) method used for the LC-MS analysis of a trypsin-digested mouse liver homogenate

Interestingly, after data mining several APAP-modified peptides were identified (Appendix B). TICs from the non-fractionated samples showed that average peak widths of the analyzed peptides increased using the extended gradient, likely due to the much slower gradient and lower flow rate, although the chromatographic resolution was still acceptable. The main advantage was that, since peptides eluted over a longer period of time, there was more potential for individual peptides to be selected for MS/MS by IDA a pre-requisite for this peptide IDA using the MS/MS spectra for sequencing purposes.

Although multidimensional LC-MS has been successfully applied in proteomic studies some drawbacks such as sample loss, lack of robustness, and excessive use of salts are considered as weak points of this technique whereas a 1D-LC method could be more straightforward with higher throughput. In general, the 1D approach with an extended LC gradient can simplify the bottom-up proteomics workflow, decrease sample loss, and reduce the total analysis time compared to a typical multidimensional LC-MS/MS workflow (Nägele *et al.*, 2004; Delahunty and Yates Iii, 2005; Gilar *et al.*, 2009). Ideally, an overlap was expected in terms of the identified proteins between the two methods, namely the 2D-LC-MS/MS approach and the 1D-LC-MS/MS method with an extended LC gradient. Modified proteins in rat samples were different but in mouse samples two APAP modified proteins including 5-hydroxyisourate hydrolase and fatty acid-binding protein have been found in both methods. The spectral confidences (99.0%) and sequences (LSRLEAPCQQWMELR, VVRNEFTLGEECELETMTGEK) are the same as well. Table 2.2 represents list of the identified proteins in rat and mouse liver with and without any fractionation technique using extended LC.

Table 2.2 Rat and mouse liver acetaminophen *in vivo* protein targets identified using extended LC gradient (without¹ and with pre-fractionation² prior to LC-MS/MS analysis)

Protein accession	Protein name	% Conf	APAP-modified peptide	ppm	Biological pathway
SARDH_RAT ¹	Sarcosine dehydrogenase	99.0	QLMDCSEDLGMLSIQGPASR	6.3	glycine biosynthetic process
SDHA_RAT ¹	Succinate dehydrogenase	99.0	CGEAACASVHGANRLGANSLLDLVVFGFR	3.5	mitochondrial electron transport, TCA cycle
HS90B_MOUSE ¹	Heat shock protein HSP	99.0	LVSSPCCIVTSTYGWTANMER	6.0	response to drug/stress, protein folding
HIUH_MOUSE ^{2*}	5-hydroxyisourate hydrolase	99.0	LSRLEAPCQQWMELR	7.7	purine metabolism
FABPL_MOUSE ^{2*}	Fatty acid-binding protein	99.0	VVRNEFTLGEECELETMTGEK	2.2	cellular response to hydrogen peroxide, regulation of cell proliferation
CPSM_MOUSE ²	Carbamoyl-phosphate synthase	97.2	TSACFEPSLDYMVTK	7.7	nitric oxide metabolic process
CP2CT_MOUSE ²	Cytochrome P450 2C29	99.0	FIDLLPTSLPHAVTCDIK	1.7	P450 pathway
GLNA_MOUSE ²	Glutamine synthetase	99.0	CIEEAIDKLSKR	7.1	cell proliferation
LDHA_MOUSE ²	L-lactate dehydrogenase	99.0	IVSSKDYCVTANSK	0.9	glucose catabolic process to lactate via pyruvate

* also found in the original 2D-LC-MS/MS method (with 60 min RP-LC gradient)

A Similar to the initial results with the 2D-LC_MS/MS workflow, most of the APAP target proteins identified with the extended LCMS/MS analysis were mouse proteins. Other studies have shown that there is lower mitochondrial protein binding in rat. Rat is generally more resistant to mitochondrial damage and thus less susceptible to APAP-induced liver injury (Abou-Donia 2015; McGill, *et al.* 2012; Woolbright and Jaeschke 2017). Therefore, rats are considered to be a less relevant model for the study of APAP-induced liver injury. Rat has very fast metabolism, so the drug disappears very quickly (Lin, *et al.* 2003). Consequently, it usually needs much higher doses of drug to exhibit toxicity compounds to mouse. Also mouse has smaller body size, and less brain development that can be more challenging for *in vivo* studies compared to rat (Ellenbroek and Youn 2016). It should also be considered that female mice are less susceptible to acetaminophen induced liver injury than male mice due to a variation in mitochondrial protein binding, mitochondrial dysfunction and oxidative stress (McGill 2013; Munoz and Fearon 1984).

2.5 Conclusions

An analytical workflow was developed and applied to identify covalent binding sites on proteins from rat and mouse liver homogenates following APAP dosing. Using a 2D-LC-HRMS/MS, as well as a LC-MS/MS approach with an extended LC gradient (with and without fractionation), a total of 16 proteins have been identified as APAP covalent targets. Two modified proteins were found in both rodent species, namely carbonic anhydrase 3 and triosephosphate isomerase. Many of the identified target proteins can be implicated as having protective effects against oxidative stress and are involved in biological pathways governing cell death induced by reactive species. Further studies are ongoing to confirm these covalent

modification sites using targeted analysis methods to better probe biological reproducibility of these protein targets.

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE: “PROFILING ACETAMINOPHEN HEPATOTOXICITY USING LC-MS/MS BASED METABOLOMICS IN RAT MODEL”

Ghazaleh Moghaddam, Lekha Sleno*

Université du Québec à Montréal, Chemistry Department, Montréal (Qc), Canada

Supporting information included in Appendices

Article submitted to:

Rapid Communications in Mass Spectrometry 2018

Submitted: May 01, 2018

L'acétaminophène (APAP), aussi connu sous le nom de paracétamol ou *N*-acetyl-*p*-aminophénol, est un des médicaments les plus utilisés pour ses propriétés analgésiques et antipyrétiques. Alors que l'acétaminophène est efficace et sans danger si pris à la dose recommandée, il a un potentiel hépatotoxique et peut causer une insuffisance hépatique aiguë avec une surdose. L'utilisation de la métabolomique afin de trouver de petites molécules comme biomarqueurs de toxicité est encore récente, même si la toxicité du APAP est déjà bien établie. Dans cette étude, nous avons employé une approche métabolomique globale pour analyser des échantillons de plasma de rat, afin de mieux caractériser les perturbations métaboliques causées par le dosage de l'acétaminophène. Quatre niveaux de dosage d'APAP ont été administrés aux rats. Des échantillons de plasma 24h post-dose ont été préparés par précipitation dans le méthanol et ont ensuite été injectés dans un système LC-HRMS/MS (UHPLC-QqTOF). Deux colonnes ont également été utilisées pour augmenter la couverture du métabolite. Les colonnes PFP (Phenomenex) et T3 HSS (Waters) ont été analysées en mode d'ionisation électrospray positif et négatif. Les échantillons de plasma dosés ont été comparés à des échantillons pré-dose en tant que contrôle pour l'analyse statistique. Les données de l'analyse non-ciblée ont été traitées et une liste d'ions d'intérêt compilée. Plusieurs métabolites endogènes d'intérêts ont montrés des profils intéressants, incluant d'augmenter avec la dose (pas présent dans les échantillons de contrôle) ou diminuer avec la dose (présent dans les contrôles).

Pour une meilleure quantification ions d'intérêts, ainsi que des métabolites de l'acétaminophène connus, une méthode ciblée en mode LC-multiple-reaction-monitoring (MRM) avec un système de type triple quadrupole (QTRAP) a été optimisée pour analyser des échantillons pris à différents temps après dosage (0, 1, 2, 4, 6, 24 h). Cette analyse sert à mieux comprendre les profils pharmacocinétiques associés aux perturbations.

Sous la supervision du professeur Lekha Sleno, j'ai été responsable de l'optimisation de la méthode analytique et de l'écriture du manuscrit, ainsi que de toutes les manipulations, expériences et analyses de données.

3.1 Abstract

Acetaminophen is a common antipyretic and analgesic and is the main cause for acute liver failure in North America. This is due to its reactive metabolite-related hepatotoxicity. Acetaminophen toxicity is well established, however using a metabolomic approach to find small molecule biomarkers of acetaminophen toxicity is of interest to better understand the specific perturbations occurring based on acetaminophen dose. A global metabolomics approach was employed for analysing rat plasma samples, following acetaminophen dosing at 75, 150, 300 and 600 mg/kg. Plasma samples at 24 h post-dose were prepared by methanol precipitation and analysed by LC-HRMS/MS on a quadrupole-time-of-flight (5600 TripleTOF™) platform. Extracts were separated on two reverse-phase columns, containing PFP and T3HSS stationary phases, for comparison of results in positive and negative electrospray mode. Acetaminophen-dosed samples were compared to pre-dose samples as controls for statistical analysis.

Moreover, a scheduled LC- multiple reaction monitoring (MRM) method was optimized to analyse time-course samples for the metabolites of interest, as well as known acetaminophen metabolites. This targeted MRM analysis was performed to better understand pharmacokinetic profiles of metabolic perturbations. Many features showed interesting profiles, including increasing as well as decreasing with dose. There were also many features found specifically to increase at the highest dose, and there were potentially related to toxicity. Identification of certain features of interest (metabolites) was achieved by accurate mass and MS/MS matching with metabolite databases.

3.2 Introduction

Acetaminophen (APAP, tylenol or paracetamol), a commonly used analgesic and antipyretic, is considered to be relatively safe at recommended doses. APAP is one of the most common causes of liver toxicity in adults as well as children (Nourjah, *et al.* 2006) (Aebersold and Mann 2003; Benson, *et al.* 2005) (Moling, *et al.* 2006). Overconsumption of APAP can cause acute liver failure (ALF), abnormalities in liver function, hepatotoxicity and even death (Chen, *et al.* 2008; Sun, *et al.* 2008). During its metabolism, a major portion of absorbed acetaminophen is conjugated with sulfate or glucuronic acid to form water-soluble, readily excretable metabolites (Kalinec, *et al.* 2014). But approximately 10% of APAP is oxidized by cytochromes P450 forming *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine (NAPQI) (McGill and Jaeschke 2013). NAPQI, a highly reactive electrophile, binds easily to glutathione (GSH) as a detoxification mechanism (Hinson, *et al.* 2010). If glutathione levels are depleted, as a result of acetaminophen overdose, malnutrition or disease, NAPQI can react with thiol groups of cellular proteins (Roberts, *et al.* 2012). A metabolomics study of acetaminophen dosing in an animal model is of interest to better understand the metabolic perturbations occurring in this model of hepatotoxicity.

Reverse-phase liquid chromatography coupled to high-resolution tandem mass spectrometry (RPLC-HR-MS/MS) is often used for detecting and identifying endogenous compounds or drug metabolites in highly complex biological matrices. RPLC-HR-MS/MS is able to cover a wide range of metabolites from polar to non-polar small molecules. A hydrophobic stationary phase works well for retention of many organic compounds (Gika, *et al.* 2014). RPLC-HR-MS/MS is a powerful technique used for robust, accurate, and sensitive detection of molecules of interest particularly in *omic* studies (Tautenhahn, *et al.* 2012). Nuclear magnetic resonance (NMR) is a powerful high throughput analytical technique but suffers from low sensitivity, thus can measure only concentrated metabolites in specific pathways

(Bouhifd, *et al.* 2013). Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) also has very good sensitivity and selectivity but the samples must be volatile. This requirement is easily accomplished by derivatization for certain types of metabolites (Bouhifd, *et al.* 2013). Consequently, as compared to other analytical techniques, RPLC-HR-MS/MS based approaches can cover a wide range of molecules at low concentrations in biological samples including most, drugs, food-related compounds, and many endogenous metabolites in comprehensive studies without requiring derivatization (Xiao, *et al.* 2012).

This study is divided into two main parts including untargeted metabolomics using high resolution tandem mass spectrometry (HRMS/MS), followed by a targeted metabolomics assay based on multiple reaction monitoring (MRM) for metabolites of interest found from the untargeted workflow, as well as known APAP metabolites. Untargeted metabolomics (global metabolomics) is the unbiased analysis of small molecule metabolites present in a biological system, under specific conditions or treatment (Roberts, *et al.* 2012). It usually involves the comparison of the metabolome between control and treated (or diseased) groups, to identify differences between their metabolite profiles. Typically non-targeted metabolomic workflows have three major parts including profiling, which involves finding interesting features with statistical significance, identification or determination of the chemical structure of the associated metabolites and finally, connecting the metabolites discovered and their related pathways (Su, *et al.* 2013). Targeted assays often use MRM analysis due to its increased sensitivity and ease of data processing compared to HRMS data (Roberts, *et al.* 2012). In MRM, a precursor ion for the metabolite of interest is selected for fragmentation and a specific product ion is filtered and reaches the detector in triple quadrupole (QqQ) type instruments (Domon and Aebersold 2006; Kitteringham, *et al.* 2009). MRM was applied to time-course plasma samples from APAP-dosed rats. The main aim of this study was to combine untargeted and targeted MS-based metabolic profiling to study perturbations occurring following different acetaminophen doses and at different timepoints after dosing.

3.3 Methods

3.3.1 Materials

Acetaminophen was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). HPLC-grade methanol, acetonitrile (ACN) and formic acid (ultra-pure) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All solutions were prepared using ultra-pure water from a Millipore Synergy UV system (Billerica, MA).

3.3.2 Animal study

Dosing and blood collection were performed at *INRS Centre de Biologie Expérimentale* (Laval, QC). Sprague–Dawley male rats (450–550 g) were treated with acetaminophen (IP, solubilized in 60% PEG 200) at four levels (75, 150, 300 mg/kg ($n = 3$) and 600 mg/kg ($n = 4$)). In a time-course study, rat plasma samples were collected at six different time points including 0, 1, 2, 4, 6, and 24 h post-dose and they were kept at -80°C until analysis.

3.3.3 Sample preparation

3.3.3.1 Untargeted metabolomics analysis

Rat plasma samples (200 μL) were combined with 600 μL of cold methanol to precipitate proteins and extract metabolites. The mixture was vortexed for 30 s and centrifuged at 14000 rpm for 8 min. A total of 650 μL of supernatant was evaporated to dryness under vacuum (ThermoFisher Scientific Universal Vacuum System,

Asheville, NC) and reconstituted in 100 μ L of 10% methanol, and kept at -30°C prior to analysis.

3.3.3.2 Time course (targeted) metabolomics study

Rat plasma samples (50 μ L) were combined with 150 μ L of 2.5 μ M *N*-(4-hydroxyphenyl)-4-pentynamide (as an internal standard) in MeOH for protein precipitation and metabolite extraction. Samples were then vortexed and centrifuged as above followed by drying 150 μ L of supernatant and reconstituting in 100 μ L of 10% MeOH.

3.3.4 Untargeted metabolomic profiling

LC–HRMS/MS analyses were conducted using a Nexera UHPLC (Shimadzu, Columbia, MD) coupled to a high-resolution hybrid quadrupole-time-of-flight (QqTOF) TripleTOF® 5600 mass spectrometer (Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a DuoIonSpray source, in positive and negative electrospray mode. Extracted plasma samples (10 μ L) were analyzed using two different HPLC columns, including a Waters ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m particle size) and a Phenomenex Luna® PFP (150 $\times$ 2.0 mm, 2.6 μ m particle size).

Mobile phases were water (A), and acetonitrile (B) both containing 0.1% formic acid. For the HSS T3 column, the gradient began at 1% B and held for 1.5 min, increased to 30% B at 8 min, to 75% B at 13 min, then to 90% B at 13.5 and held for 1.5 min. The PFP column gradient elution started at 3% B and was held to 1.5 min with a linear increase to 85% B at 15 min and held for 2 min. The flow rates were 0.45 and 0.30 ml/min, while the column temperatures were 60 and 40°C for HSS T3 and PFP columns, respectively.

The mass spectrometer performed a survey TOF-MS acquisition from m/z 80-950 with an accumulation time of 300 ms, followed by MS/MS on the five most intense ions using information-dependent acquisition (IDA) with dynamic background subtraction (DBS). The collision energy was 30 ± 10 V. Ion spray voltage was set to 5000 V (+ mode) and 4500 V (- mode). The other source parameters were as follows: nebulizer and drying gases (GS1 and GS2) were set at 50 psi, the curtain gas was set at 35 psi, and the source temperature was 450°C. Declustering (DP), entrance (EP), and collision cell exit (CXP) potentials were maintained at 60, 10, and 13 V, respectively. The instrument was calibrated in TOF-MS and MS/MS every four injections using an in-house calibration mix.

3.3.5 LC-MRM targeted analyses

Metabolite extracts (5 μ L) were injected onto a Nexera UHPLC (Shimadzu, Columbia, MD) using the same chromatographic conditions. As described above MRM detection in both positive and negative modes was performed using a hybrid quadrupole linear ion trap (QqLIT) 5500 QTRAP mass spectrometer (Sciex, Concord, ON) with a Turbo Ion Spray ion source, using the same service conditions as for the untargeted analysis.

A scheduled MRM method was developed in each mode with 1.25 s total cycle time and RT windows of 120 s. The most intense MS/MS transition for each metabolite was monitored in MRM mode to obtain the highest possible quantitative sensitivity. Three fragment ions were selected for each precursor-ion and optimized for signal intensity (collision energy (CE)) in both positive and negative mode. Appendix C shows fragment ions in different colors. To increase metabolite coverage, fragment ions in grey color were found previously by the PFP column and they have been analyzed by T3HSS as well as PFP columns using MRM method.

Fragment ions in white color were found previously by the T3HSS column and they have been analyzed by PFP as well as T3HSS columns (Table S2.1).

3.3.6 Data mining and statistical analysis

An initial peak list was created from high-resolution data using MarkerView™ (version 1.2.1, Sciex) differential analysis software directly from raw data files. Then isotopic and redundant features were removed. A *t*-test was then performed to compare treated samples to controls. Features with fold change between 0.5 and 2, for 75 compared to 600 mg/kg groups were removed. Principal Component Analysis (PCA) was applied to graphically show sample groupings in a scores plot. Finally, MultiQuant software (version 2.1, Sciex) was used to edit peak integration and also for the final verification of features with better quantitative value.

3.4 Results and discussion

3.4.1 Untargeted metabolomics

Generally in untargeted metabolomics, the first step is to apply LC-HRMS for measuring metabolite profiles in biological samples. Once an initial “feature” list is found from raw data, data processing and statistical methods are required to classify different sample groups and identify features (or metabolites) which are changing significantly (Zhou, *et al.* 2012). In this study, raw HRMS data was filtered to a refined list of interesting features (*m/z*, retention time (RT) pairs) after removing a large number of unwanted ions using several software packages, including MarkerView, PeakView and MultiQuant (Table 3.1). Criteria included a $p < 0.01$ when comparing the lowest and highest doses of APAP and fold change higher than 2

between these same two groups. MarkerView peak generation yielded an initial list of features, refined by p value and fold change. Each of the remaining features were then manually analysed for a dose trend (either increasing or decreasing with dose). This refined list of features were then subjected to peak integration software (MultiQuant) to ensure proper peak areas were used for determining statistically-relevant changes, since it is not possible to manually check how MarkerView software is integrating each peak. These newly integrated data were re-imported into MarkerView and filtered with the same criteria once again. The number of features found from each step described for both columns tested in positive and negative ion mode are shown in Table 3.1 below.

Table 3.1. Number of features (m/z , RT pairs) from different data filtering using MarkerView (MV) and MultiQuant (MQ)

Column (Mode)	# Peaks MV	# Peaks with fold change <0.5 and >2, $p < 0.01$ (75 vs. 600 mg/kg)	# Peaks with specific dose trend	# Refined list from MQ	# Decreasing with dose	# Increasing with dose	# Related to toxicity
PFP (+)	1653	687	42	18	4	0	14
PFP (-)	1139	830	33	23	6	0	17
HSS T3 (+)	3244	1111	54	51	21	2	28
HSS T3 (-)	2321	1204	38	23	1	3	19

The HSS T3 column in positive mode yielded the highest number of potential metabolites of interest while the lowest number was from the PFP column in positive mode. Both columns gave the same number of “interesting” features, based on our criteria, in negative mode, however they covered different metabolites. Figure 3. 1 is Venn diagrams of refined final list representing features overlaps (neutral mass ± 10

ppm, $RT \pm 0.25$ min) between positive and negative modes of the same column as well as different columns in the same mode.

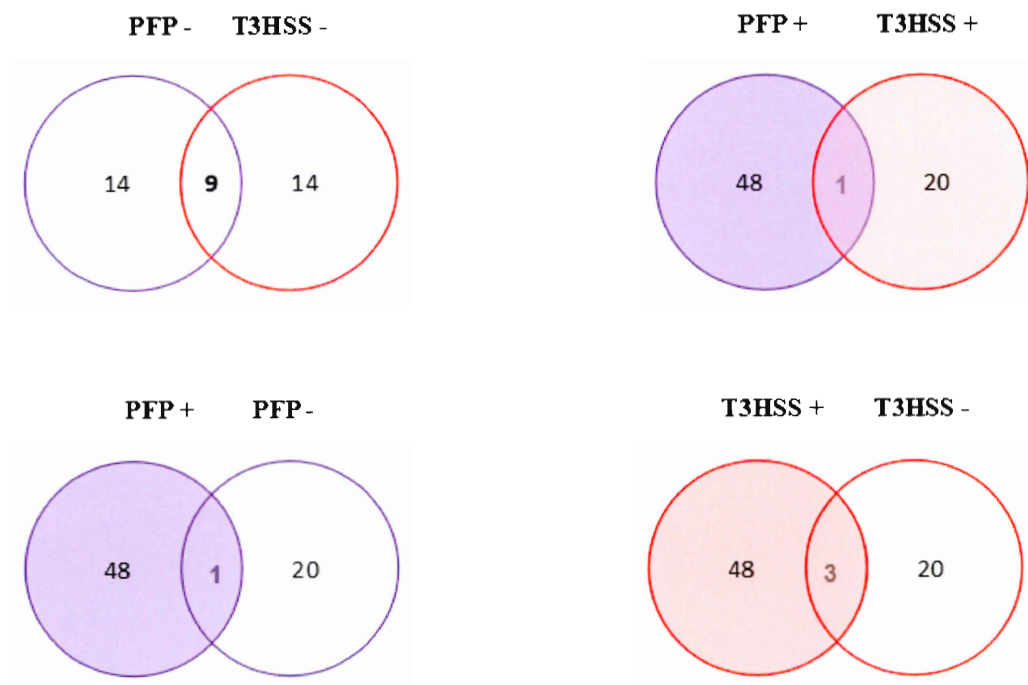


Figure 3. 1. Venn diagrams of filtered lists of features between different modes (same column) and also between different columns (same mode)

Filtered lists were then grouped by “dose trends”, including “increasing or decreasing with dose” or “related to toxicity” if a peak was significantly elevated only for the highest dosing level of acetaminophen (which started to show clinical signs of toxicity). These trends could be visualized easily in MarkerView software (Figure 3.2).

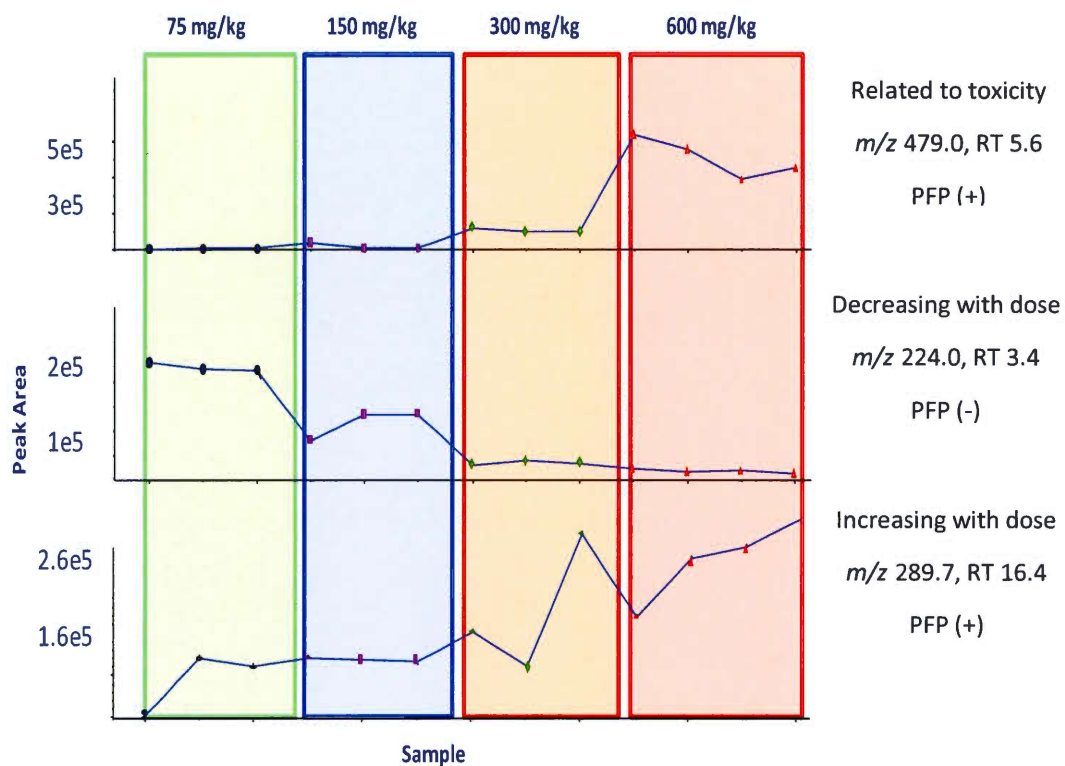


Figure 3.2. Representative APAP dose-related features (MarkerView software)

The dose trend, m/z and retention time of filtered ions using MarkerView (MV) and MultiQuant (MQ) software in positive and negative ion mode are presented in Table 3.2.

Table 3.2. Lists of filtered features using MarkerView (MV) and MultiQuant (MQ) software (4 data sets: T3 HSS and PFP columns tested in positive and negative ion mode)

T3 HSS (-) final interest list after MultiQuant				T3 (+) final interest list after MultiQuant			
#	m/z	Ret. Time	Group	#	m/z	Ret. Time	Group
1	269.0662	5.6	related to toxicity	1	154.0618	4.4	increasing with dose
2	342.0816	4.0	decreasing with dose	2	165.0901	11.3	related to toxicity
3	389.0886	8.9	increasing with dose	3	253.1189	4.7	decreasing with dose
4	389.2671	12.1	related to toxicity	4	263.1632	11.3	related to toxicity
5	391.2844	13.3	related to toxicity	5	277.1477	10.2	related to toxicity
6	405.2614	11.3	related to toxicity	6	277.2176	13.7	related to toxicity
7	405.2616	11.5	related to toxicity	7	278.1502	11.3	related to toxicity
8	425.0324	8.5	decreasing with dose	8	279.1574	11.3	related to toxicity
9	435.2738	12.7	related to toxicity	9	295.2273	13.7	related to toxicity
10	441.2425	11.5	related to toxicity	10	296.1506	5.1	increasing with dose
11	448.3041	11.6	related to toxicity	11	307.0677	3.8	decreasing with dose
12	448.3043	12.3	related to toxicity	12	328.6744	5.6	decreasing with dose
13	451.2678	11.2	related to toxicity	13	353.2485	11.2	related to toxicity
14	451.2678	10.6	related to toxicity	14	355.2641	12.1	related to toxicity
15	451.268	11.5	related to toxicity	15	357.1855	5.8	decreasing with dose
16	453.2842	11.8	related to toxicity	16	371.2597	11.2	related to toxicity
17	471.2364	11.4	related to toxicity	17	373.2741	12.1	related to toxicity
18	471.3094	12.3	related to toxicity	18	381.0772	4.0	decreasing with dose
19	477.0615	4.4	related to toxicity	19	383.2032	4.0	decreasing with dose
20	499.0452	4.4	related to toxicity	20	391.2849	12.1	related to toxicity
21	548.2316	12.4	related to toxicity	21	421.7055	6.0	decreasing with dose
22	588.0970	4.1	related to toxicity	22	422.2077	6.0	decreasing with dose
23	694.3756	7.7	decreasing with dose	23	440.7446	8.2	decreasing with dose
				24	441.2461	8.2	decreasing with dose
				25	441.7311	14.5	decreasing with dose
				26	448.3076	11.2	related to toxicity
				27	450.3220	12.3	related to toxicity
				28	454.3519	12.0	related to toxicity
				29	457.3353	13.5	related to toxicity
				30	473.3273	12.3	related to toxicity
				31	479.0800	4.4	related to toxicity
				32	486.2301	6.0	decreasing with dose
				33	524.3072	7.7	decreasing with dose
				34	538.4231	14.1	decreasing with dose
				35	548.3729	14.5	decreasing with dose
				36	606.8060	6.7	decreasing with dose
				37	677.5561	12.6	decreasing with dose
				38	696.3917	7.7	decreasing with dose
				39	710.2203	6.5	decreasing with dose
				40	720.1407	5.3	related to toxicity
				41	781.5587	12.0	related to toxicity
				42	799.5749	12.0	related to toxicity
				43	817.5874	12.1	related to toxicity
				44	834.6093	12.1	related to toxicity
				45	839.5723	12.1	related to toxicity
				46	855.5469	12.1	related to toxicity
				47	857.7151	10.6	decreasing with dose
				48	857.8062	10.7	decreasing with dose
				49	870.4939	12.0	related to toxicity
				50	873.5048	12.1	related to toxicity
				51	886.6188	13.3	related to toxicity

PFP (-) final interest list after MultiQuant				PFP (+) final interest list after MultiQuant			
#	m/z	Ret. Time	Group	#	m/z	Ret. Time	Group
1	194.0482	5.7	decreasing with dose	1	134.0605	8.5	related to toxicity
2	222.0827	8.0	decreasing with dose	2	188.0713	8.7	related to toxicity
3	224.0233	3.4	decreasing with dose	3	208.0600	6.9	related to toxicity
4	224.0254	2.7	decreasing with dose	4	254.0085	6.8	related to toxicity
5	248.0975	9.2	decreasing with dose	5	300.2907	12.2	decreasing with dose
6	308.1173	6.8	decreasing with dose	6	355.2641	12.1	related to toxicity
7	323.1503	11.7	related to toxicity	7	360.0700	7.0	decreasing with dose
8	357.1020	10.6	related to toxicity	8	372.0882	11.2	related to toxicity
9	389.0916	9.6	related to toxicity	9	391.2848	11.2	related to toxicity
10	405.2653	10.7	related to toxicity	10	454.3546	11.2	related to toxicity
11	441.2421	10.9	related to toxicity	11	462.2990	13.4	decreasing with dose
12	448.3060	11.6	related to toxicity	12	464.3010	9.6	related to toxicity
13	448.3065	11.0	related to toxicity	13	466.3184	10.3	related to toxicity
14	451.2703	9.9	related to toxicity	14	479.0821	5.6	related to toxicity
15	451.2704	10.9	related to toxicity	15	483.3441	10.3	related to toxicity
16	462.2847	9.9	related to toxicity	16	640.1722	6.1	related to toxicity
17	464.3019	10.3	related to toxicity	17	697.1520	7.0	decreasing with dose
18	471.2447	11.6	related to toxicity	18	817.5856	11.2	related to toxicity
19	477.0645	5.6	related to toxicity				
20	500.2763	10.2	related to toxicity				
21	508.2907	9.9	related to toxicity				
22	815.5693	11.2	related to toxicity				
23	851.5421	11.2	related to toxicity				

Principal component analysis (PCA) as a data processing technique extracts systematic trends in large data matrices. PCA, can reduce the number of variables and can find linear combinations of variables in a data set. In this study PCA, within MarkerView, was used to visualize the control and dosed groups using only the filtered features. In this way, similar treated samples should cluster near one another while disparate samples will be farther apart. PCA scores plots for APAP plasma samples belonging to the grouping of features “related to toxicity” and “decreasing with dose” are shown in Figure 3.3. The number of features to create PCA plots for “increasing with dose” group was not sufficient.

PCA is applied to gain an overview of the similarities and dissimilarities among different APAP dose group. Some relations among the dosages can be easily identified. Each dose is loosely clustered in a particular region but a clear dose-dependent response was observed in “related to toxicity” group with the highest dose

of 600 mg/kg (in +/-modes). When glucuronidation and sulfation pathways get saturated, higher portion of acetaminophen gets oxidized. Then excess NAPQI depletes glutathione stores causing liver injury. Thus, it is hypothesized that due to acetaminophen toxicity, considerable metabolic differences occurred in this group.

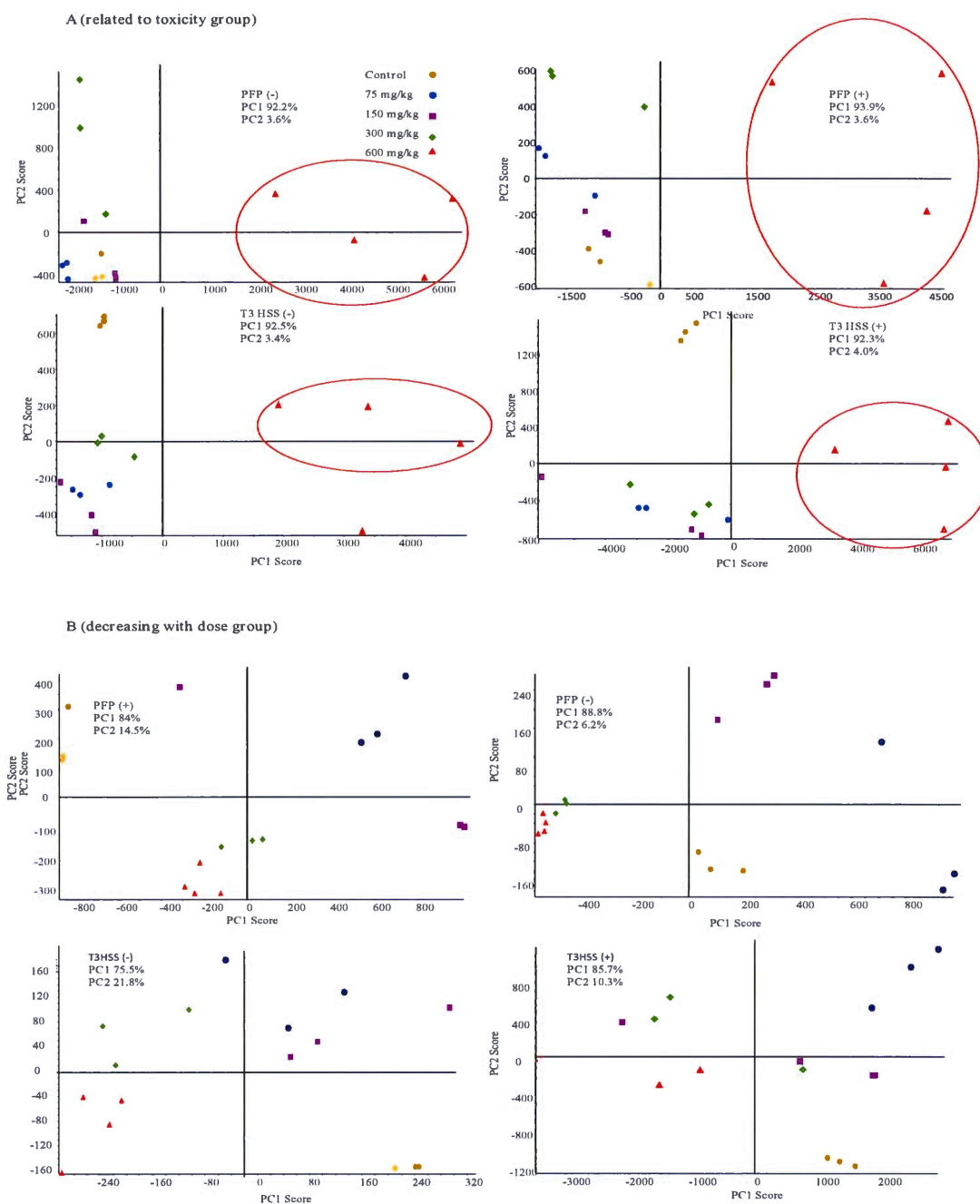


Figure 3.3. PCA plots of features found to be related to toxicity (A) and decrease with dose (B) from HSS T3 and PFP columns in positive and negative modes

3.4.2 MS/MS optimization for targeted metabolomics assay

The untargeted method was applied to plasma samples 24h after APAP dosing, since that was at the time of sacrifice. The other timepoints were much more sample limited (~ 200 μ L plasma each), therefore necessitate a higher sensitivity method.

Plasma extracts from time-course samples (0, 1, 2, 4, 6, and 24h) were then analyzed using an optimized targeted method by MRM on a quadrupole-linear ion trap (QTRAP) system using the same chromatographic conditions. MRM detection was optimized a list of interesting features filtered from untargeted data as well as several known APAP-derived metabolites. We compiled a combined list of features from both columns in positive and negative mode and three predominant fragment ions of each precursor were selected to determine MRM transitions. A scheduled MRM method was then applied with detection window at 120 s the known RT. The method was optimized to find the best transitions (precursor/product ion pairs) and collision energies (CE). An alkyne-containing analog of APAP (*N*-(4-Hydroxyphenyl)-4-pentynamide) (LeBlanc 2015), was used as an internal standard to improve the accuracy of quantitation (Figure 3.4), and to normalize data from all samples report peak area ratios for each analyte of interest.

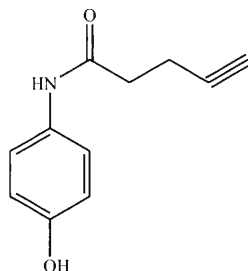


Figure 3.4. *N*-(4-hydroxyphenyl)-4-pentynamide structure

To build a targeted assay, identification of reliable product ions for each feature of interest is required. From the raw HRMS/MS untargeted data, fragment ions for each feature of interest were detected. These fragment ions were used to build lists of product ions to optimize collision energies on the QTRAP platform for increased sensitivity. For the features collisions energies were tested at 20, 30 and 40 V by injecting extracted plasma samples onto the QTRAP in LC-MRM mode and comparing peak intensities. Also, the list of features from both columns (HSS T3 and PFP) were combined to create one list for positive mode and one list for negative mode, thus retention times (for scheduled MRM method) were verified for both columns in each ionization mode.

In addition, a list of known APAP metabolites was, compiled and added to the targeted analysis, as well as including APAP itself and the internal standard (*N*-(4-Hydroxyphenyl)-4-pentynamide). The optimal conditions for the transitions of these known compounds are given in Table 3.3. This table represents, MRM transitions (precursor-product ion pairs), the optimized CE in each case and the declustering potentials (DP) that were used to alleviate signal saturation for some of the major metabolites found in plasma. Also two retention times are noted for each, considering the two chromatographic columns that were used for these measurements. A total of 47 and 29 MRM transitions were monitored in positive and negative ion modes, respectively.

The known APAP metabolites monitored in our method included glucuronide (GLUC), sulfate (SULF), cysteine (CYS), and *N*-acetyl cysteine (NAC) conjugates of APAP. Figure 3.5 illustrates structures and metabolic pathways of APAP and APAP metabolites.

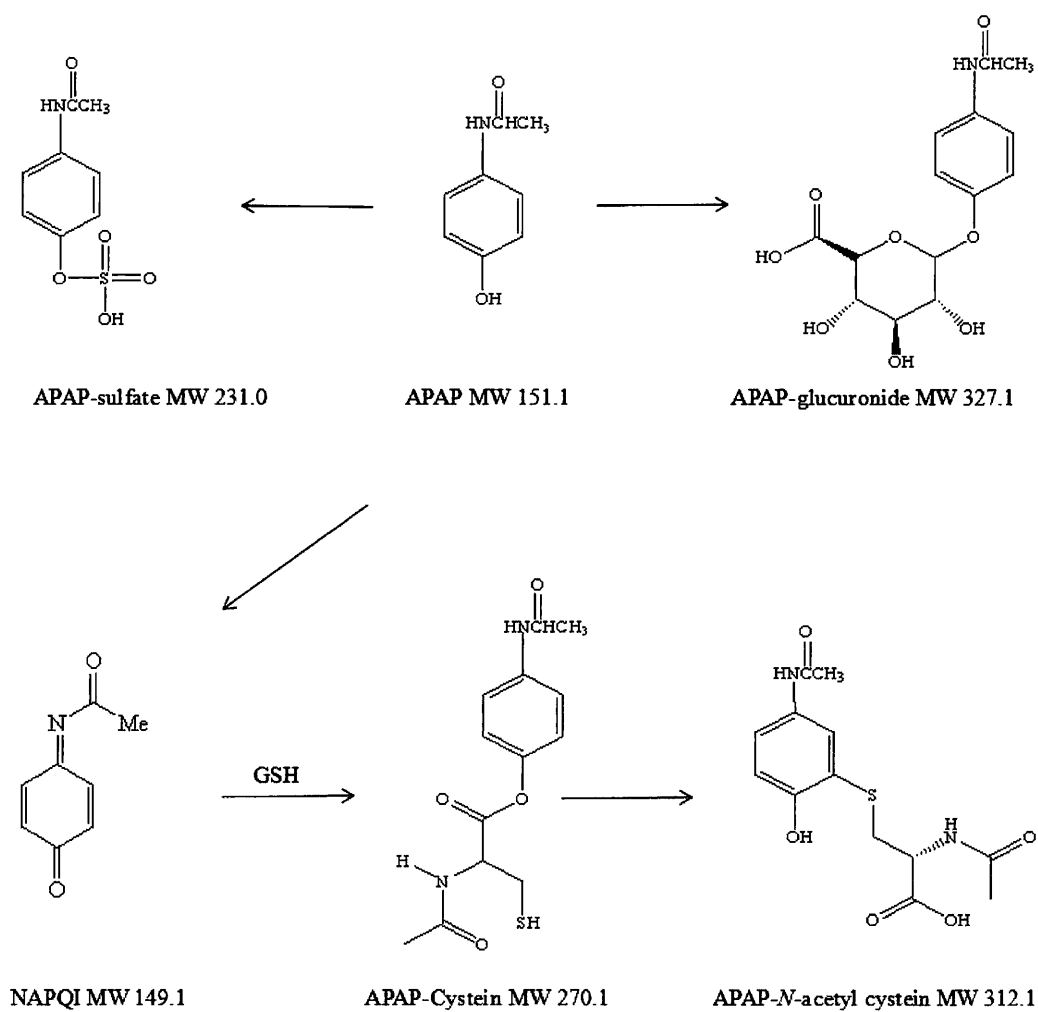


Figure 3.5. Structures and metabolic pathways of APAP and known APAP metabolites

Table 3.3. Optimized MRM parameters of known APAP-metabolites, APAP and *N*-(4-Hydroxyphenyl)-4-pentynamide

Compound (- mode)	Formula	MRM transition (<i>m/z</i>)	Opt (CE)	RT T3 HSS (min)	RT PFP (min)
APAP-CYS	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	269>182	15	4	5.2
APAP-SUL	C ₈ H ₉ NO ₅ S	230>107	35	4.2	6.9
		230>150	25		
APAP-GLUC	C ₁₄ H ₁₇ NO ₈	326>150	25	3.7	5.2
		326>107	35		
<i>N</i> -(4-hydroxyphenyl)- 4-pentynamide	C ₁₁ H ₁₁ NO ₂	188>107	28	6.6	7.9
		188>134	21		

Compound (+ mode)	Formula	MRM transition (<i>m/z</i>)	Opt (CE)	RT T3 HSS (min)	RT PFP (min)
APAP-NAC	C ₅ H ₉ NO ₃ S	313>208	30	5.6	6.7
		313>166	30		
APAP-SUL	C ₈ H ₉ NO ₅ S	232>110	30	4.2	6.9
		232>152	15		
APAP-GLUC	C ₁₄ H ₁₇ NO ₈	328>152	15	3.7	5.2
		328>110	30		
APAP-CYS	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	271>140	30	4	5.2
		271>182	15		
APAP	C ₈ H ₉ NO ₂	152>110	22	4.5	6.9
		152>65	37		
<i>N</i> -(4-hydroxyphenyl)- 4-pentynamide	C ₁₁ H ₁₁ NO ₂	190>110	25	6.6	7.9
		190>65	39		

3.4.3 Time-course and dose-response of APAP metabolites

Pharmacokinetic (PK) studies are performed to evaluate bioavailability and efficacy of medications, and can also be used to follow the evolution of metabolites of xenobiotics in the body. In this study, we sampled several time points following APAP administration to help provide insight into the mechanism of APAP-induced toxicity over time. APAP metabolites are expected to be observed in the post-dose treated samples but absent in control, while endogenous compounds could be observed in both control and dosed samples, but at potentially different levels if metabolic perturbations have occurred.

Figure 3.6 shows the PK curves for APAP and these metabolite from our data, represented as peak area ratios between the drug or metabolite to the internal standard used in our study over the 24 h period following dosing of APAP. The animal was sampled pre-dose and therefore served as its own control for presence or absence of given compounds before APAP time-course. The graphs show that each of these APAP metabolites correlate well with dosage. Also, the plasma profile patterns were similar for all known APAP metabolites at the studied timepoints. Furthermore, decreased APAP metabolites after 2h in plasma shows the liver's ability to remove acetaminophen, by these various conjugation pathways. Unfortunately, it is not possible to directly NAPQI production due to its inherent reactivity, however the NAC and cysteine conjugates are an indirect measure of NAPQI formation.

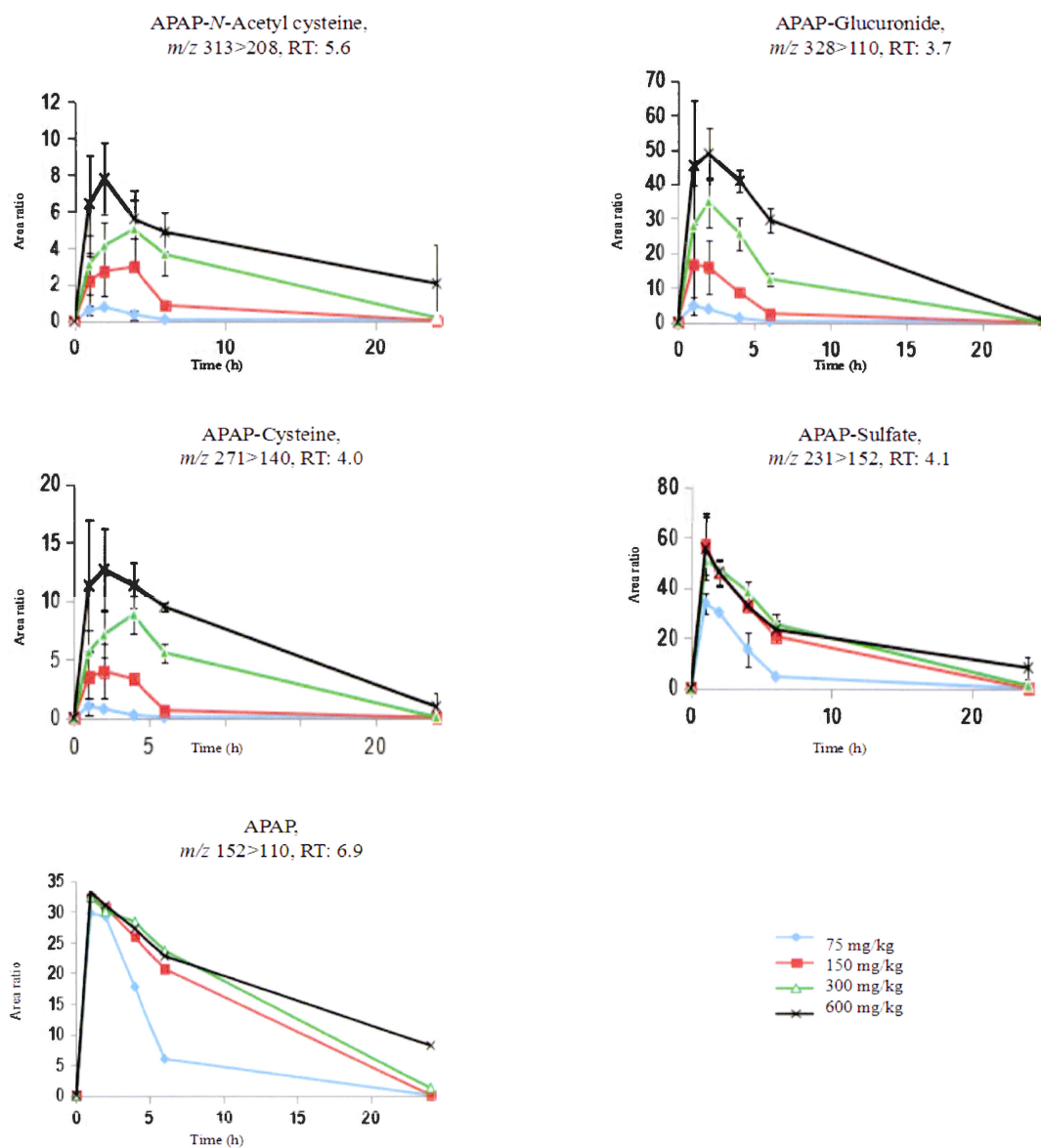


Figure 3.6. Time-course of generation of APAP and its metabolites in rat plasma from MRM data. Analyte: IS peak area ratios are plotted against time following dosing. Error bars are for $n=3$ animals in 75, 150 and 300 mg/kg animals and $n=4$ for 600 mg/kg dose.

3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) is an active sulfate donor. Sulfotransferases catalyze the transfer of $-\text{SO}_3$ from PAPS to a sulfate acceptor, including xenobiotics, drugs and endogenous molecules. Liu *et al.* showed that, saturation of acetaminophen sulfation depends on sulfate availability in rats. APAP-sulfate capacity is related to the availability of PAPS which is limited by activity of the PAPS synthetic enzyme and also presence of inorganic sulfate in rat (Liu and Klaassen 1996). After APAP overdose, sulfation is quickly saturated. In contrast, glucuronidation, which is a high capacity conjugation pathway, can be elevated significantly (Xie, *et al.* 2015). APAP-glucuronide is a substrate for multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). MRP2 protein has two ATP-binding domains and 17 transmembrane regions in its amino acid sequence (Jedlitschky, *et al.* 2006; Myint, *et al.* 2015). It uses ATP hydrolysis energy to translocate their substrates across biological membranes (Ito, *et al.* 2001; Lai, *et al.* 2007). It is also the major transporter responsible for the secretion of bilirubin glucuronides into bile. MRP2 expression level changes by glutathione concentration (Akai *et al.*, 2007). It has been reported that humans without MRP2 develop a mild liver disease.

GSH fluctuation can be a helpful sign to detect APAP toxicity. High amount of glutathione in urine may lead to less efficient utilization of glycine (glutathione precursor) in the body. Furthermore, it has been hypothesized that glycine has hepatoprotective effect in hepatotoxicity. It has been shown that several amino acids such as glycine, histidine and alanine are increased in hepatotoxicity (Vance, *et al.* 1994). In the Watkins *et al.* study, healthy adult volunteers were treated by maximum recommended daily doses of acetaminophen (4 g/day). Results showed that serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and α -glutathione-S-transferase were elevated about one in third of subjects (Watkins, *et al.* 2006).

The cysteine and mercapturic acid (NAC) conjugates are produced from glutathione-conjugated acetaminophen. APAP-GSH is excreted through bile. In the

intestine, it can be reabsorbed to form *N*-acetylcysteine conjugate but before this step, APAP-GSH can be biotransformed to APAP-cysteine (Hjelle & Klaassen, 1984; Siegers, Rozman, & Klaassen, 1983). So lack of an increase in the GSH and NAC conjugates in plasma can be observed after acetaminophen consumption (Kim, Lee, Kwon, Kim, & Kim, 2009). Thus, levels of cysteine and NAC conjugates of acetaminophen correlate with the formation of APAP's reactive metabolite and toxic intermediate (NAPQI). APAP-CYS is a specific biomarker of acetaminophen exposure. In Heard *et al.*, APAP-CYS concentrations in patient serum with hepatic injury due to overdose were significantly higher than those treated by therapeutic doses of acetaminophen (Heard, *et al.* 2011).

-acetylcysteine, the clinically used antidote for APAP poisoning, decreases hepatotoxicity by increasing inorganic sulfate levels and also by increasing cysteine availability to produce glutathione (Hjelle, *et al.* 1986). It can also directly trap excess NAPQI *in vivo* (Bessemers and Vermeulen 2001; Commandeur, *et al.* 1995). Animal models have been used frequently in many metabolomic studies especially in the field of xenobiotic toxicology. Although, monitoring changes in rodents can be quite simple, detection of potentially subtle perturbations in the human metabolome is much more challenging due to the variability inherent between people. Genetics and lifestyle, including diet, environment and activity, could alter the metabolome yielding many more changing metabolite signals than we would get for rodent models where these factors can be better controlled.

3.5 Conclusions

An original LC-HRMS/MS method has been optimized and developed for profiling of metabolites perturbed by APAP dosing in rat. Many features have been found to have interesting profiles, including increasing and decreasing with dose, as

well as discriminating between endogenous metabolites and (present in pre-dose controls) APAP-related metabolites. Using an optimized MRM method, time course profiles of known APAP metabolites including glucuronide, sulfate, cysteine, and *N*-acetyl cysteine conjugated were created. The graphs illustrated that APAP metabolites correlate well with dosage. In addition, a list of interesting potential metabolites was obtained from the untargeted metabolomic analysis using LC-HRMS analysis. Time-course samples were then analysed using LC-MRM technique to help confirm these metabolic perturbations associated to APAP dosing. These metabolic signatures remain at a point where further structural confirmation would be necessary, by detailed MS/MS analysis for spectral matching from metabolomics databases as well as retention time matching with synthetic standards. Direct APAP metabolites were also monitored to better understand the pharmacokinetic basis of APAP metabolism at different doses. Acetaminophen safety could potentially be evaluated by quantifying metabolic profiles. More work on correlating metabolite levels with hepatotoxicity is therefore warranted. Once the unknown endogenous metabolites found in this study are fully elucidated and specific biological pathways are implicated, these results could be used to open doors to new therapeutic or protective approaches against toxicity.

CHAPITRE IV

PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

4.1 Perspectives et conclusions

Le métabolisme de l'APAP conduit à la production du composé toxique NAPQI. Il diminue alors simultanément le GSH et modifie de façon covalente les protéines. Le NAPQI est connu depuis longtemps; il est normalement produit en petites quantités et presque immédiatement détoxifié dans le foie. Cependant, dans certaines conditions où le NAPQI n'est pas efficacement détoxifié (habituellement en surdose de paracétamol), il provoque de graves dommages au foie qui deviennent apparents trois à quatre jours après l'ingestion et peuvent entraîner la mort. Le pronostic est bon concernant les surdoses de paracétamol si un antidote est administré jusqu'à huit heures après la prise du médicament. Sans administration précoce de l'antidote, une insuffisance hépatique agressive survient, souvent en association avec une insuffisance rénale, et la mort se produit généralement en quelques jours. L'antidote de prédilection pour l'empoisonnement au NAPQI est la *N*-acétylcystéine (Abiko, *et al.* 2015; Huang 2017; Ilavenil, *et al.* 2016).

En utilisant une stratégie de protéomique, nous avons été en mesure d'identifier de nombreuses cibles protéiques *in vivo* du métabolite réactif de l'acétaminophène chez le rat et la souris. Nous avons comparé les stratégies analytiques d'une méthode 2D-LC-MS/MS, en utilisant le fractionnement SCX avant la séparation en phase inverse avec la détection de MS en tandem et une méthode 1D (sans fractionnement) avec un gradient de phase inverse beaucoup plus long. La plupart des protéines cibles identifiées permettront de mieux comprendre la réactivité du NAPQI *in vivo* et pourraient nous orienter vers certaines cibles d'intérêt spécifiques pour le lien hépatotoxique à l'acétaminophène.

Une stratégie de métabolomique a été appliquée pour étudier les changements dans les niveaux de métabolites (endogènes et exogènes) dus à l'administration de l'APAP chez le rat. Nous avons étudié quatre doses d'acétaminophène et un traitement de 24 heures pour mettre en évidence ces changements. Nous avons d'abord utilisé une méthode non-ciblée par LC-HRMS sur les échantillons de 24 heures afin de

déterminer les caractéristiques des métabolites qui n'étaient pas communs dans les groupes de dosage. Ensuite, nous avons appliqué une méthode ciblée à l'aide de LC-MRM sur des fonctionnalités qui se sont avérées modifiées à partir de la liste de métabolites provenant de l'analyse non-ciblée ainsi que des métabolites APAP connus. Cette analyse ciblée a été utilisée pour examiner spécifiquement les effets temporels (0-24h, six points temporels) suite à l'administration, ainsi que les différents niveaux de dosage.

Voici quelques perspectives pour la continuité de ce projet :

4.1.1 Optimisations de techniques analytiques

Puisque les métabolites ont une grande gamme de propriétés physicochimiques, les méthodes RP-LC utilisées pour l'étude métabolomique ont démontré des problèmes de détection de métabolites très polaires; l'utilisation de la chromatographie par interactions hydrophiles (HILIC) ou par échange ionique pourraient remédier à la situation (Contrepolis, *et al.* 2015; Yin, *et al.* 2009).

Dû à leur taille et leur hétérogénéité, causée notamment par les modifications post-traductionnelles, l'identification des protéines représente un défi. L'intégration de combinaisons LC orthogonales à la séparation par RP-LC-MS telles que le fractionnement par HILIC, par phase inverse (à pH basique), par une combinaison HILIC-SCX ou RP(base)-SCX pourrait rendre la séparation des peptides plus efficace (Boersema, *et al.* 2008).

L'utilisation du MS/MS avec la technique IDA a rencontré des limites quant à l'accessibilité des spectres MS/MS de tous les peptides ou des métabolites d'intérêts dans les deux études décrites dans ce mémoire. Il y a la possibilité d'appliquer la technique d'acquisition indépendante de données (DIA ou SWATH) afin d'acquérir les spectres MS/MS des précurseurs. Même si les données obtenues en DIA peuvent avoir une meilleure sensibilité et reproductibilité qu'en DDA, il requiert souvent des

gradients de LC plus longs; il augmente le temps de cycle du MS, réduisant le rythme d'obtention des résultats. Toutefois, la méthode DIA-MS reste, d'un point de vue théorique, un aspect intéressant à envisager pour analyser nos échantillons (Gross 2006).

4.1.2 Autres études futures

Les métabolites réactifs sont électrophiles et peuvent former des liens covalents avec des macromolécules telles que les protéines, l'ARN et l'ADN et ainsi altérer leur fonction et possiblement devenir toxiques. La modification de la méthode de manière à analyser des modifications covalentes sur l'ADN ou l'ARN serait à envisager pour des analyses futures (Nelson, 1995; Park *et al.*, 2011b). En général, cela va dépendre de la structure du métabolite réactif, mais quelques tests pourraient être faits avec le NAPQI afin de voir si ce serait possible.

Souvent associées avec la toxicité hépatique, hématopoïétique et cutanée, les réactions indésirables d'hypersensibilité par les médicaments sont grandement causées par les métabolites électrophiles. L'identification des adduits de protéines-électrophiles provenant de xénobiotiques tels que le tamoxifène, l'isoniazide et l'amodiaquine, entre autres, pourrait être effectuée dans le futur en utilisant la même méthode qui a été utilisée pour l'acétaminophène.

Afin de confirmer les cibles identifiées de l'APAP, des standards de peptides synthétiques seront achetés afin d'incuber avec l'APAP *in vitro* et avec les microsomes de rat et souris (pour former le NAPQI). Les échantillons seront ensuite analysés par la même méthode LC-MS/MS.

Pour la continuité du travail sur la métabolomique de cette thèse, il y aura identification des structures de métabolites inconnus à l'aide de standards chimiques et d'une base de données. Il y aura également groupement des métabolites connus et inconnus selon leur profil dose-temps.

Les acides biliaires, tels que l'acide cholique, chénodéoxycholique et lithocholique, sont synthétisés à partir du cholestérol par les cytochromes P450 dans le foie et sont intéressants en termes de biomarqueurs d'hépatotoxicité. Ils contrôlent la prolifération cellulaire et l'inflammation; toutefois, leur accumulation dans l'organisme due à une surdose médicamenteuse peut causer l'apoptose et la nécrose, tous deux résultants en la mort cellulaire (Bhushan, *et al.* 2013; Hofmann 1999; Palmer 1972). Plusieurs ressemblances entre le comportement des métabolites étudiés en MS/MS en métabolomique dans ce mémoire et les acides biliaires peuvent être trouvées. Une étude parallèle dans notre groupe consiste à développer un essai ciblé sur une liste d'acides biliaires connus et leurs conjugués par spectrométrie de masse. Ainsi, l'analyse ciblée d'acides biliaires en métabolomique avec une méthode LC-MRM est l'un des buts futurs de cette étude, afin de trouver des biomarqueurs plasmatiques fournissant de l'information sur les mécanismes liés à la surdose par APAP.

L'identification *in vivo* de protéines modifiées par des métabolites réactifs dans d'autres tissus pourrait nous éclaircir sur comment ce métabolite peut causer une réponse immunitaire; par exemple, si la plupart des liens covalents se trouvent dans les cellules de Kupffer (macrophages stellaires), il y aurait des chances que leur activation joue un rôle dans la réponse immunitaire. Au contraire, si la plupart des liens covalents se trouvent dans les hépatocytes, il y aurait des chances que ce soit le métabolite réactif qui nuit aux hépatocytes (Ju and Uetrecht 2002; Mudge, *et al.* 1978; Stephens, *et al.* 2014).

Même si les données obtenues sont un grand pas en avant pour l'étude de l'APAP et les protéines modifiées ainsi que les métabolites perturbés, plus de travail est nécessaire pour identifier ces métabolites et d'autres protéines modifiées ainsi que leur rôle biologique chez l'humain et l'effet du NAPQI.

4.2 Conclusions

La LC-HR-MS/MS est la technique analytique clé pour les études *omiques*, comme la protéomique, métabolomique et lipidomique. Elle peut être utilisée comme analyse globale (non-ciblée) ou ciblée et peut fournir informations qualitatives et quantitatives sur les analytes (Dettmer, *et al.* 2007; Griffiths and Wang 2009). L'APAP est un médicament très répandu et l'hépatotoxicité qu'il cause par surdose est un problème majeur clinique (Bateman 2016). Un des premiers buts de ce travail était l'optimisation de méthodes LC-HR-MS/MS afin d'étudier des protéines modifiées par les métabolites réactifs de l'acétaminophène dans des échantillons de foie de rats et de souris. La spectrométrie de masse est très utilisée pour l'analyse des protéines, suite au développement du ESI, rendant possible l'ionisation de protéines et peptides larges (Griffiths and Wang 2009). La bioactivation est l'événement critique initial dans son mécanisme d'action, et par la suite, la liaison aux protéines. Par conséquent, l'identification et la caractérisation des protéines cibles ayant été modifiées par le NAPQI par spectrométrie de masse a été notre but pour l'étude protéomique de ce mémoire. Les données en MS/MS ont été acquises par IDA (figure 4.1).

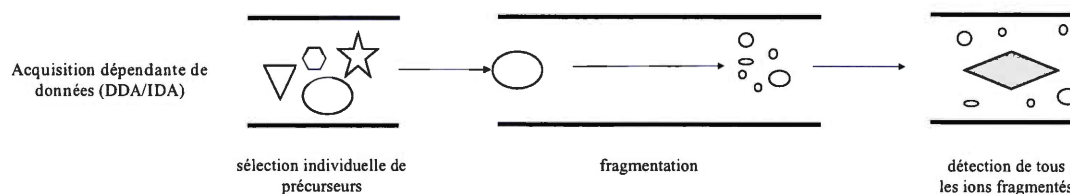


Figure 4.1. Schéma de la séparation, fragmentation et analyse des peptides/métabolites par spectrométrie de masse utilisant le mode d'acquisition dépendante de données (IDA)

Bien qu'IDA soit une très bonne technique en spectrométrie de masse, elle présente toutefois certaines limites; une portion des ions précurseurs n'est pas sélectionnée pour le MS/MS, dû à leur faible intensité de signal. De l'information sur les peptides moins abondants peut également être perdue dans ce type d'analyse (Gross 2006).

L'un des éléments principaux de cette étude était le traitement des données. Le logiciel Protein Pilot a fourni des réponses incorrectes et potentielles générées en randomisant ou en inversant des séquences vraies, surtout dans cette étude, où il a essayé de trouver des modifications de cystéine (Shin, *et al.* 2007a; Tang, *et al.* 2008). Les fausses protéines d'identification proviennent généralement d'appariements spectraux faibles de peptides de confiance en raison d'une masse de précurseur inexacte et de spectres MS/MS de faible qualité (Katajamaa and Orešič 2007; Shin, *et al.* 2007b).

Dans la partie protéomique de cette étude, certaines protéines ont été identifiées comme étant modifiées par NAPQI et ont toutes été détectées à partir de la digestion par la trypsine, excepté pour la superoxyde dismutase (SOD). Deux protéines ont été retrouvées dans les deux espèces de rongeurs, soit l'anhydrase carbonique 3 et la triose-phosphate isomérase, ce qui est intéressant. Les résultats ont également démontré que la liaison APAP-protéine peut se former même après des doses subtoxiques, sans que le GSH soit complètement épuisé. Il est possible qu'un seuil de liaison aux protéines soit atteint avant qu'il y ait toxicité, ou bien que les cibles de liaison soient épargnées lorsqu'il y a faible dose. Sachant que toutes les protéines identifiées se trouvent dans les voies biologiques importantes pour la survie cellulaire pendant le stress oxydatif, on peut les lier à l'hépatotoxicité de l'APAP.

Les séparations à long gradient avec MS/MS ont démontré une grande couverture protéomique, et sont donc efficaces pour la protéomique globale.

D'ailleurs, d'autres progrès ont été réalisés en utilisant de longues séries de LC-MS/MS pour optimiser la méthode MS ou pour identifier des protéines modifiées après la prise d'APAP, sans étape de fractionnement. Les échantillons sélectionnés par Protein Pilot (avec le plus grand nombre de «*hits*») liés à la LC-HRMS/MS conventionnelle ont été injectés dans le gradient de 3,5h en LC-MS/MS. Également, plusieurs échantillons fractionnés ont été injectés pour voir s'il y avait présence de protéines communes avec une méthode antérieure ou pas.

Après l'analyse de données, plusieurs peptides modifiés provenant de l'APAP ont été retrouvés dans des échantillons traités, mais pas dans les témoins lors de la longue LC-MS/MS. Fait intéressant, certaines protéines identifiées en longue LC-MS/MS, dont l'homologue des protéines ES1, 5-hydroxyisourate hydrolase et des protéines de liaison aux acides gras, étaient communes avec celles identifiées par la méthode précédente; ces protéines sont donc liées aux échantillons fractionnés. Donc, les deux techniques de LC-MS/MS et celle de LC-HRMS/MS conventionnelle présentent des avantages et des inconvénients. Plusieurs protéines ont été retirées en méthode de fractionnement, étant ainsi moins détectables en gradient long. Parfois, certaines d'entre elles ont pu être identifiées par un gradient long sans passer par la méthode de fractionnement. En général, la technique LC-MS/MS en gradient long peut simplifier le flux de travail de protéomique ascendante, diminuer l'exigence de taille précise de l'échantillon et réduire le temps d'analyse total par rapport aux fractionnements multidimensionnels conventionnels LC-HRMS/MS.

Dans le troisième chapitre, une méthode métabolomique globale a été utilisée afin de mieux caractériser les perturbations métaboliques produites par le dosage de l'acétaminophène dans les échantillons de plasma de rat. Alors que la toxicité de l'APAP est bien connue, l'utilisation de la métabolomique pour identifier les biomarqueurs de petites molécules toxique de l'APAP est bien récente. Quatre doses d'acétaminophène (75, 150, 300 mg/kg ($n = 3$) et 600 mg/kg ($n = 4$)) ont été administrées à des rats. Les métabolites ont été extraits par précipitation dans le

méthanol, puis injectés dans un système Nexera UHPLC-AB Sciex 5600 TripleTOF™. Les échantillons ont été séparés sur les colonnes ACQUITY UPLC® HSS T3 Waters (100 × 2,1 mm, 1,8 µm) et Luna® PFP Phenomenex (150 × 2,0 mm, taille de particule 2,6 µm), dans les modes positif et négatif. Les données brutes de haute résolution MS venant de l'analyse non-ciblée de métabolites ont été filtrées dans une liste de fonctionnalités voulues (m/z , paires de temps de rétention (RT)), suite à la suppression d'un grand nombre d'ions indésirables par l'utilisation de plusieurs logiciels, tels que MarkerView, PeakView et MultiQuant. Les critères comprenaient un $p < 0,01$ et un $|\text{fold change}| > 2$ pour la comparaison des doses les plus faibles et les plus élevées d'acétaminophène. L'analyse en composantes principales (PCA) a ensuite été effectuée pour visualiser les caractéristiques filtrées des groupes témoins et dosés. Ainsi, les échantillons traités similaires sont près les uns des autres, alors que les échantillons différents seront plus éloignés. Chaque dose est faiblement groupée dans une région particulière, mais une corrélation dose/réponse a été observée chez la dose la plus élevée, soit de 600 mg/kg (en mode +/-). Ainsi, l'hypothèse que des différences métaboliques considérables aient été apportées dans ce groupe dues à la toxicité de l'APAP a été émise.

La méthode MRM a ensuite été optimisée selon les transitions, les énergies de collisions et les potentiels de fragmentation d'amas (DP). Les échantillons de différents temps (0, 1, 2, 4, 6 et 24h) ont été analysés avec une sensibilité particulière pour les métabolites d'intérêt, de manière à mieux cerner les profils pharmacocinétiques qui sont associés aux perturbations métaboliques en utilisant une plate-forme 5500 QTRAP®. Les listes des fonctionnalités des colonnes HSS T3 et PFP ont été combinées afin d'obtenir une liste pour le mode positif et une autre pour le mode négatif; les temps de rétention ont alors été vérifiés pour les deux colonnes dans chaque mode d'ionisation.

En utilisant la méthode optimisée de MRM ciblée, des profils de métabolites connus de l'APAP tels que le glucuronide, le sulfate, la cystéine et la *N*-

acétylcystéine ont été créés. Les graphiques ont montré une corrélation entre les métabolites et le dosage d'APAP. Fait intéressant, les patrons cinétiques du profil plasmatique étaient similaires pour tous les métabolites connus de l'APAP aux différents points dans le temps étudiés. Par conséquent, la diminution des métabolites de l'APAP après 2h dans le plasma montre la capacité du foie à éliminer l'acétaminophène en utilisant plusieurs voies métaboliques. L'objectif de cette partie de ma thèse était de développer un dosage métabolomique basé sur le LC/MS-MS à haut débit pour observer rapidement le profil des métabolites d'acétaminophène dans les échantillons de plasma de rat. Plusieurs caractéristiques avec des profils intéressants ont été trouvées, y compris l'augmentation ou la diminution du niveau de dosage ainsi que la discrimination entre les métabolites endogènes liés à l'APAP.

La protéomique et la métabolomique sont deux approches *omiques* bien établies, où la découverte et la quantification des biomarqueurs y sont les applications principales; elles sont souvent utilisées pour identifier les perturbations dans les voies métaboliques et les protéines sensibles au stress. Comme décrit précédemment, la protéomique est l'étude de protéines à grande échelle dans un organisme. En plus d'être un bon outil pour décrire des protéomes complets au niveau des cellules, organes ou tissus, elle peut également comparer les protéomes dans différentes conditions de stress, telles que celles résultant de l'exposition à des médicaments bioréactifs. La métabolomique se concentre sur un profil global des métabolites de faible poids moléculaire (<1000 Da), qui sont des produits du métabolisme dans les biofluides, tissus et même dans l'organisme entier. L'identification des métabolites endogènes peut alors fournir l'information de l'état métabolique dans des échantillons de plasma de rat afin d'observer les réponses biologiques induites par des facteurs exogènes. De toute évidence, une combinaison de la protéomique et de la métabolomique pourrait potentiellement leur permettre de se compléter mutuellement. Dans cette étude, l'intégration de ces deux techniques comme approche complémentaire à la MS a permis d'évaluer une grande gamme de

métabolites et de protéines modifiées comme nouveaux biomarqueurs de l'exposition à l'APAP et de sa toxicité. Cette étude peut également ouvrir la porte à de futures recherches multidisciplinaires par de nouvelles approches thérapeutiques ou protectrices contre la toxicité.

APPENDIX A

LIST OF MODIFIED PROTEINS BY APAP FROM TPDB

(<http://targetprotein.res.ku.edu>)

Protein from human blood	Method*
Serum albumin	1-2
Protein from mouse liver	Method*
Aldehyde dehydrogenase	1-3
Amine <i>N</i> -methyltransferase	1-3
Antioxidant protein 1	1-3
ATP synthase alpha-chain mitochondrial	1-3
Betaine-homocysteine <i>S</i> -methyltransferase 1	1-2
Calregulin	4-5
Carbamoyl-phosphate synthase	4-5
Carbonic anhydrase 3	1-3
Cytochrome P450 2C6	1-2
Cytosolic inhibitor of Nrf2	1-2
<i>D</i> -beta-hydroxybutyrate dehydrogenase mitochondrial	1-2
Delayed early response protein 6	5
4-Dienoyl-CoA reductase mitochondrial	1-3
Dimethylaniline monooxygenase	1-2
Eukaryotic initiation factor 4A-I	1-3
10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase	4-3
Glutathione peroxidase	1-3
Glutamate dehydrogenase 1	4-5
Glutamate-ammonia ligase	4-3
Glutathione <i>S</i> -transferase Mu 1	1-2
Glutathione <i>S</i> -transferase P 1	1-3
Glutathione transferases	3
Glutathione <i>S</i> -transferase 1	1-2
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5
Glycine <i>N</i> -methyltransferase	1-3
Heat shock protein 90 kDa beta member 1	1-3
Hemoglobin beta-1 chain	1-
3-Hydroxyanthranilic acid dioxygenase	1-3
Macrophage 23 kDa stress protein	1-3
9Methionine adenosyltransferase 1	1-3
Methyltransferase-like protein 7B	1-2
58 kDa Microsomal protein	4-3
Mus musculus cDNA clone	1-3
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	1-2
Proteasome subunit alpha type	1-3
Pyrophosphate phospho-hydrolase	1-3
Selenium-binding protein 2	4-3
56 kDa Selenium-binding protein	1-3
Sorbitol dehydrogenase	1-3
Thyroid hormone binding protein	4-3
Tropomyosin 3	1-3
Tyrosine-ester sulfotransferase	1-3
URate oxidase	1-3

1. Peptide Mass Mapping by LC-MS/MS, 2. Immunoprecipitation (IP), 3. 2D Electrophoresis, 4. Western blotting, 5. 1D Electrophoresis

APPENDIX B

REPRESENTATIVE LC-RP-MS/MS DATA FROM APAP-MODIFIED PEPTIDES IDENTIFIED IN RAT AND MOUSE LIVER

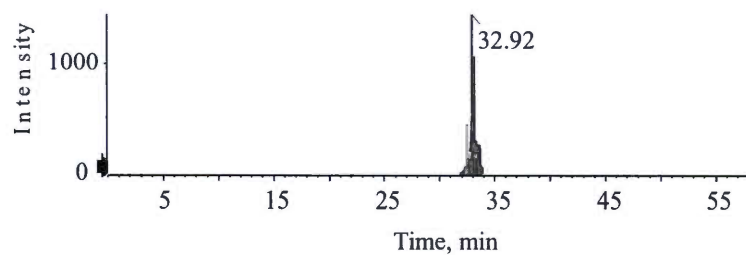
(MS AND MS/MS SPECTRA FROM APAP-MODIFIED PEPTIDES USING
UNTARGETED 2D-LC-MS/MS STRATEGY AND TARGET 1D-LC-MS/MS
APPROACH WITH AN EXTENDED LC GRADIENT)

Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
EAPFNHFDPSCLFPACR	CAH3 (RAT)	3+	719.6487	6.6	32.8

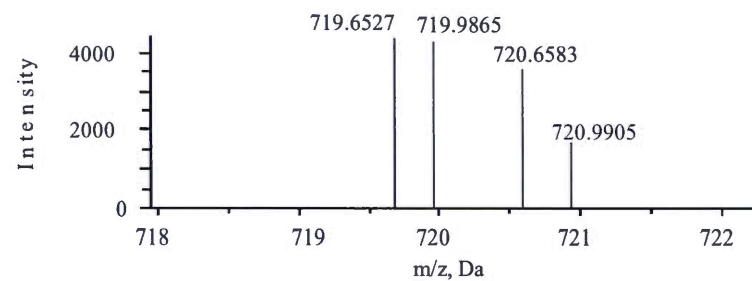
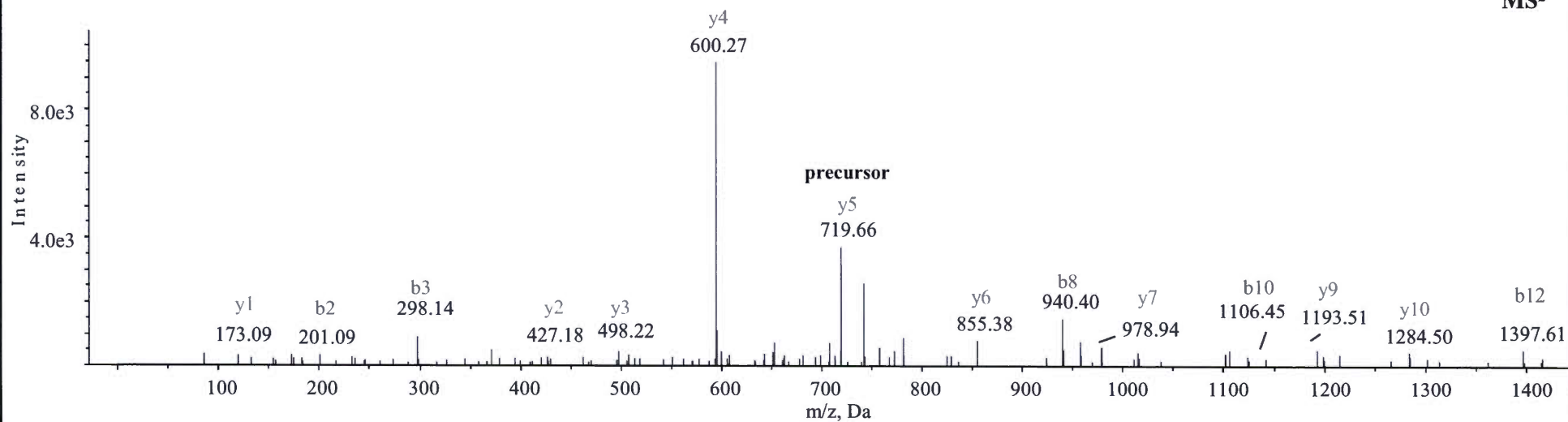
● APAP treated sample (600 mg/kg, 24 h, fr 11)

● Control

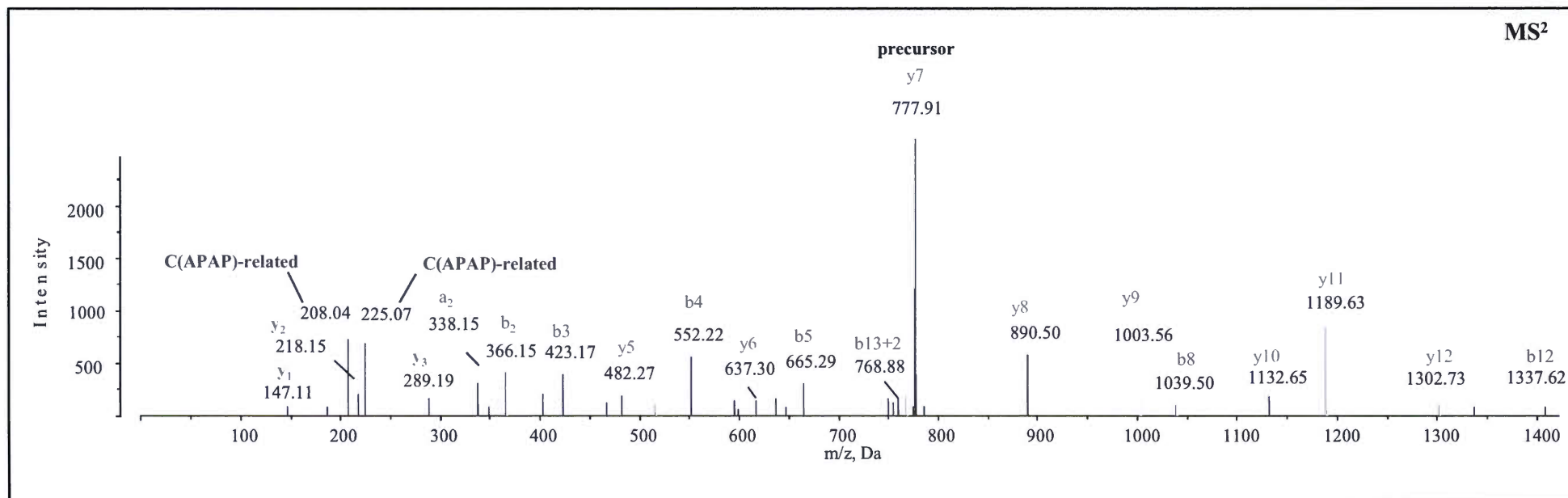
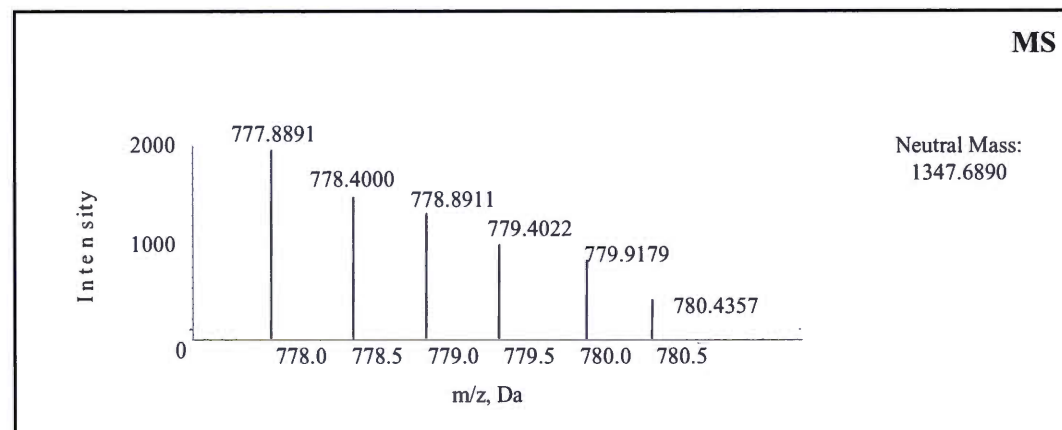
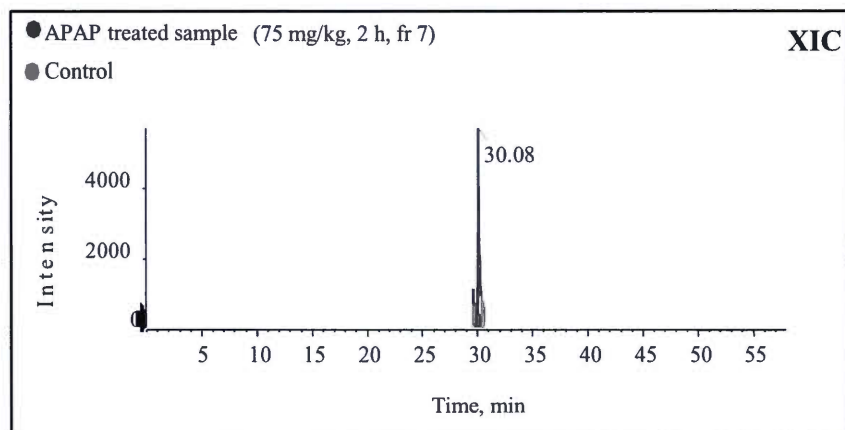
XIC



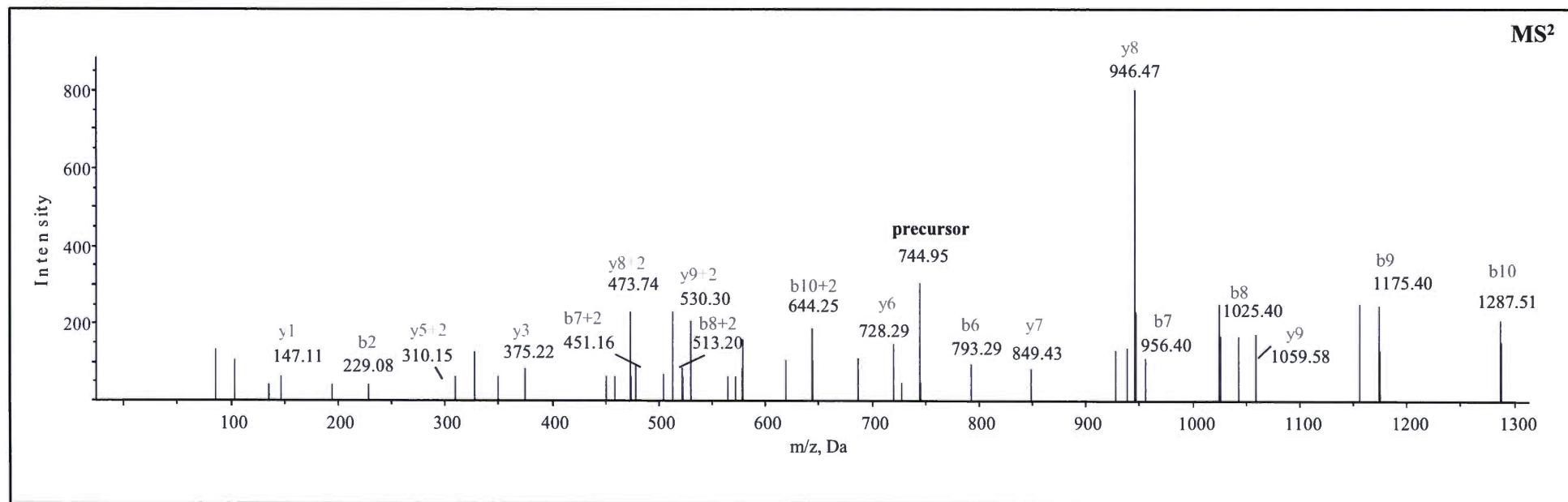
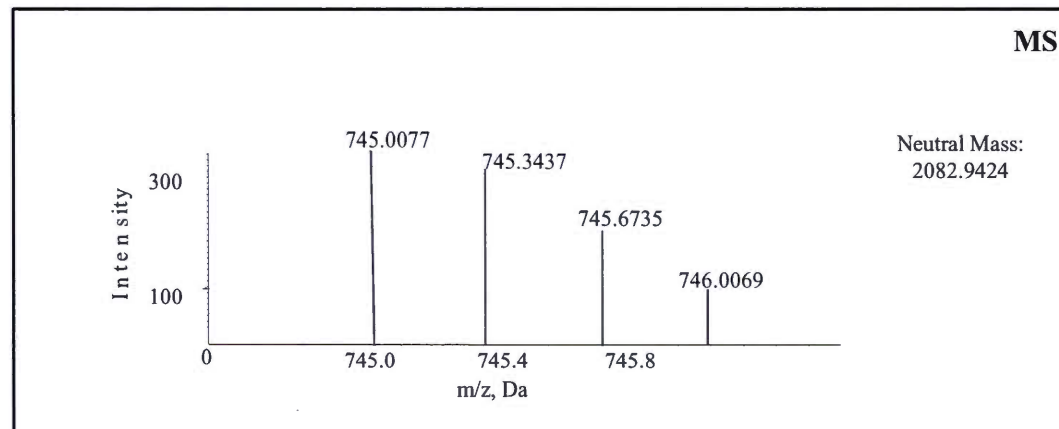
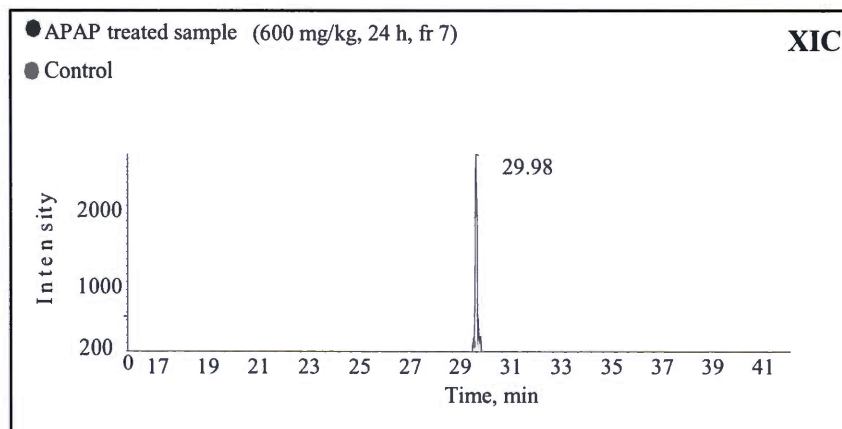
MS

MS²

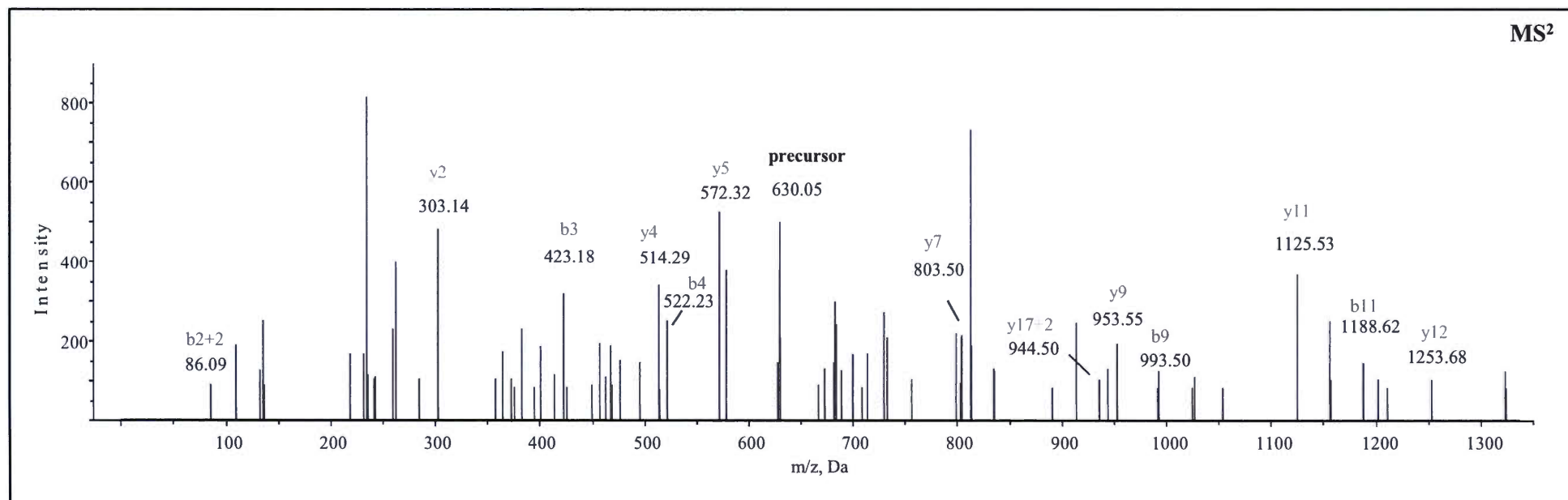
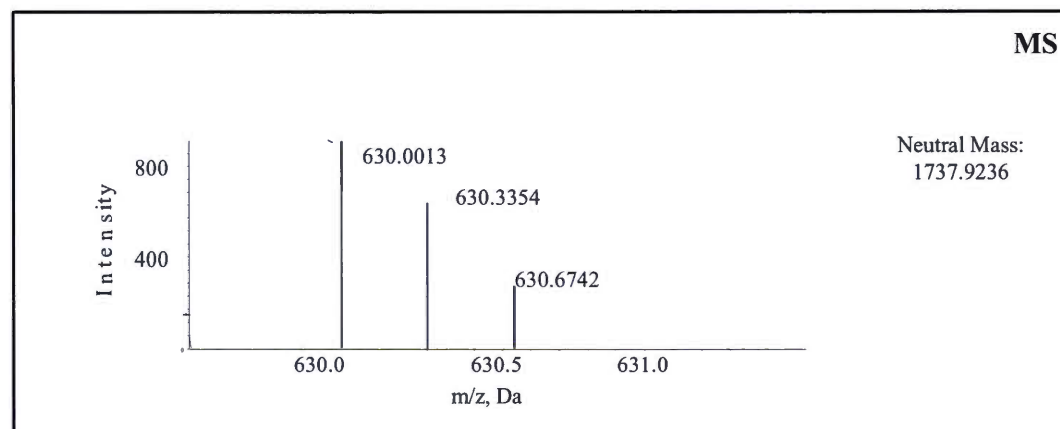
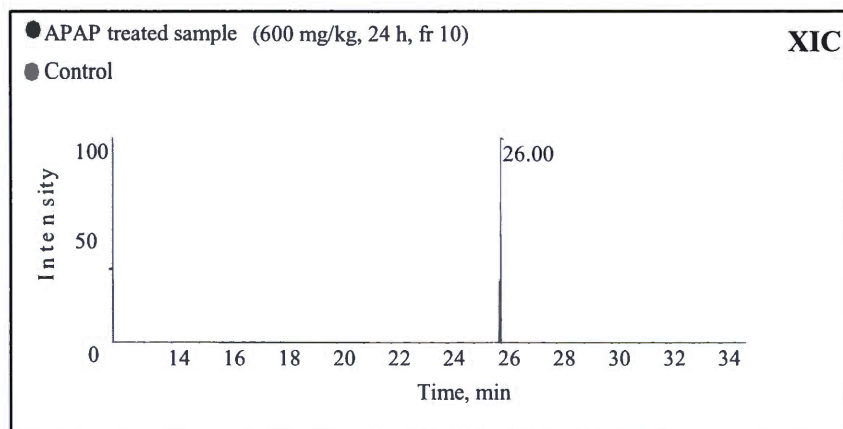
Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
CLGELICTLNAAK	TPIS (RAT)	2+	777.8864	1.5	30.1



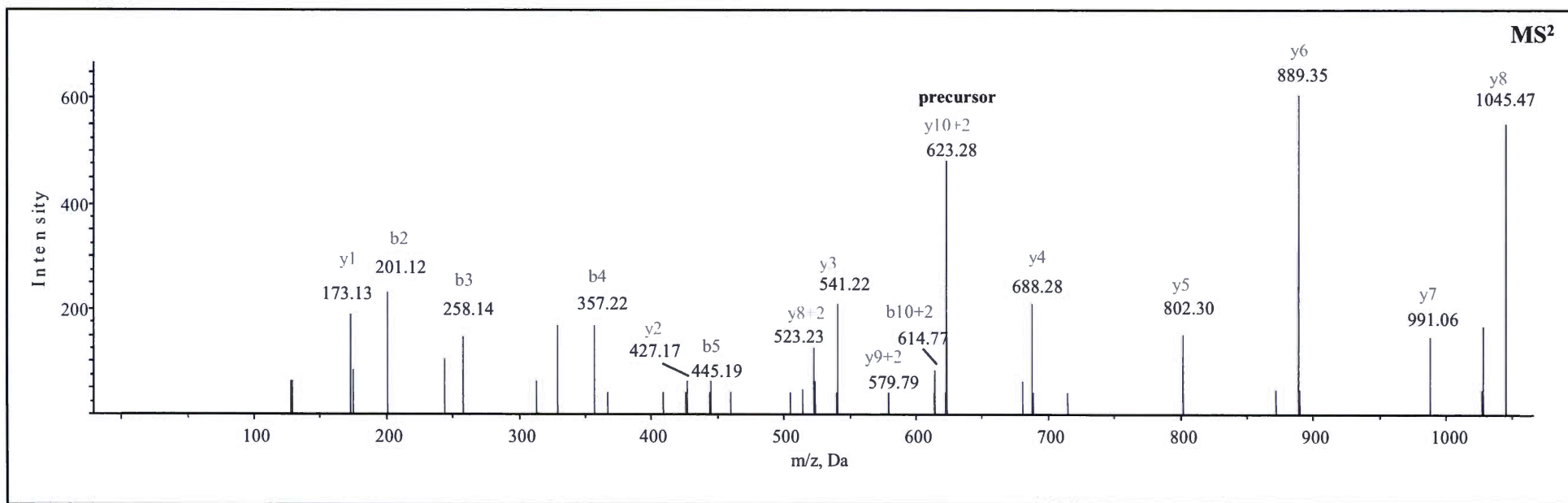
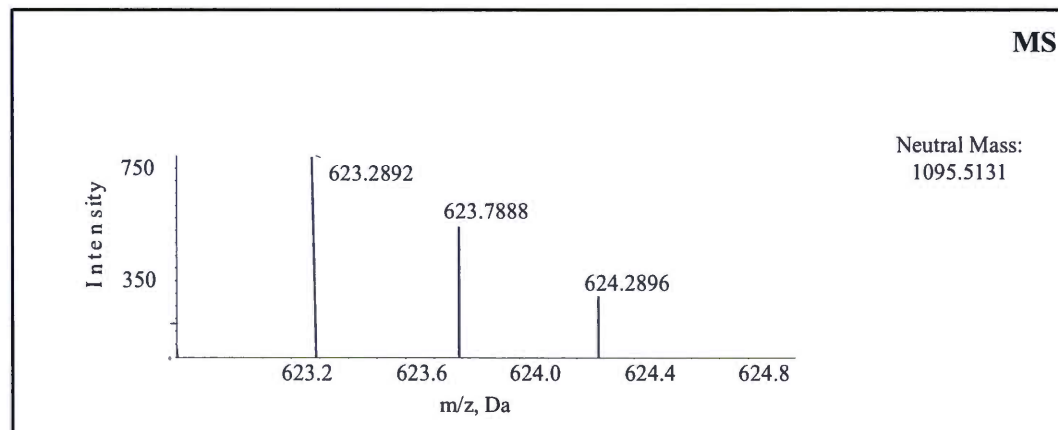
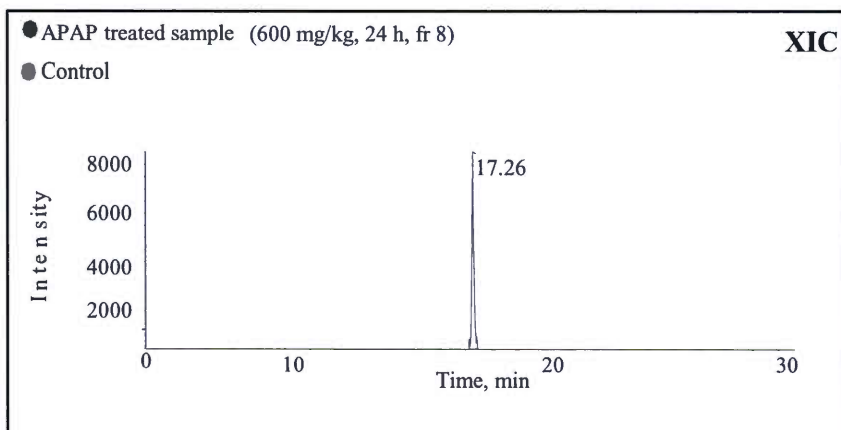
Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
NNPCTNYSMLPETMIDLK	ST1E3 (RAT)	3+	745.004	5.2	30.0



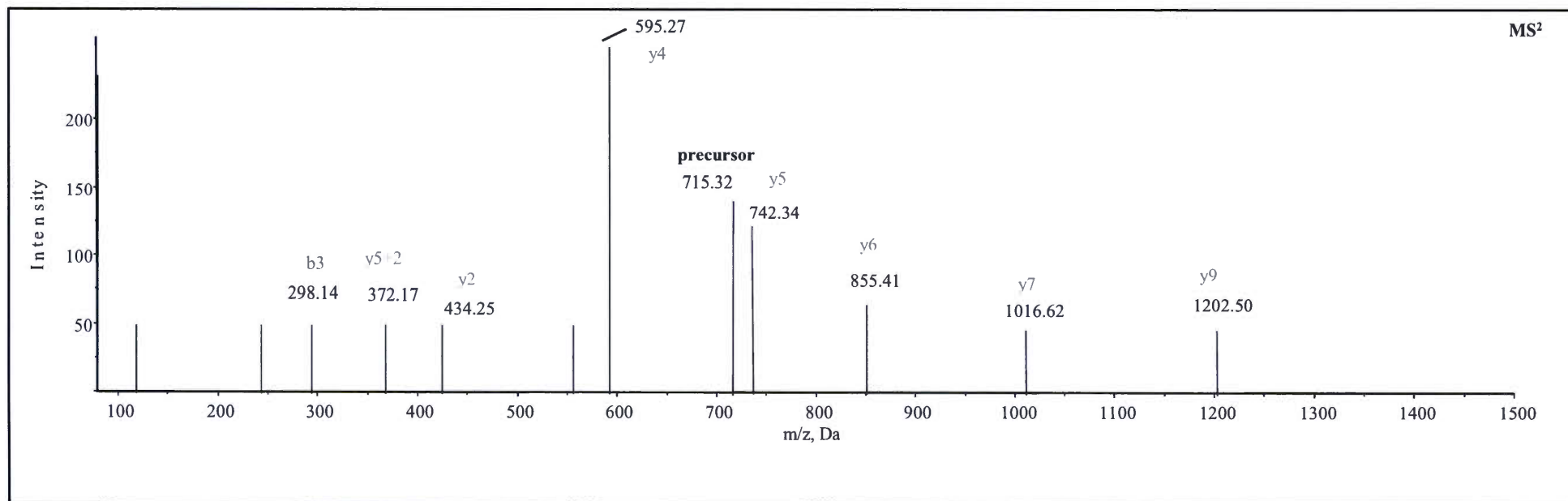
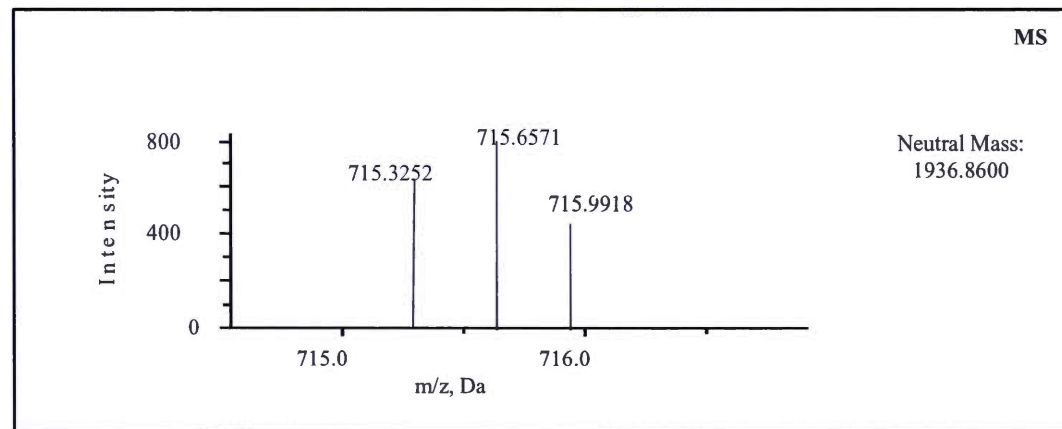
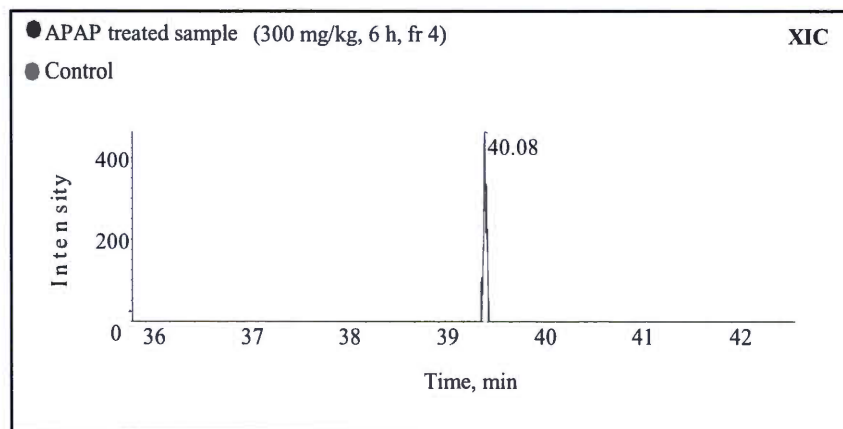
Sequence	Protein	<i>z</i>	<i>m/z</i> (theo)	ppm	RT (min)
AVCVLKGDGPVQGVHIF	SODC (RAT)	3+	629.998	9.6	26.1



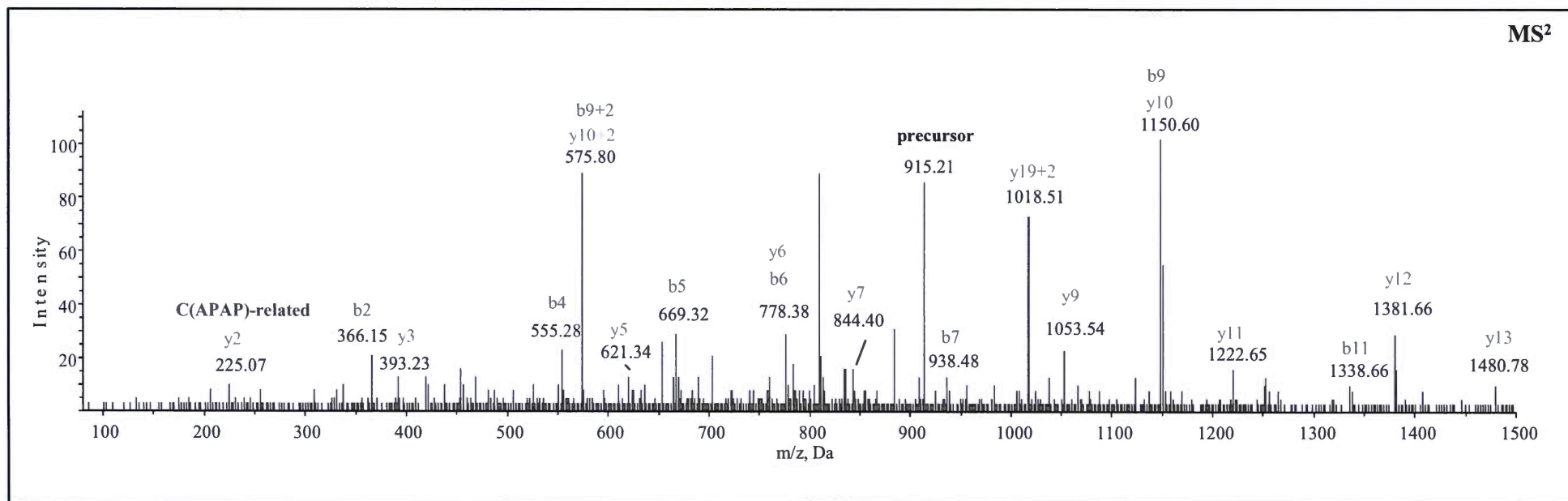
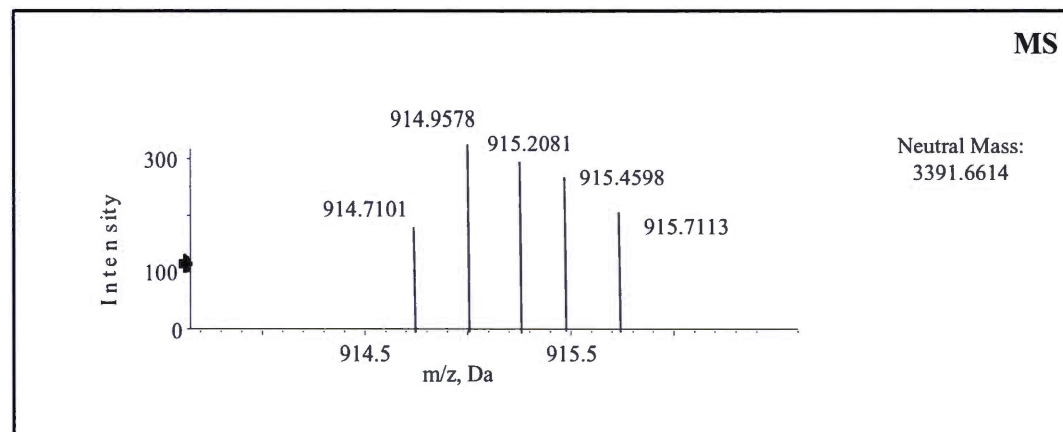
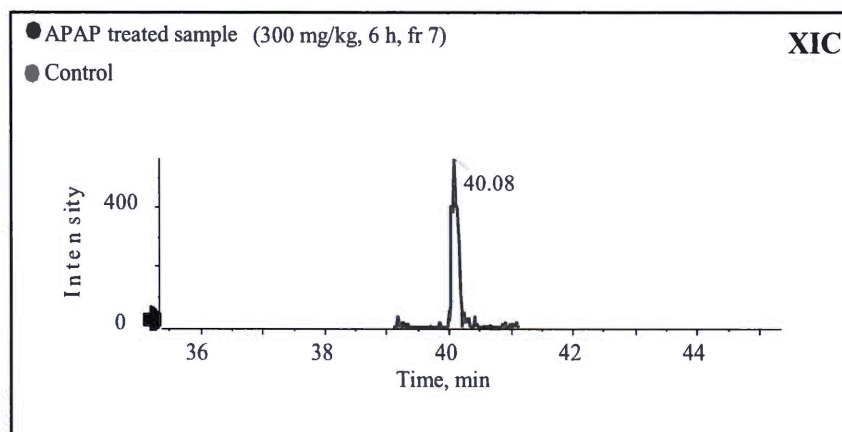
Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
SIGVSNFNCR	DIDH (RAT)	2+	623.288	0.9	17.3



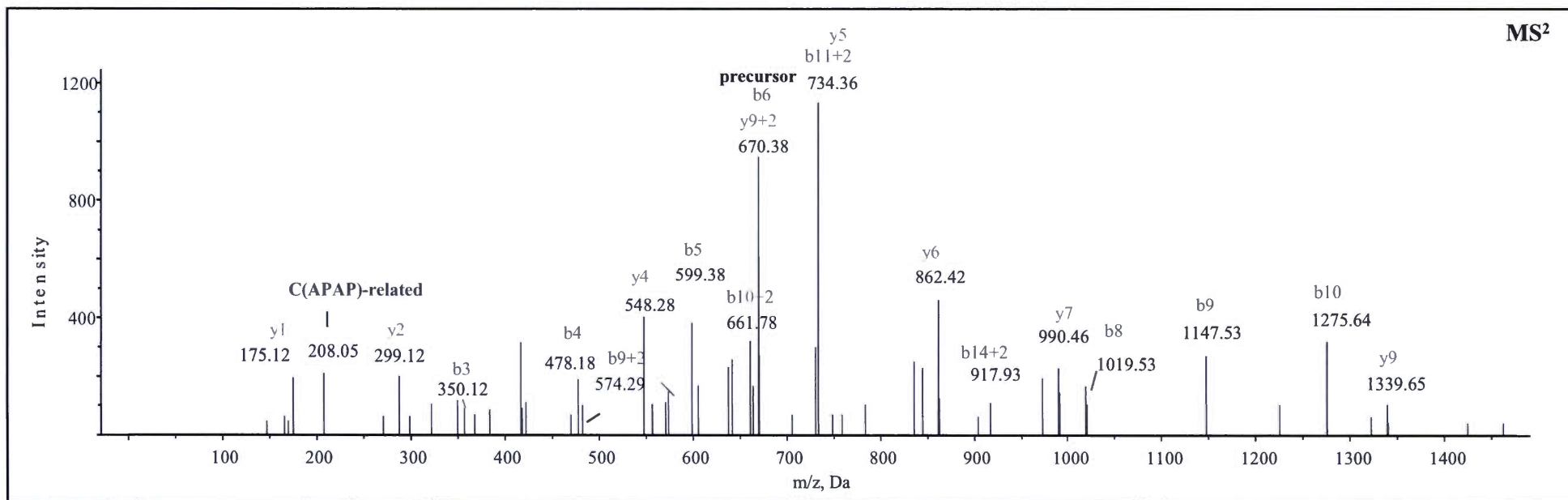
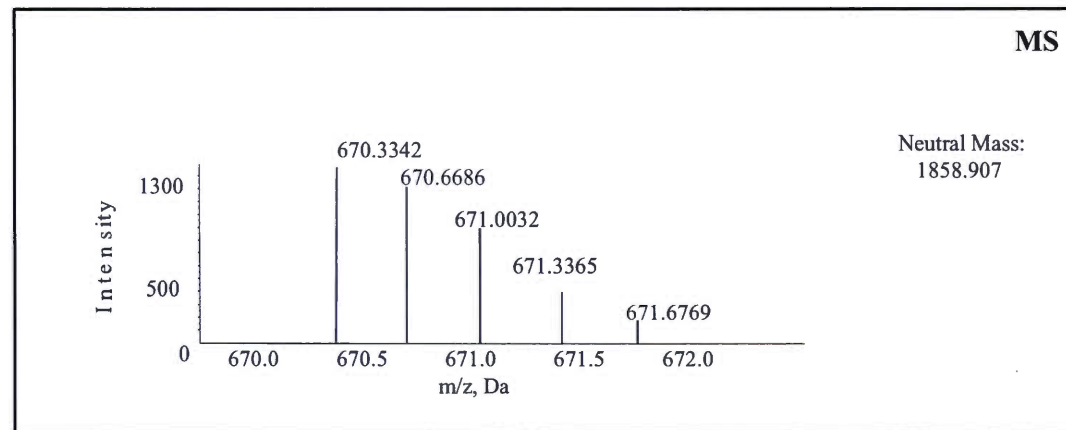
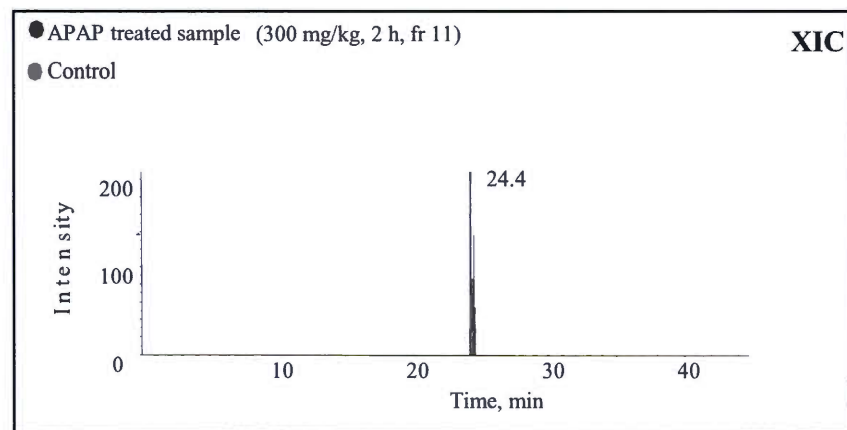
Sequence	Protein	<i>z</i>	<i>m/z</i> (theo)	ppm	RT (min)
EAPFTHFDPSCLFPACR	CAH3 (MOUSE)	3+	715.3170	6.2	32.6



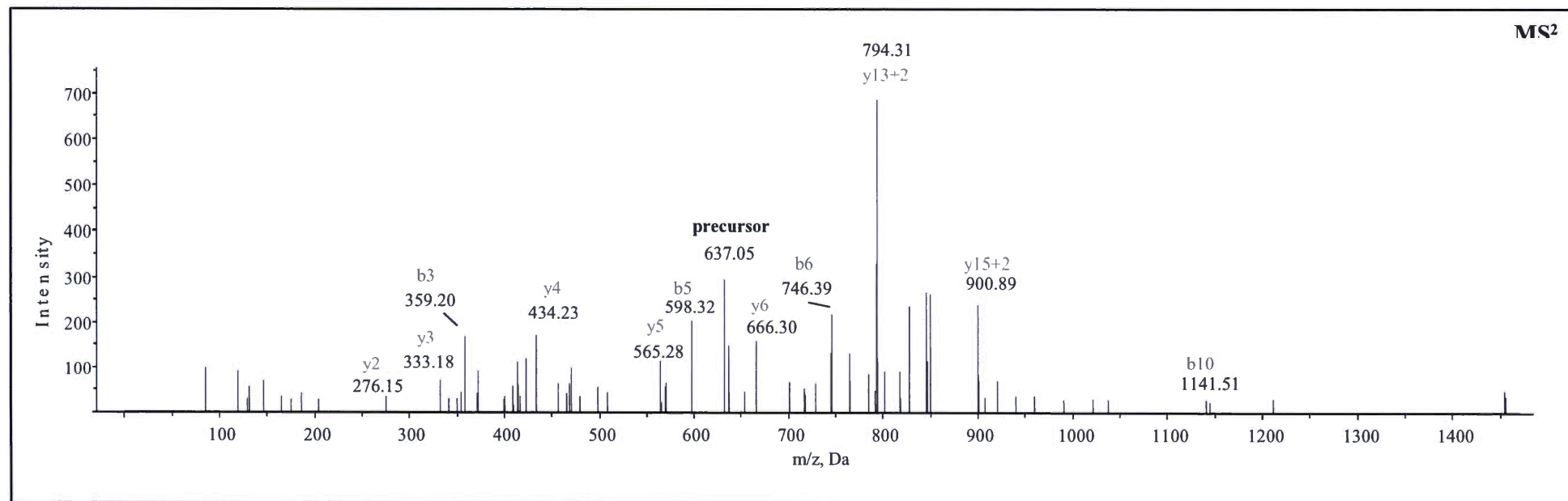
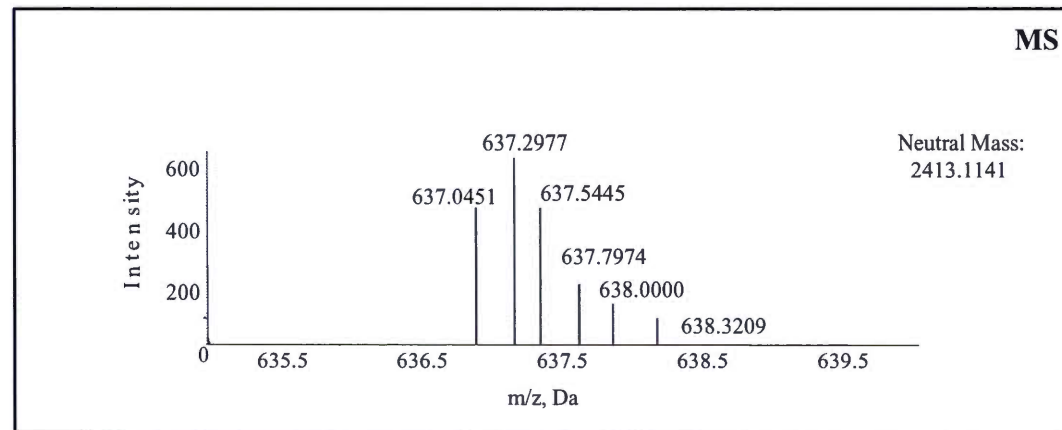
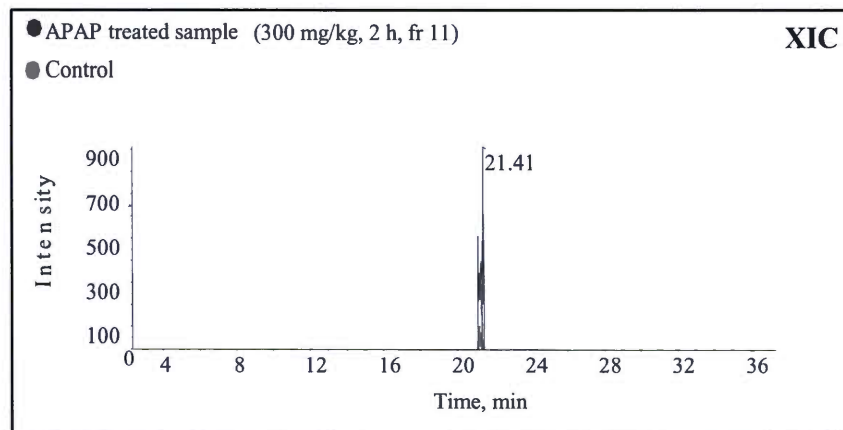
Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
CLGELICTLNAANVPAGTEVVCAPPTAYIDFAR	TPIS (MOUSE)	4+	914.6953	7.9	40.1



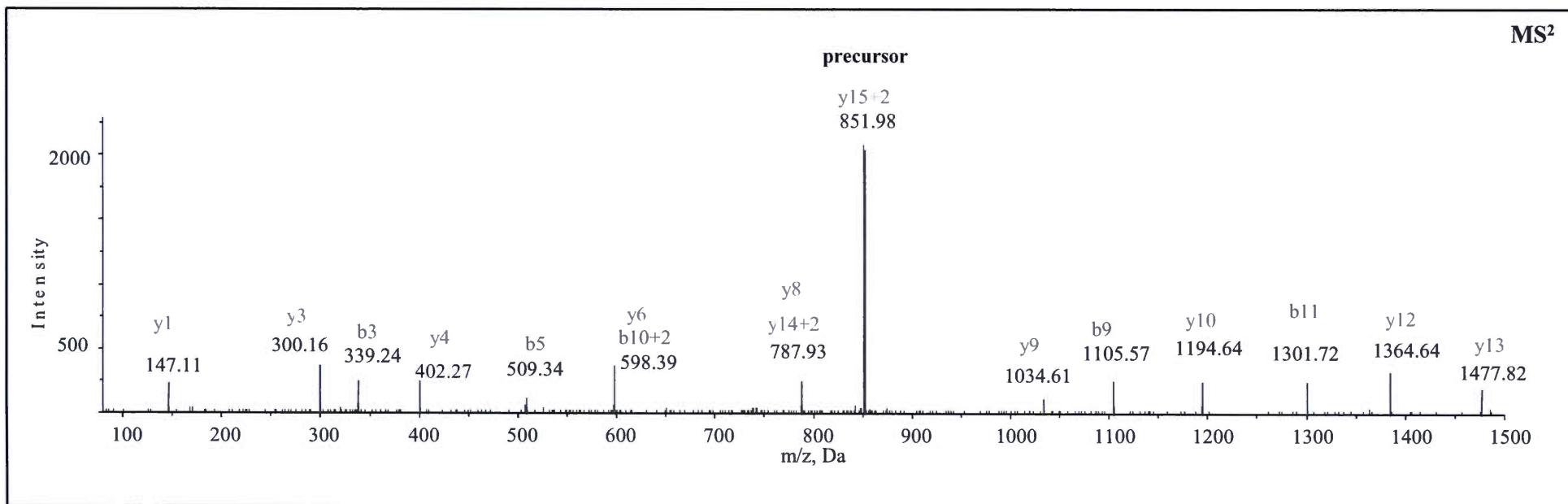
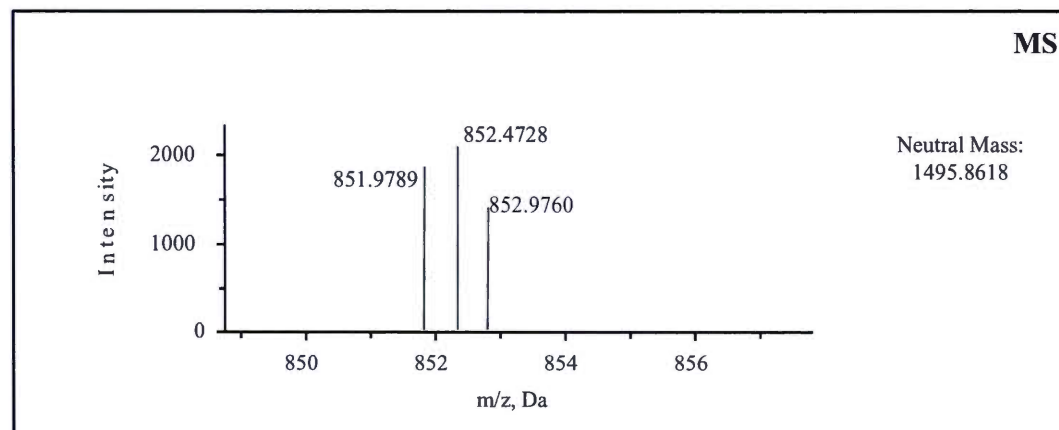
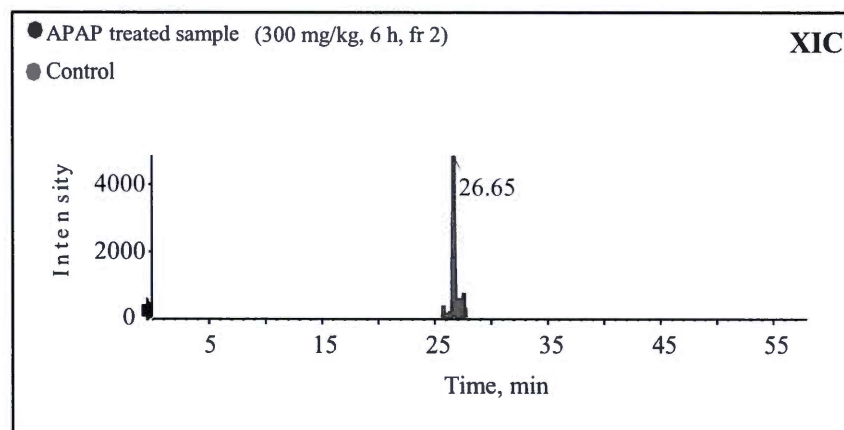
Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
LSRLEAPCQQWME L R	HIUH (MOUSE)	3+	670.329	5.6	24.4



Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
VVRNEFTLGEE C ELETMTGEK	FABPL (MOUSE)	4+	637.045	0.6	21.3



Sequence	Protein	<i>z</i>	<i>m/z</i> (theo)	ppm	RT (min)
KPIGLCCIAPVLAAK	ES1 (MOUSE)	2+	851.9728	8	26.6

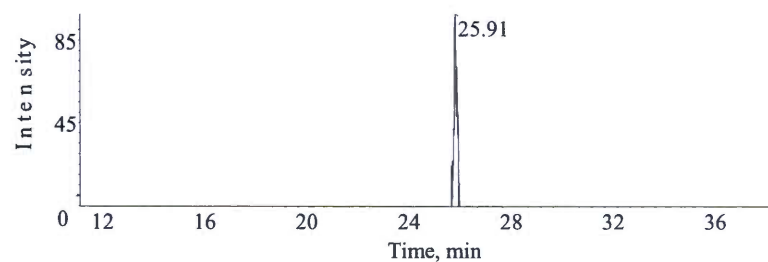


Sequence	Protein	<i>z</i>	<i>m/z</i> (theo)	ppm	RT (min)
QVADEGDALVAGGVVSQTPSYLSCK	BHMT1 (MOUSE)	3+	848.736	5	25.9

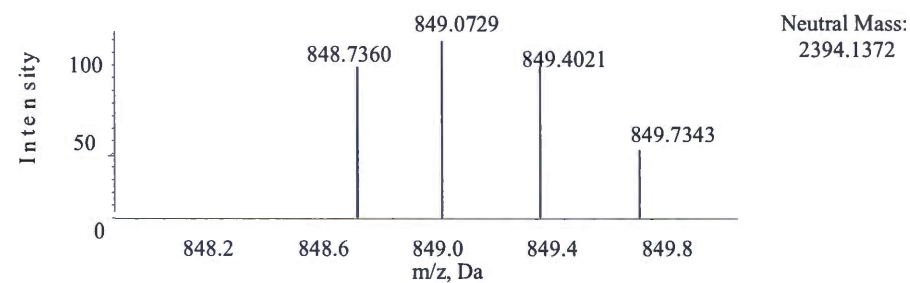
● APAP treated sample (600 mg/kg, 24 h, fr 5)

● Control

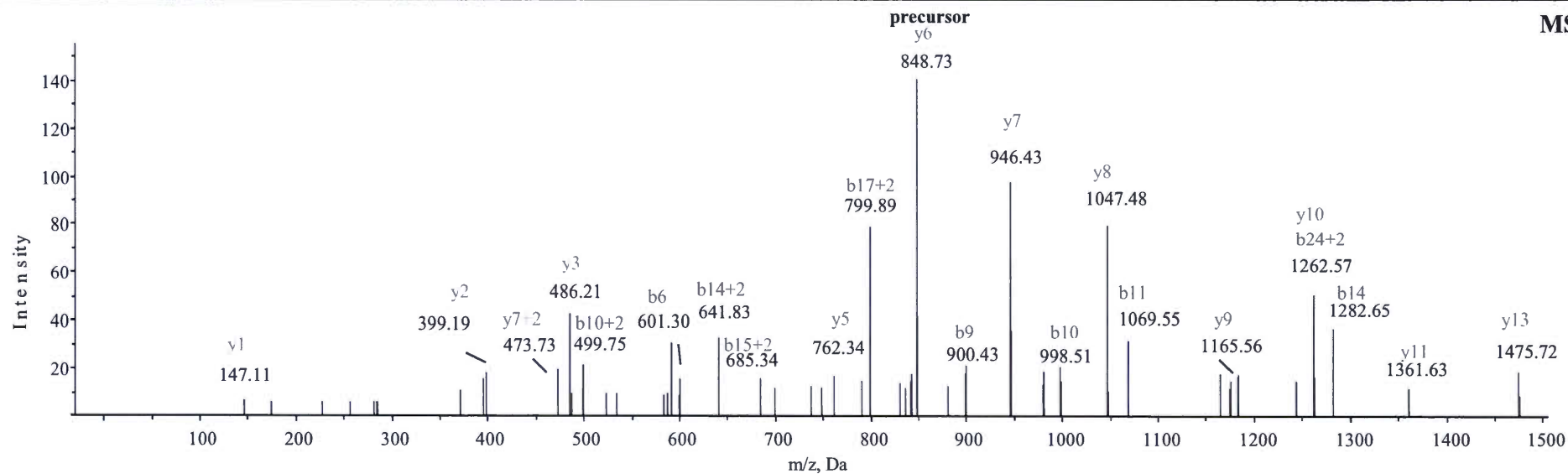
XIC



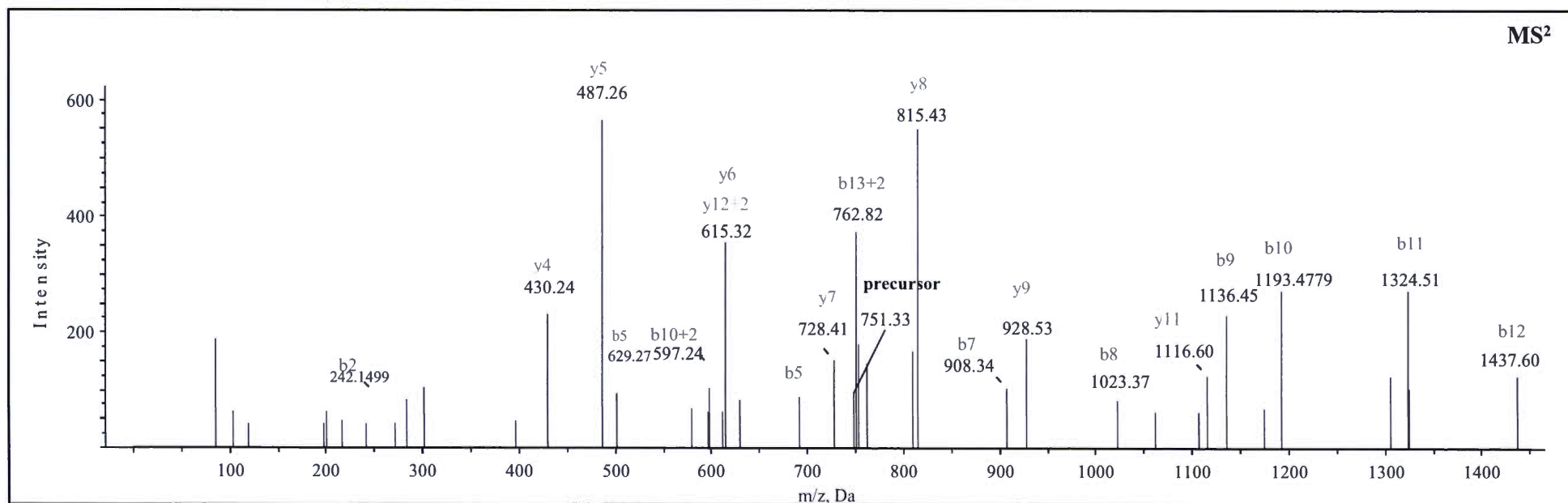
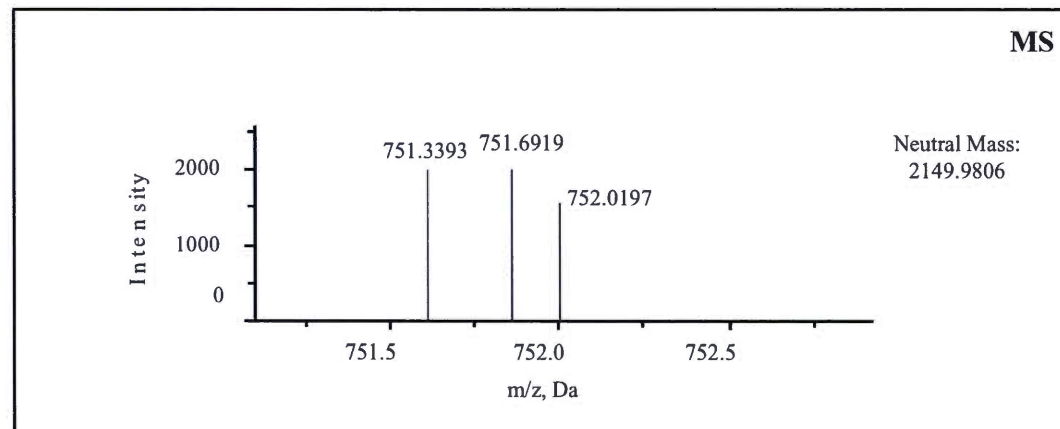
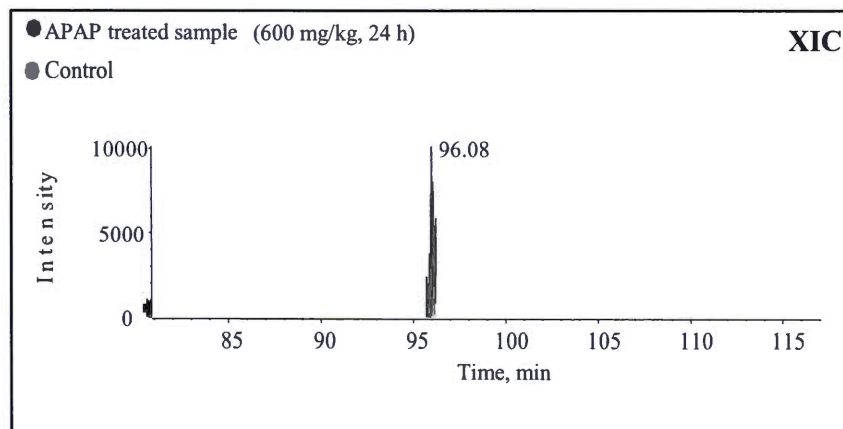
MS



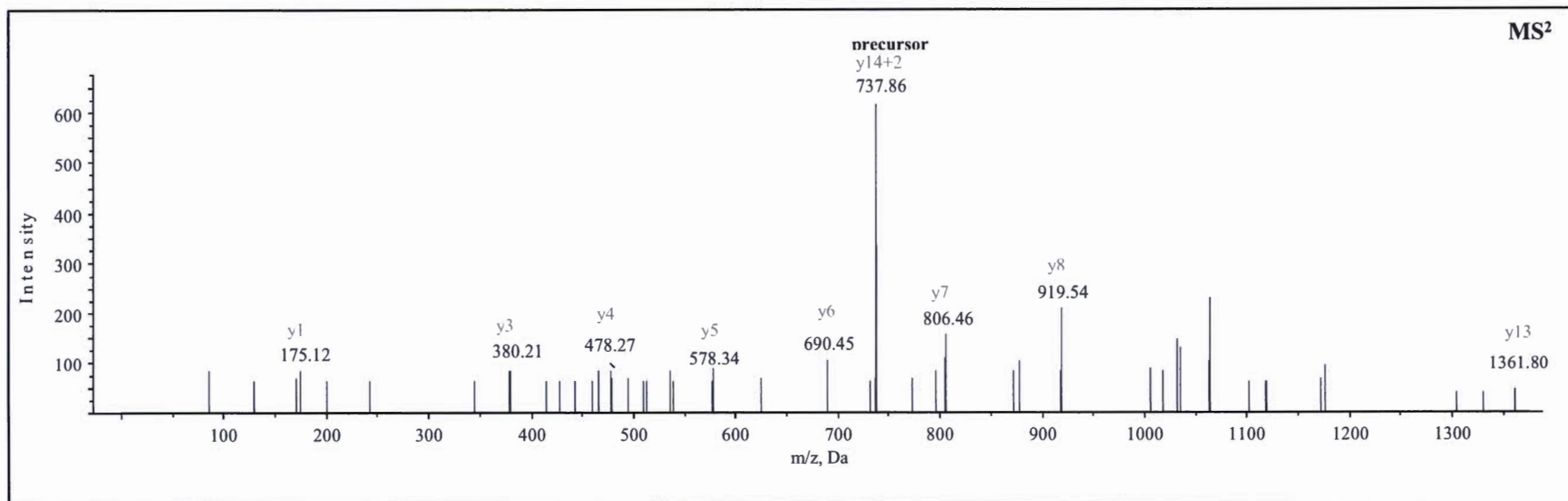
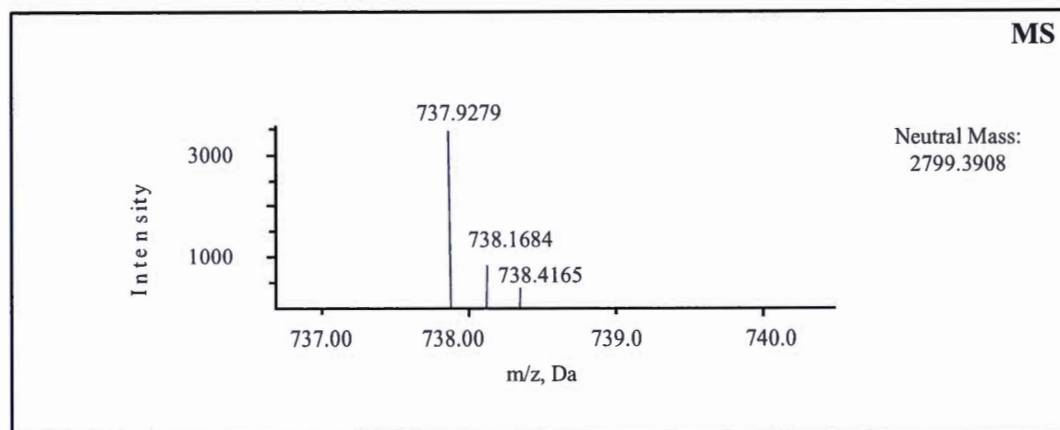
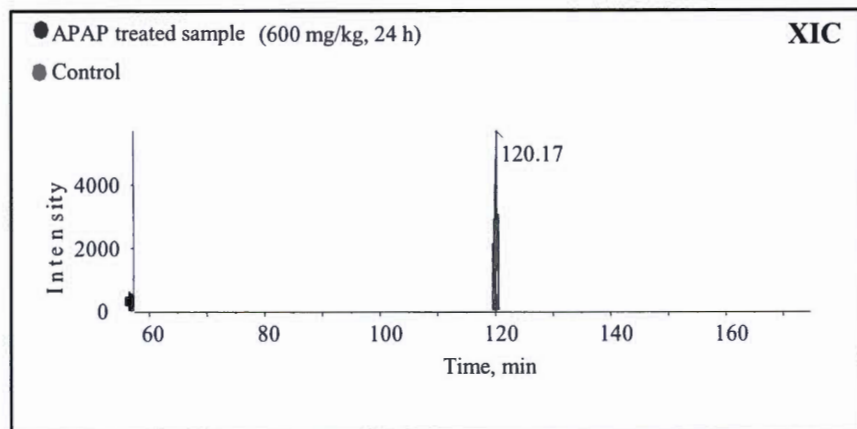
MS²



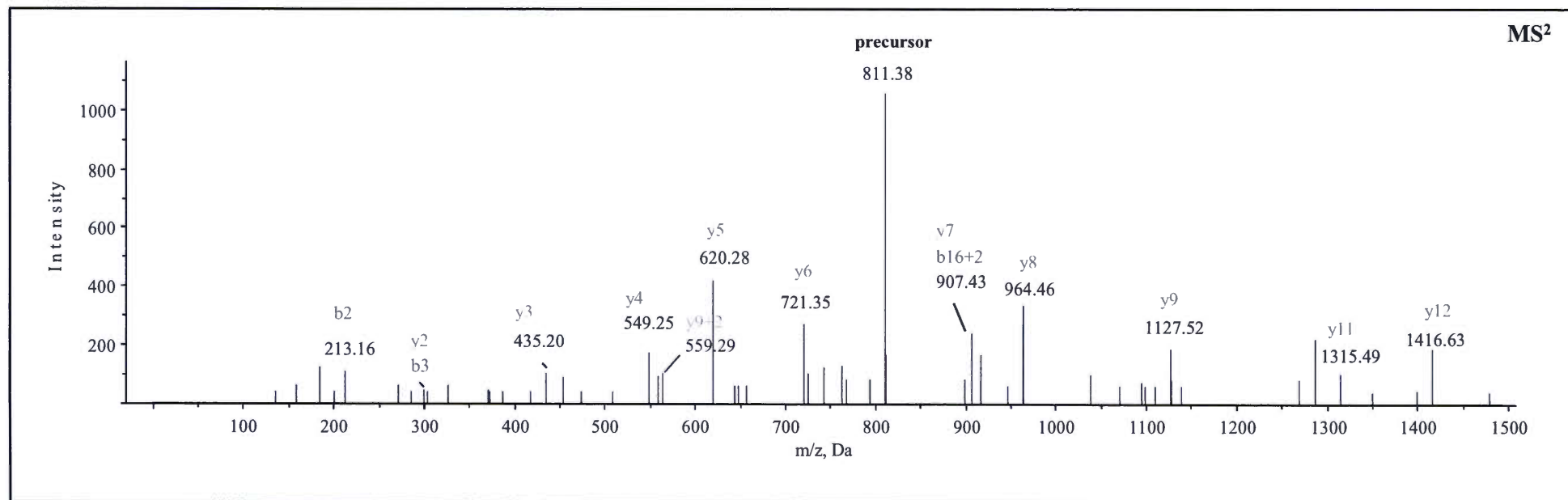
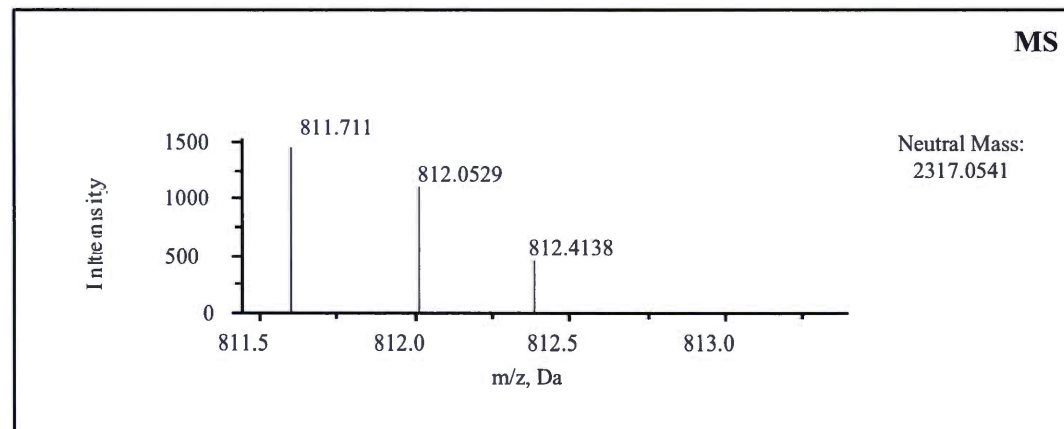
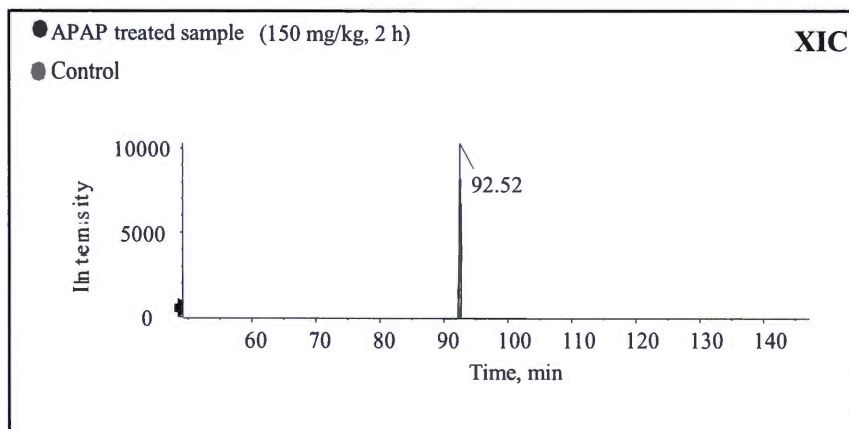
Sequence	Protein	<i>z</i>	<i>m/z</i> (theo)	ppm	RT (min)
QLMDCSEDLGMLSIQGPASR	SARDH (RAT)	3+	751.3489	6.3	96.0



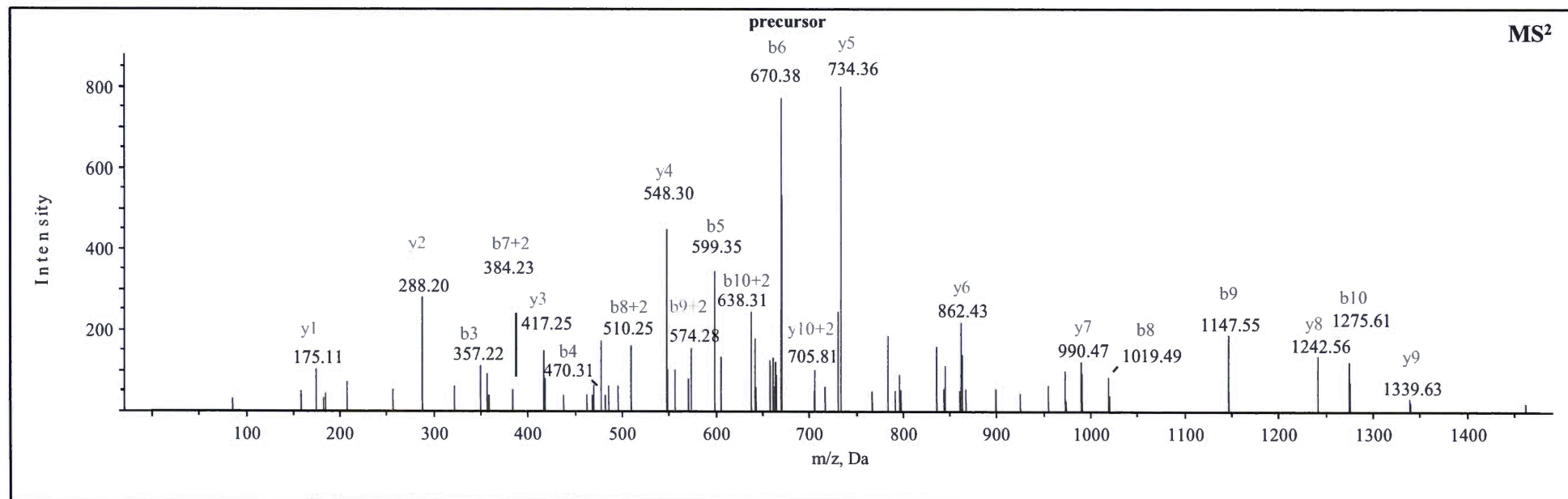
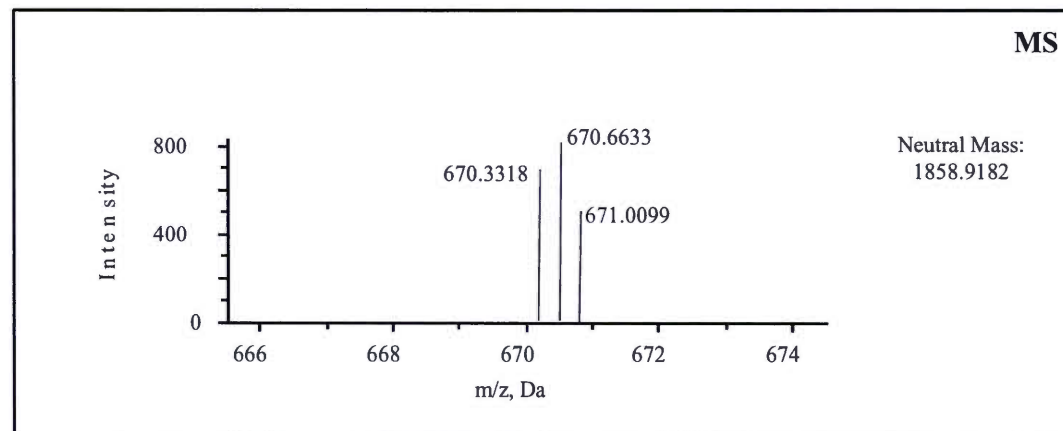
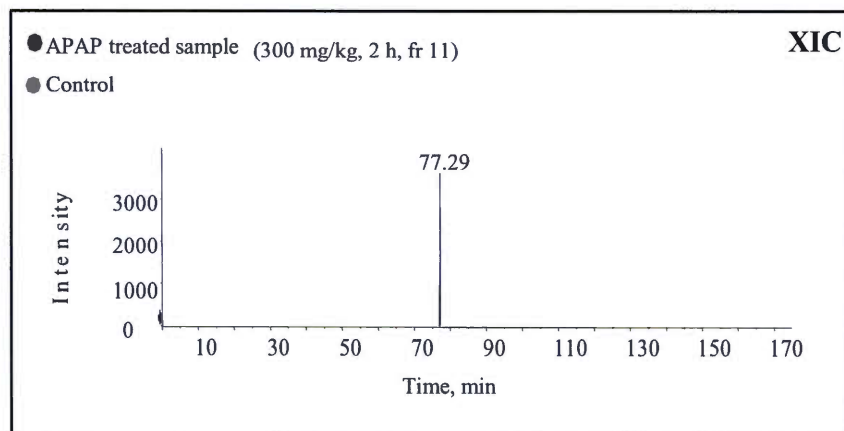
Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
CGEAAACASVHGANRLGANSLLDLVVFGFR	SDHA (RAT)	4+	738.3629	3.5	120.1



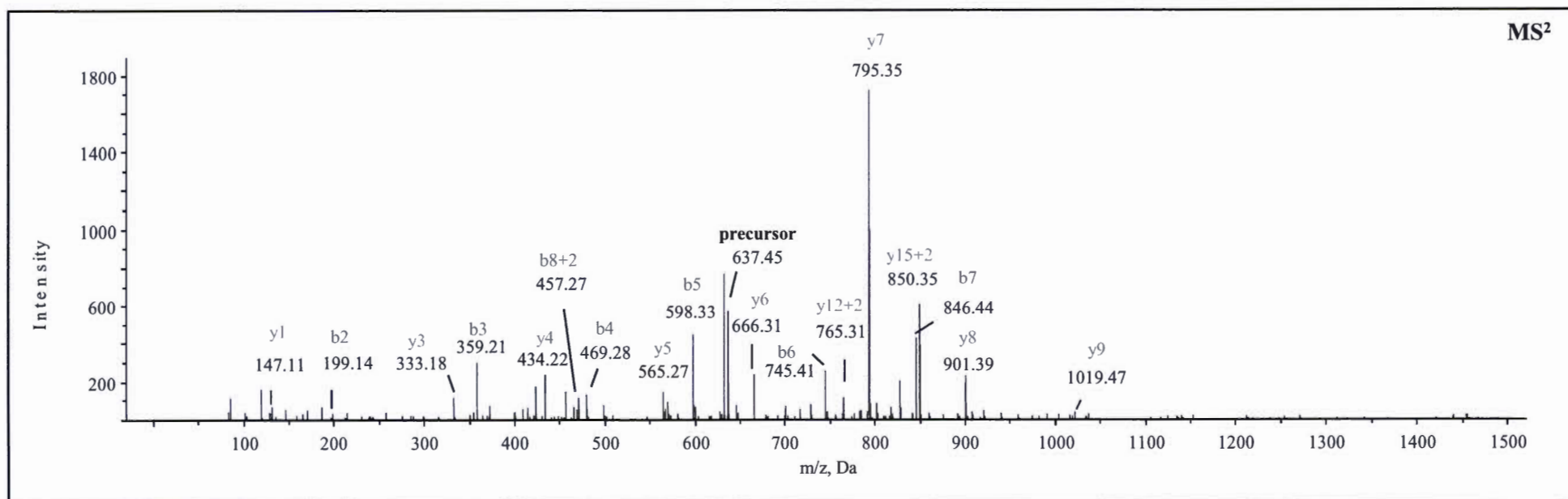
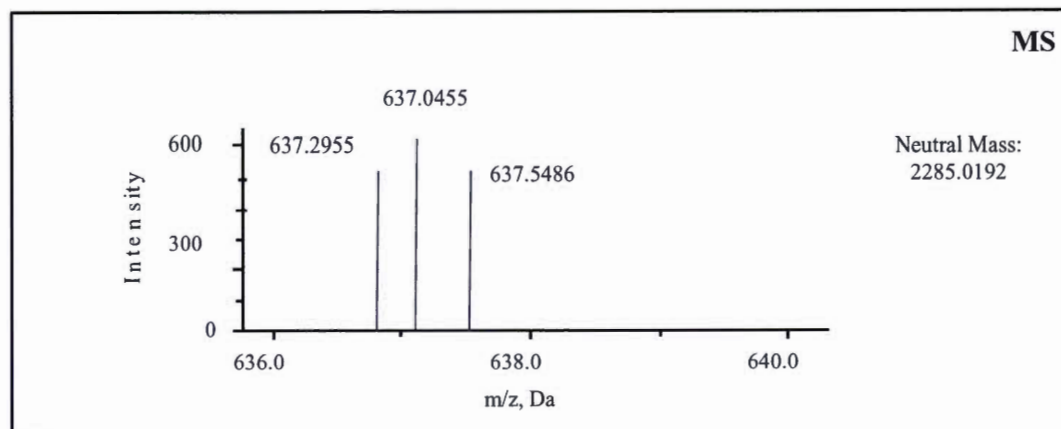
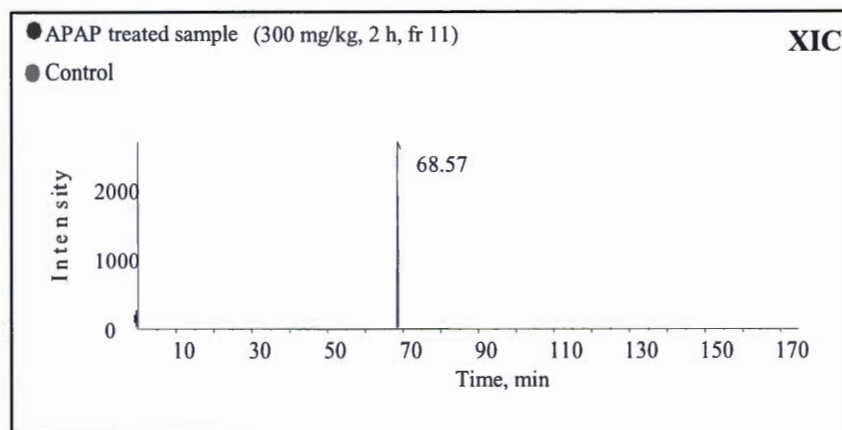
Sequence	Protein	<i>z</i>	<i>m/z</i> (theo)	ppm	RT (min)
LVSSPCCIVTSTYGWTANMER	HS90B (MOUSE)	3+	811.7119	6.0	92.5



Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
LSRLEAPCQQWMELR	HIUH (MOUSE)	3+	670.3292	7.7	77.2



Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
VVRNEFTLGEE C ELETMTGEK	FABPL (MOUSE)	4+	637.0451	2.2	68.5

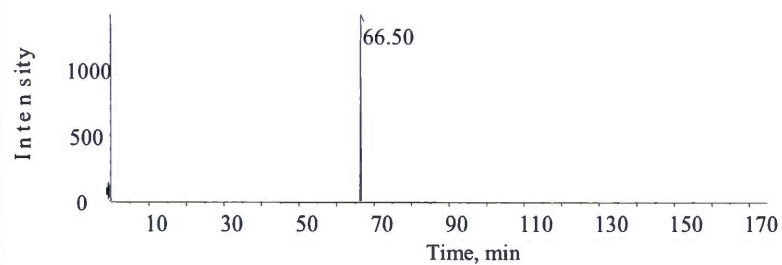


Sequence	Protein	<i>z</i>	<i>m/z</i> (theo)	ppm	RT (min)
TSAC F EPSLDY M VTK	CPSM (MOUSE)	3+	608.2723	7.7	66.5

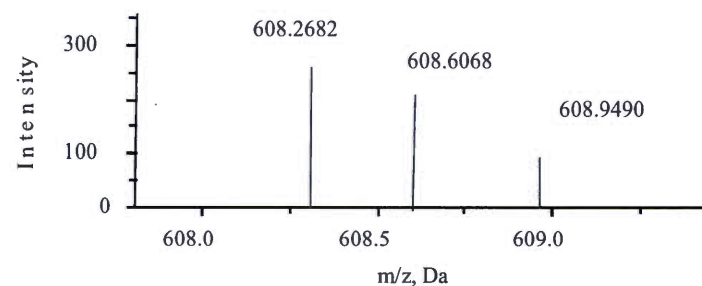
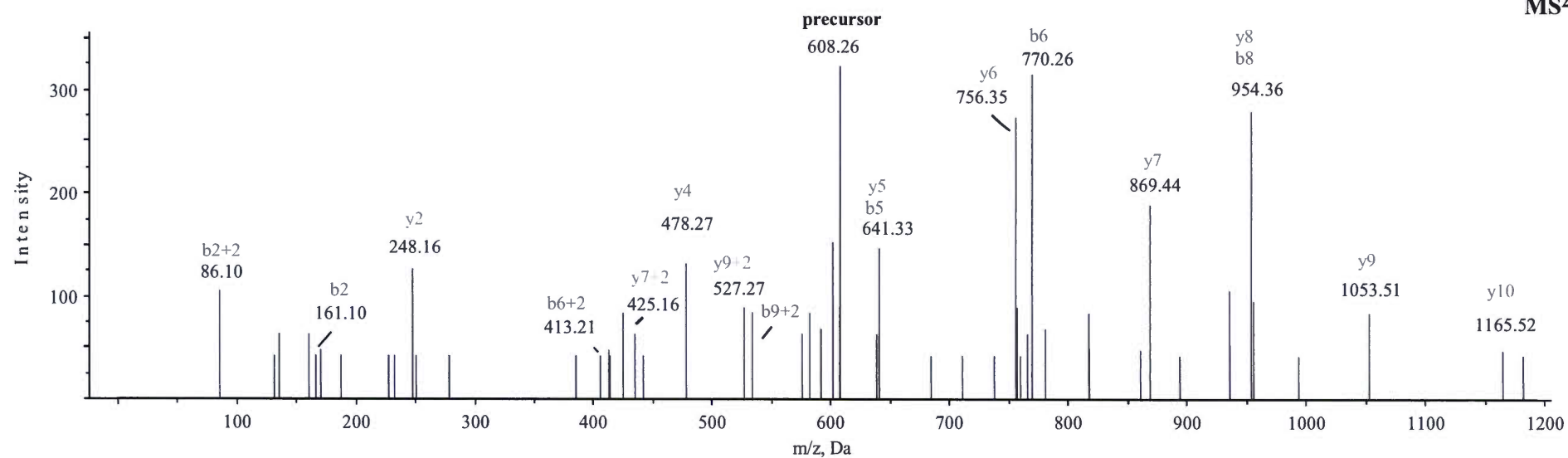
● APAP treated sample (300 mg/kg, 2 h, fr 8)

● Control

XIC



MS

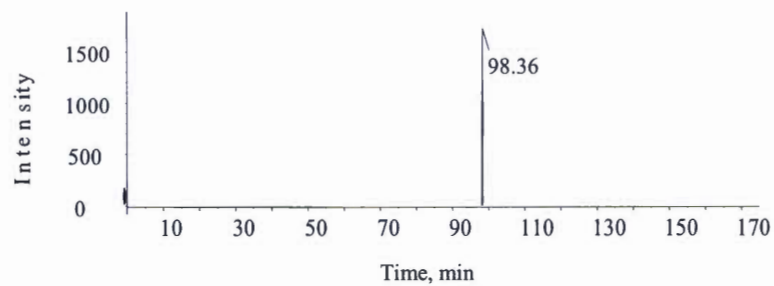
MS²

Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
FIDLLPTSLPHAVTCDIK	CP2CT (MOUSE)	3+	711.3747	1.7	98.3

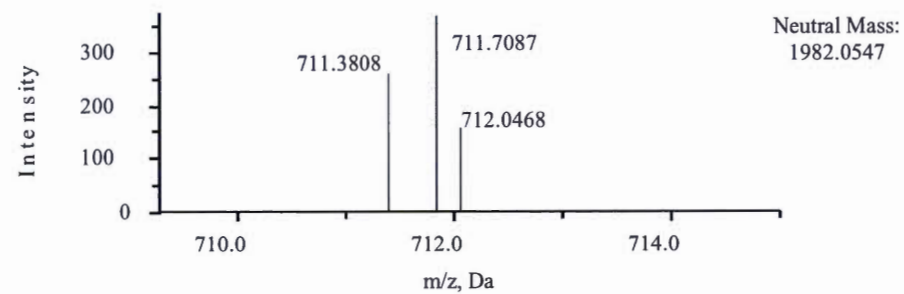
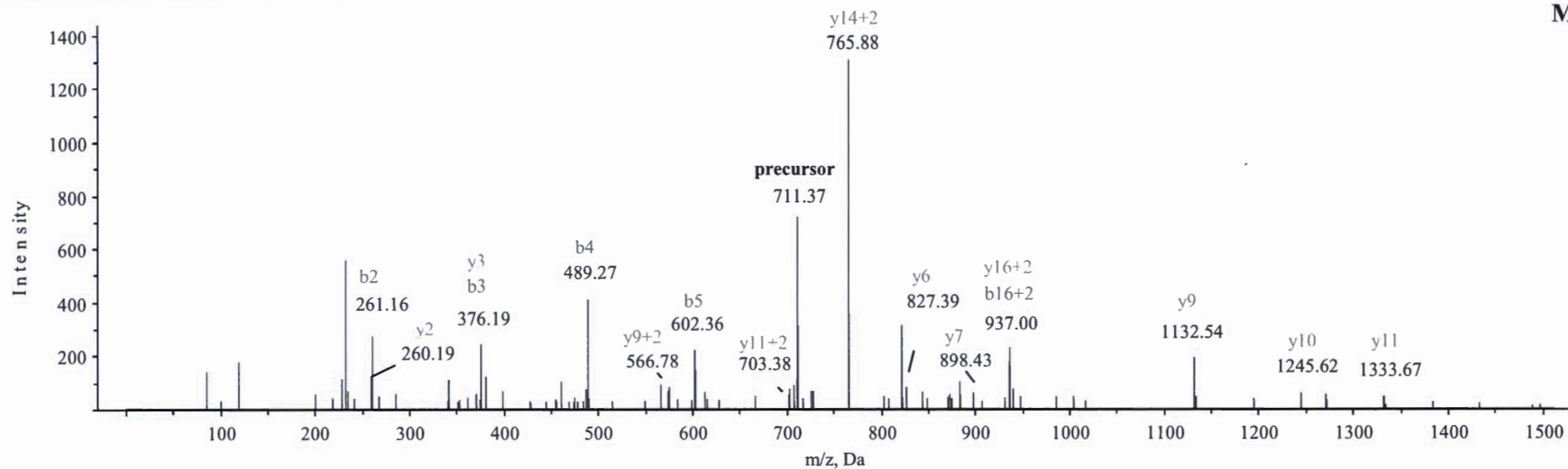
● APAP treated sample (300 mg/kg, 2 h, fr 12)

● Control

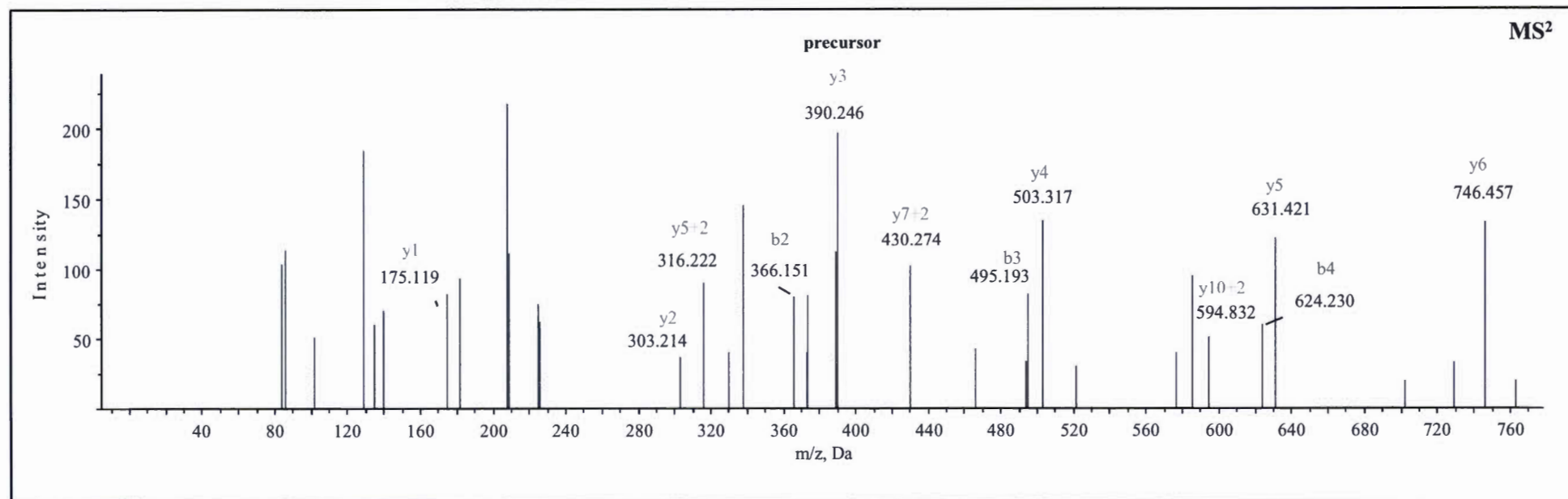
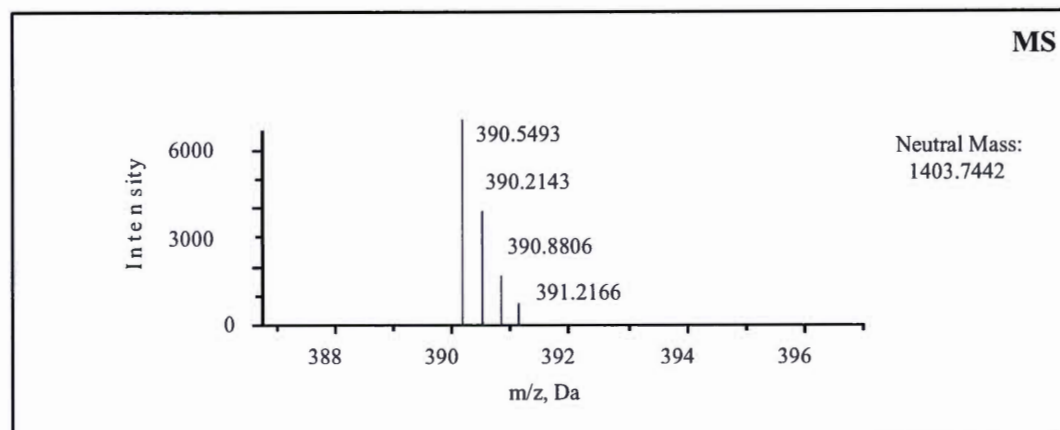
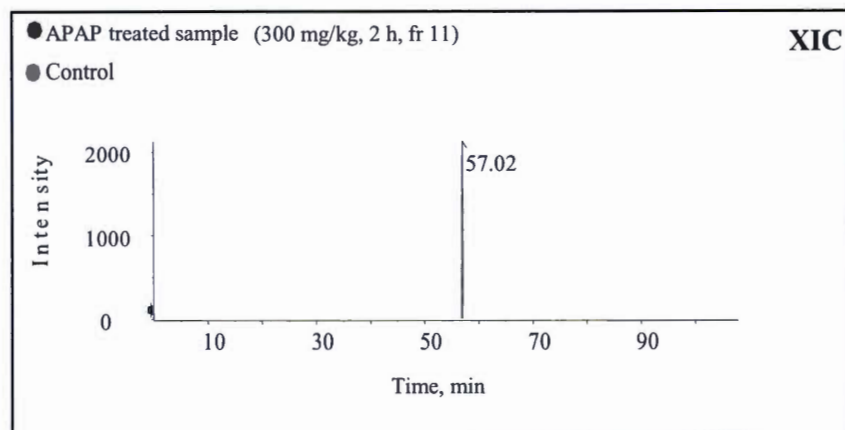
XIC



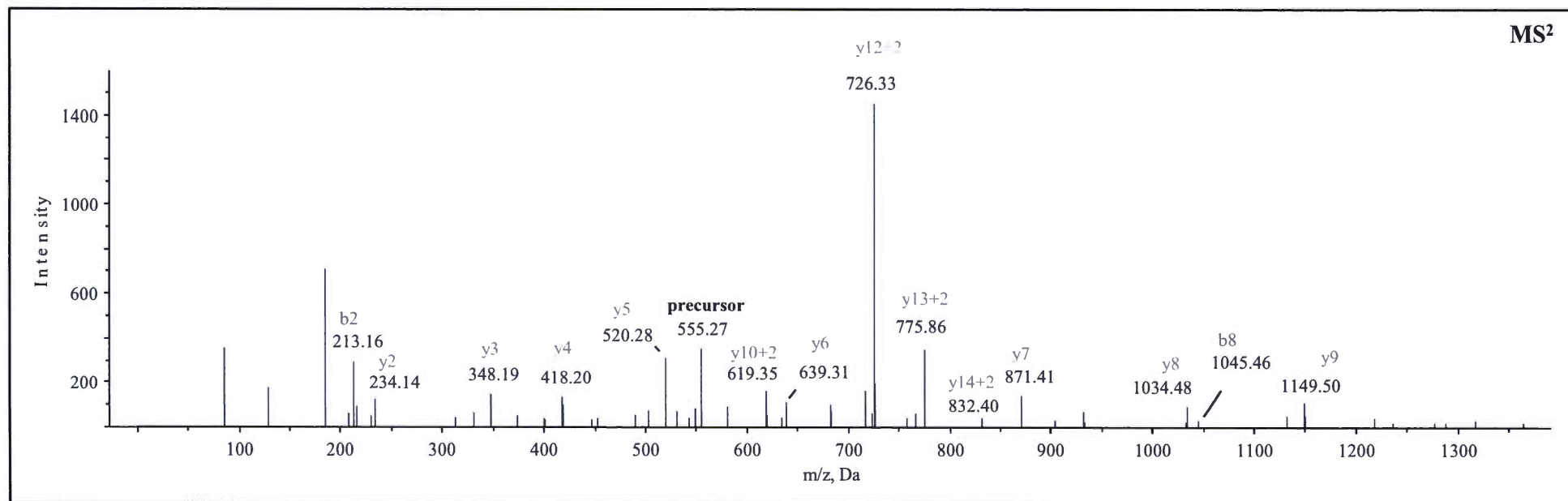
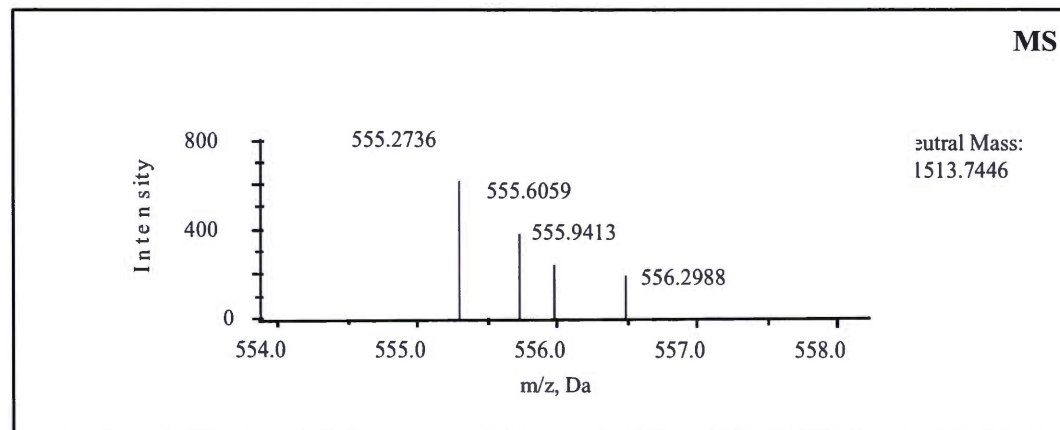
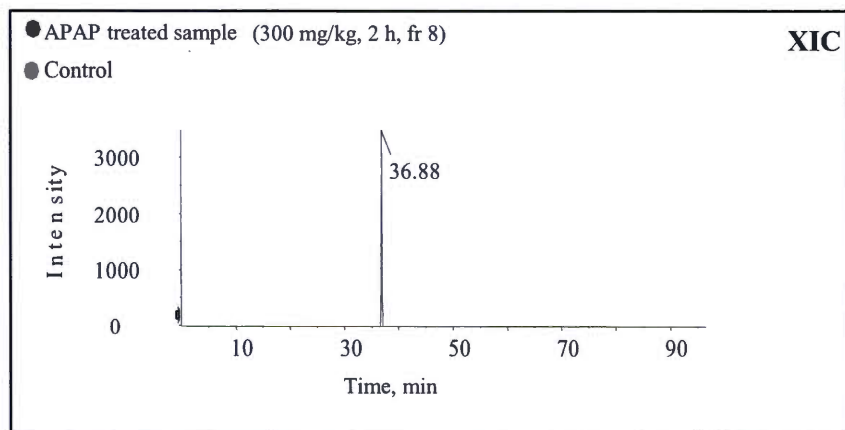
MS

MS²

Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
CIEEAIDKLSKR	GLNA (MOUSE)	4+	389.2052	7.1	57.0



Sequence	Protein	z	m/z (theo)	ppm	RT (min)
IVSSKDYCVTANSK	LDHA (MOUSE)	3+	555.2713	0.9	36.8



APPENDIX C

OPTIMIZED MRM METHOD FOR TARGETED METABOLOMICS METHOD

Table S2.1. List of precursor and fragment ions along with optimized collision energy (CE) values and retention time (RT) on PFP and T3HSS columns

PFP (-)					
T3HSS(-)					
<i>m/z</i> precursor	T3HSS, RT (min)	PFP, RT (min)	<i>m/z</i> frag 1 (CE)	<i>m/z</i> frag 2 (CE)	<i>m/z</i> frag 3 (CE)
194.0482	2.8	5.35	79.9581-30	106.9806-30	124.0067-30
222.0827	6.2	7.8	79.9582-30	106.9808-30	124.0069-30
224.0233	1.0	2.7	124.0072-20	79.9582-40	89.0249-20
248.0975	7.9	9.0	79.9583-40	124.0072-30	106.9808-30
308.1173	5.3	6.5	220.0647-30	124.0073-30	106.9811-40
323.1503	10.9	11.2	277.1436-20	233.1535-30	150.0678-30
357.1020	9.7	10.5	79.9583-30	233.1538-40	163.0756-40
462.2847	10.2	9.5	382.2735-40	418.2942-30	74.0257-40
464.3019	10.8	9.9	74.0259-40	NS	NS
500.2763	10.8	9.8	464.301-30	303.2315-NS	74.0268-40
508.2907	10.2	9.5	462.2852-20	328.2738-NS	283.2628-NS
815.5693	11.1	10.8	407.2773-40	408.2864-40	405.9713-40
269.0662	5.3	6.5	93.0352-40	113.0246-20	85.0306-20
342.0816	5.7	7	271.0142-30	306.9906-20	132.9017-20
389.0886	8.7	9.5	79.9585-30	307.1180-30	250.1206-40
389.2671	12.3	12.1	371.2590-40	345.2797-40	220.0499-40
391.2844	12.9	12.3	345.2795-40	327.2692-40	355.2640-40
405.2614	11.5	11.1	387.2531-40	NS	NS
425.0324	8.4	10.2	201.0217-30	121.0654-40	79.9577-40
435.2738	12.9	11.7	389.2699-20	345.2791-40	343.2637-40
441.2425	11.6	10.9	405.2614-20	237.0122-NS	214.1427-20
448.3041	11.7	11.0	404.3173-40	74.0266-40	386.3061-40
451.2678	11.5	11.1	405.2625-20	387.2535-40	403.9628-30
453.2842	11.6	10.8	407.2780-20	408.6120-NS	345.2793-40
477.0615	4.1	5.4	358.0598-20	182.0278-40	301.0328-20
499.0452	4.6	NS in PFP	294.9750-30	163.9027-40	203.0857-40
548.2316	11.9	11.2	530.2196-30	468.2195-40	502.3210-40
588.0970	4.4	NS in PFP	357.0824-30	456.1862-20	113.0250-40
694.3756	7.4	6.9	676.3690-30	463.2188-40	171.0772-40

NS: no signal

PFP (+)					
T3HSS(+)					
m/z, precursor	T3HSS, RT (min)	PFP, RT (min)	m/z frag 1 (CE)	m/z frag 2 (CE)	m/z frag 3 (CE)
134.0605	6.8	8.4	106.0660-20.0	77.0408-40.0	105.0342-30.0
188.0713	9.2	8.3	118.0649-30.0	143.0725-30.0	115.0542-40.0
208.0600	5.5	6.5	162.0547-20.0	144.0438-30.0	116.0494-40.0
300.2907	12.0	11.6	282.2789-20.0	252.2682-20.0	264.2680-20.0
355.2641	12.3	11.6	159.1166-30.0	145.1008-40.0	213.1639-30.0
360.0700	5.7	6.6	184.0367-20.0	149.0593-30.0	86.0977-20.0
372.0882	NS in T3HSS	10.5	354.2508-20.0	336.2405-20.0	159.1163-30.0
391.2848	NS in T3HSS	11.1	355.2692-20.0	213.1636-30.0	159.1166-40.0
462.2990	13.3	13.1	308.2949-30.0	290.2837-30.0	247.2411-20.0
466.3184	10.8	9.9	412.2849-20.0	337.2535-30.0	430.2955-20.0
154.0620	4.0	4.5	108.0453-40.0	72.9370-NS	136.0371-20.0
165.0900	10.9	11.3	137.0965-20.0	122.0734-30.0	107.0500-40.0
253.1190	5.2	5.8	103.0399-20.0	89.0610-20.0	133.0861-20.0
263.1630	12.8	13.6	149.0965-20.0	121.1017-40.0	105.0711-40.0
277.1480	10.3	11.2	231.1388-20.0	259.1334-20.0	189.0915-30.0
277.2180	13.8	14.8	235.1698-30.0	179.1068-30.0	57.0730-40.0
279.1570	11.2	11.3	201.0471-30.0	149.0234-NS	173.0520-40.0
295.2270	13.2	13.3	277.2164-20.0	121.1016-20.0	135.1173-20.0
296.1510	5.4	6.2	121.0842-30.0	167.0897-20.0	84.0461-40.0
328.6740	5.6	6.0	283.1743-20.0	89.0606-30.0	177.1117-20.0
353.2490	11.3	11.1	335.2371-20.0	307.2420-20.0	293.2266-30.0
357.1860	4.8	5.8	181.1053-20.0	121.0656-40.0	139.0947-30.0
371.2600	11.5	11.1	353.2479-20.0	252.1867-40.0	159.1176-30.0
373.2740	11.6	11.7	355.2631-20.0	213.1638-30.0	159.1169-40.0
383.2030	3.8	3.0	203.0521-30.0	181.0977-40.0	158.0920-30.0
421.7060	6.6	6.8	363.1603-30.0	305.1537-40.0	130.0666-40.0
422.2080	6.5	6.8	364.1684-40.0	175.1558-30.0	249.1044-30.0
441.2460	8.0	8.4	199.0214-30.0	265.0842-20.0	173.0923-NS
448.3080	10.8	10.0	412.2863-20.0	337.2539-20.0	319.2430-30.0
450.3220	12.5	13.0	391.2221-30.0	163.0145-40.0	125.0004-40.0
457.3353	13.1	13.1	411.3259-30.0	439.3226-20.0	149.0971-30.0
473.3273	13.1	12.7	455.3153-20.0	427.3219-20.0	409.3114-20.0
479.0800	4.2	5.2	303.0472-20.0	213.9993-30.0	184.0430-40.0
486.2301	5.7	5.8	477.2357-20.0	333.1932-20.0	159.0923-40.0
548.3729	14.0	15.9	184.0743-40.0	530.3618-30.0	104.1085-30.0
606.8060	6.3	6.1	597.8036-30.0	353.1841-30.0	214.1540-30.0
696.3917	7.4	6.8	524.3092-30.0	425.2405-40.0	326.1721-40.0
710.2203	6.2	5.9	129.1029-40.0	106.0508-30.0	226.1194-40.0
720.1407	5.0	5.8	544.1084-30.0	362.0805-40.0	261.1306-NS
781.5587	11.6	10.8	373.2743-30.0	355.2637-40.0	184.0735-NS
799.5749	11.6	10.7	373.2746-30.0	355.2641-40.0	781.5594-20.0
817.5874	11.6	10.8	373.2738-30.0	355.2632-40.0	799.5697-20.0
834.6099	11.6	10.7	426.3237-30.0	817.5842-20.0	373.2761-40.0
839.5723	11.6	10.8	431.2771-40.0	839.5630-20.0	0.0000-NS
855.5469	11.6	10.7	447.2509-30.0	429.1913-40.0	373.2738-40.0
870.4939	11.6	10.7	852.4820-40.0	834.4710-40.0	444.1952-40.0
873.5048	11.6	10.7	855.4900-40.0	465.2147-40.0	373.2759-30.0

NS: no signal

RÉFÉRENCES

- Abiko, Y., Ishii, I., Kamata, S., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Ihara, H., . . . Kumagai, Y. (2015). Formation of sulfur adducts of n-acetyl-p-benzoquinoneimine, an electrophilic metabolite of acetaminophen in vivo: Participation of reactive persulfides. *Chemical research in toxicology*, 28(9), 1796-1802.
- Abou-Donia, M. (2015). *Mammalian toxicology*: John Wiley & Sons.
- Aebersold, R., & Goodlett, D. R. (2001). Mass spectrometry in proteomics. *Chemical reviews*, 101(2), 269-296.
- Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198-207.
- Anzenbacher, P., & Anzenbacherová, E. (2001). Cytochromes p450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and molecular life sciences*, 58(5), 737-747.
- Atkuri, K. R., Mantovani, J. J., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (2007). N-acetylcysteine—a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current opinion in pharmacology*, 7(4), 355-359.
- Awad, H., Khamis, M. M., & El-Aneed, A. (2015). Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(2), 158-175.
- Baillie, T. A. (2014). Metabolic activation and associated drug toxicity. *Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics*.
- Bass, N. M., Barker, M. E., Manning, J. A., Jones, A. L., & Ockner, R. K. (1989). Acinar heterogeneity of fatty acid binding protein expression in the livers of male, female and clofibrate-treated rats. *Hepatology*, 9(1), 12-21.
- Bateman, D. N. (2016). Acetaminophen (paracetamol). *Critical Care Toxicology*, 1-25.
- Benson, G. D., Koff, R. S., & Tolman, K. G. (2005). The therapeutic use of acetaminophen in patients with liver disease. *American journal of therapeutics*, 12(2), 133-141.

- Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., & Leone, S. (2006). Paracetamol: New vistas of an old drug. *CNS drug reviews*, 12(3-4), 250-275.
- Bessemers, J. G., & Vermeulen, N. P. (2001). Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: Molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Critical reviews in toxicology*, 31(1), 55-138.
- Bhushan, B., Borude, P., Edwards, G., Walesky, C., Cleveland, J., Li, F., . . . Apte, U. (2013). Role of bile acids in liver injury and regeneration following acetaminophen overdose. *The American journal of pathology*, 183(5), 1518-1526.
- Bissell, D. M., Gores, G. J., Laskin, D. L., & Hoofnagle, J. H. (2001). Drug-induced liver injury: Mechanisms and test systems. *Hepatology*, 33(4), 1009-1013.
- Boersema, P. J., Mohammed, S., & Heck, A. J. (2008). Hydrophilic interaction liquid chromatography (hilic) in proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(1), 151-159.
- Botting, R. (2003). Cox-1 and cox-3 inhibitors. *Thrombosis research*, 110(5), 269-272.
- Bouhifd, M., Hartung, T., Hogberg, H. T., Kleensang, A., & Zhao, L. (2013). Toxicometabolomics. *Journal of Applied Toxicology*, 33(12), 1365-1383.
- Callesen, A. K., Madsen, J. S., Vach, W., Kruse, T. A., Mogensen, O., & Jensen, O. N. (2009). Serum protein profiling by solid phase extraction and mass spectrometry: A future diagnostics tool? *Proteomics*, 9(6), 1428-1441.
- Camporez, J. P. G., Jornayvaz, F. R., Lee, H.-Y., Kanda, S., Guigni, B. A., Kahn, M., . . . Jurczak, M. J. (2013). Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance. *Endocrinology*, 154(3), 1021-1028.
- Chen, C., Krausz, K. W., Idle, J. R., & Gonzalez, F. J. (2008). Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer

- analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and cyp2e1-null mice. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4543-4559.
- Cohen, S. D., Pumford, N. R., Khairallah, E. A., Boekelheide, K., Pohl, L. R., Amouzadeh, H., & Hinson, J. A. (1997). Selective protein covalent binding and target organ toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 143(1), 1-12.
- Commandeur, J., Stijntjes, G. J., & Vermeulen, N. (1995). Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione s-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacological Reviews*, 47(2), 271-330.
- Contrepois, K., Jiang, L., & Snyder, M. (2015). Optimized analytical procedures for the untargeted metabolomic profiling of human urine and plasma by combining hydrophilic interaction (hilic) and reverse-phase liquid chromatography (rp lc)–mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(6), 1684-1695.
- Dahlin, D. C., Miwa, G. T., Lu, A. Y., & Nelson, S. D. (1984). N-acetyl-p-benzoquinone imine: A cytochrome p-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(5), 1327-1331.
- De Montellano, P. R. O. (2005). *Cytochrome p450: Structure, mechanism, and biochemistry*: Springer Science & Business Media.
- Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., & Schlichting, I. (2005). Structure and chemistry of cytochrome p450. *Chemical reviews*, 105(6), 2253-2278.
- Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*, 26(1), 51-78.
- Dixon, J., Lane, K., MacPhee, I., & Philips, B. (2014). Xenobiotic metabolism: The effect of acute kidney injury on non-renal drug clearance and hepatic drug metabolism. *International journal of molecular sciences*, 15(2), 2538-2553.

- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *science*, 312(5771), 212-217.
- Dragnev, K., Beebe, L., Jones, C., Fox, S., Thomas, P., Nims, R., & Lubet, R. (1994). Subchronic dietary exposure to aroclor 1254 in rats: Accumulation of pcbs in liver, blood, and adipose tissue and its relationship to induction of various hepatic drug-metabolizing enzymes. *Toxicology and applied pharmacology*, 125(1), 111-122.
- Dufort, I., Labrie, F., & Luu-The, V. (2001). Human types 1 and 3 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: Differential lability and tissue distribution. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(2), 841-846.
- Ellenbroek, B., & Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: Is it a rat race? *Disease models & mechanisms*, 9(10), 1079-1087.
- Fujimoto, K., Kumagai, K., Ito, K., Arakawa, S., Ando, Y., Oda, S.-i., . . . Manabe, S. (2009). Sensitivity of liver injury in heterozygous sod2 knockout mice treated with troglitazone or acetaminophen. *Toxicologic pathology*, 37(2), 193-200.
- Gao, Z., Li, H., Zhang, H., Liu, X., Kang, L., Luo, X., . . . Jiang, H. (2008). PdtD: A web-accessible protein database for drug target identification. *BMC bioinformatics*, 9(1), 104.
- Giansanti, P., Tsiatsiani, L., Low, T. Y., & Heck, A. J. (2016). Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nature protocols*, 11(5), 993-1006.
- Gibson, G., & Skett, P. (2001). Introduction to drug metabolism nelson thornes. *Cheltenham (United Kingdom)*.
- Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Plumb, R. S., & Wilson, I. D. (2014). Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 87, 12-25.
- Gillette, M. A., & Carr, S. A. (2013). Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nature methods*, 10(1), 28-34.

- Glatz, J. F., & van der Vusse, G. J. (1996). Cellular fatty acid-binding proteins: Their function and physiological significance. *Progress in lipid research*, 35(3), 243-282.
- Golizeh, M., LeBlanc, A., & Sleno, L. (2015). Identification of acetaminophen adducts of rat liver microsomal proteins using 2d-lc-ms/ms. *Chemical research in toxicology*, 28(11), 2142-2150.
- Golizeh, M., & Sleno, L. (2013). Optimized proteomic analysis of rat liver microsomes using dual enzyme digestion with 2d-lc-ms/ms. *Journal of proteomics*, 82, 166-178.
- Gong, Y., Wang, G., Gong, Y., Yan, J., Chen, Y., & Burczynski, F. J. (2014). Hepatoprotective role of liver fatty acid binding protein in acetaminophen induced toxicity. *BMC gastroenterology*, 14(1), 44.
- Graham, G. G., & Scott, K. F. (2003). Mechanisms of action of paracetamol and related analgesics. *Inflammopharmacology*, 11(4), 401-413.
- Graham, G. G., & Scott, K. F. (2005). Mechanism of action of paracetamol. *American journal of therapeutics*, 12(1), 46-55.
- Griffiths, W. J., & Wang, Y. (2009). Mass spectrometry: From proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chemical Society Reviews*, 38(7), 1882-1896.
- Gross, J. H. (2006). *Mass spectrometry: A textbook*: Springer Science & Business Media.
- Hanzlik, R. P., Koen, Y. M., Theertham, B., Dong, Y., & Fang, J. (2007). The reactive metabolite target protein database (tpdb)—a web-accessible resource. *Bmc Bioinformatics*, 8(1), 95.
- Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T., & Zhang, H. (2014). Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1357, 36-52.

- Heard, K., Green, J. L., Anderson, V., Bucher-Bartelson, B., & Dart, R. C. (2016). Paracetamol (acetaminophen) protein adduct concentrations during therapeutic dosing. *British journal of clinical pharmacology*, 81(3), 562-568.
- Heard, K. J., Green, J. L., James, L. P., Judge, B. S., Zolot, L., Rhyee, S., & Dart, R. C. (2011). Acetaminophen-cysteine adducts during therapeutic dosing and following overdose. *BMC gastroenterology*, 11(1), 20.
- Hinson, J. A., Roberts, D. W., & James, L. P. (2010). Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. In *Adverse drug reactions* (pp. 369-405): Springer.
- Hinz, B., & Brune, K. (2006). Antipyretic analgesics: Nonsteroidal antiinflammatory drugs, selective cox-2 inhibitors, paracetamol and pyrazolinones. In *Analgesia* (pp. 65-93): Springer.
- Hjelle, J. J., Brzeznicka, E. A., & Klaassen, C. D. (1986). Comparison of the effects of sodium sulfate and n-acetylcysteine on the hepatotoxicity of acetaminophen in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 236(2), 526-534.
- Ho, C. S., Lam, C., Chan, M., Cheung, R., Law, L., Lit, L., . . . Tai, H. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 24(1), 3.
- Hofmann, A. F. (1999). The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Archives of internal medicine*, 159(22), 2647-2658.
- Horgan, R. P., & Kenny, L. C. (2011). 'Omic' technologies: Genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 13(3), 189-195.
- Huang, Y.-S. (2017). A novel biomarker and hepato-protector for acetaminophen-induced liver injury. *Journal of the Chinese Medical Association*.
- Ikehata, K., Duzhak, T. G., Galeva, N. A., Ji, T., Koen, Y. M., & Hanzlik, R. P. (2008). Protein targets of reactive metabolites of thiobenzamide in rat liver in vivo. *Chemical research in toxicology*, 21(7), 1432.

- Ilavenil, S., Al-Dhabi, N. A., Srigopalram, S., Ock Kim, Y., Agastian, P., Baru, R., . . . Valan Arasu, M. (2016). Acetaminophen induced hepatotoxicity in wistar rats—a proteomic approach. *Molecules*, 21(2), 161.
- Ishihara, M. (2001). Time-of-flight mass spectrometer. In: Google Patents.
- Ito, K.-i., Oleschuk, C. J., Westlake, C., Vasa, M. Z., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2001). Mutation of trp1254 in the multispecific organic anion transporter, multidrug resistance protein 2 (mrp2)(abcc2), alters substrate specificity and results in loss of methotrexate transport activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38108-38114.
- Jaeschke, H., Knight, T. R., & Bajt, M. L. (2003). The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology letters*, 144(3), 279-288.
- Jaeschke, H., McGill, M. R., & Ramachandran, A. (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews*, 44(1), 88-106.
- James, L. P., Mayeux, P. R., & Hinson, J. A. (2003). Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug metabolism and disposition*, 31(12), 1499-1506.
- Jedlitschky, G., Hoffmann, U., & Kroemer, H. K. (2006). Structure and function of the mrp2 (abcc2) protein and its role in drug disposition. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2(3), 351-366.
- Ju, C., & Uetrecht, J. (2002). Mechanism of idiosyncratic drug reactions: Reactive metabolites formation, protein binding and the regulation of the immune system. *Current drug metabolism*, 3(4), 367-377.
- Jungbauer, A., & Hahn, R. (2009). Ion-exchange chromatography. *Methods in enzymology*, 463, 349-371.
- Kalinec, G. M., Thein, P., Parsa, A., Yorgason, J., Luxford, W., Urrutia, R., & Kalinec, F. (2014). Acetaminophen and napqi are toxic to auditory cells via

- oxidative and endoplasmic reticulum stress-dependent pathways. *Hearing research*, 313, 26-37.
- Katajamaa, M., & Orešič, M. (2007). Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of chromatography A*, 1158(1), 318-328.
- Kirchmair, J., Göller, A. H., Lang, D., Kunze, J., Testa, B., Wilson, I. D., . . . Schneider, G. (2015). Predicting drug metabolism: Experiment and/or computation? *Nature reviews. Drug discovery*, 14(6), 387.
- Kitteringham, N. R., Jenkins, R. E., Lane, C. S., Elliott, V. L., & Park, B. K. (2009). Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *Journal of Chromatography B*, 877(13), 1229-1239.
- Knight, T. R., Ho, Y.-S., Farhood, A., & Jaeschke, H. (2002). Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: Protection by glutathione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(2), 468-475.
- Koen, Y. M., Gogichaeva, N. V., Alterman, M. A., & Hanzlik, R. P. (2007). A proteomic analysis of bromobenzene reactive metabolite targets in rat liver cytosol in vivo. *Chemical research in toxicology*, 20(3), 511-519.
- Koen, Y. M., Hajovsky, H., Liu, K., Williams, T. D., Galeva, N. A., Staudinger, J. L., & Hanzlik, R. P. (2012). Liver protein targets of hepatotoxic 4-bromophenol metabolites. *Chemical research in toxicology*, 25(8), 1777.
- Koen, Y. M., & Hanzlik, R. P. (2002). Identification of seven proteins in the endoplasmic reticulum as targets for reactive metabolites of bromobenzene. *Chemical research in toxicology*, 15(5), 699-706.
- Koen, Y. M., Sarma, D., Hajovsky, H., Galeva, N. A., Williams, T. D., Staudinger, J. L., & Hanzlik, R. P. (2013). Protein targets of thioacetamide metabolites in rat hepatocytes. *Chemical research in toxicology*, 26(4), 564.
- Korfmacher, W. A. (2005). Foundation review: Principles and applications of lc-ms in new drug discovery. *Drug discovery today*, 10(20), 1357-1367.

- La Du, B. N., Mandel, H. G., & Way, E. L. (1971). Fundamentals of drug metabolism and drug disposition.
- Lai, Y., Xing, L., Poda, G. I., & Hu, Y. (2007). Structure-activity relationships for interaction with multidrug resistance protein 2 (abcc2/mrp2): The role of torsion angle for a series of biphenyl-substituted heterocycles. *Drug metabolism and disposition*, 35(6), 937-945.
- Laine, J., Auriola, S., Pasanen, M., & Juvonen, R. (2009). Acetaminophen bioactivation by human cytochrome p450 enzymes and animal microsomes. *Xenobiotica*, 39(1), 11-21.
- Lancaster, E. M., Hiatt, J. R., & Zarrinpar, A. (2015). Acetaminophen hepatotoxicity: An updated review. *Archives of toxicology*, 89(2), 193-199.
- LeBlanc, A., Shiao, T.C., Roy, R. and Sleno, L. (2015). *Development of a sample enrichment protocol using click chemistry for identification of protein targets of reactive metabolites in liver microsomes*. Paper presented at the In 63rd ASMS Proceedings., Saint Louis, MO.
- Leiter, E. H., & Chapman, H. D. (1994). Obesity-induced diabetes (diabesity) in c57bl/ksj mice produces aberrant trans-regulation of sex steroid sulfotransferase genes. *Journal of Clinical Investigation*, 93(5), 2007.
- Li, G., & Hieftje, G. M. (1997). Time-of-flight mass spectrometer. In: Google Patents.
- Lin, C.-C., Luu, K., Lourenco, D., & Yeh, L.-T. (2003). Pharmacokinetics and metabolism of [14c] viramidine in rats and cynomolgus monkeys. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(8), 2458-2463.
- Liu, L., & Klaassen, C. D. (1996). Different mechanism of saturation of acetaminophen sulfate conjugation in mice and rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 139(1), 128-134.
- Martin, G. G., McIntosh, A. L., Huang, H., Gupta, S., Atshaves, B. P., Landrock, K. K., . . . Schroeder, F. (2013). The human liver fatty acid binding protein t94a

- variant alters the structure, stability, and interaction with fibrates. *Biochemistry*, 52(51), 9347-9357.
- Marzullo, L. (2005). An update of n-acetylcysteine treatment for acute acetaminophen toxicity in children. *Current opinion in pediatrics*, 17(2), 239-245.
- Masuda, T., Wada, Y., & Kawamura, S. (2016). Es1 is a mitochondrial enlarging factor contributing to form mega-mitochondria in zebrafish cones. *Scientific reports*, 6, 22360.
- McGill, M. R. (2013). *Acetaminophen hepatotoxicity in humans and mice*. University of Kansas,
- McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2013). Metabolism and disposition of acetaminophen: Recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical research*, 30(9), 2174-2187.
- McGill, M. R., Lebofsky, M., Norris, H.-R. K., Slawson, M. H., Bajt, M. L., Xie, Y., . . . Jaeschke, H. (2013). Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: Dose-response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicology and applied pharmacology*, 269(3), 240-249.
- McGill, M. R., Williams, C. D., Xie, Y., Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2012). Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: Comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 264(3), 387-394.
- McIntosh, A. L., Huang, H., Atshaves, B. P., Wellberg, E., Kuklev, D. V., Smith, W. L., . . . Schroeder, F. (2010). Fluorescent n-3 and n-6 very long chain polyunsaturated fatty acids three-photon imaging in living cells expressing liver fatty acid-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18693-18708.
- Methogo, R. M., Dansette, P. M., & Klarskov, K. (2007). Identification of liver protein targets modified by tienilic acid metabolites using a two-dimensional

- western blot-mass spectrometry approach. *International Journal of Mass Spectrometry*, 268(2), 284-295.
- Mitterberger, M. C., Kim, G., Rostek, U., Levine, R. L., & Zwerschke, W. (2012). Carbonic anhydrase iii regulates peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2. *Experimental cell research*, 318(8), 877-886.
- Modahl, L. E., & Lai, M. M. (2000). The large delta antigen of hepatitis delta virus potently inhibits genomic but not antigenomic rna synthesis: A mechanism enabling initiation of viral replication. *Journal of virology*, 74(16), 7375-7380.
- Mohammed, S., & Heck, A. J. (2011). Strong cation exchange (scx) based analytical methods for the targeted analysis of protein post-translational modifications. *Current opinion in biotechnology*, 22(1), 9-16.
- Moling, O., Cairon, E., Rimenti, G., Rizza, F., Pristerá, R., & Mian, P. (2006). Severe hepatotoxicity after therapeutic doses of acetaminophen. *Clinical therapeutics*, 28(5), 755-760.
- Mudge, G., Gemborys, M. W., & Duggin, G. (1978). Covalent binding of metabolites of acetaminophen to kidney protein and depletion of renal glutathione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 206(1), 218-226.
- Munoz, F. G., & Fearon, Z. (1984). Sex related differences in acetaminophen toxicity in the mouse. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 22(2), 149-156.
- Myint, K., Li, Y., Paxton, J., & McKeage, M. (2015). Multidrug resistance-associated protein 2 (mrp2) mediated transport of oxaliplatin-derived platinum in membrane vesicles. *PloS one*, 10(7), e0130727.
- Nebert, D. W., & Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes p450. *The Lancet*, 360(9340), 1155-1162.
- Nelson, S. D. (1995). Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. *Drug metabolism reviews*, 27(1-2), 147-177.

- Nerland, D. E., Cai, J., & Benz, F. W. (2003). Selective covalent binding of acrylonitrile to cys 186 in rat liver carbonic anhydrase iii in vivo. *Chemical research in toxicology*, 16(5), 583-589.
- Nourjah, P., Ahmad, S. R., Karwoski, C., & Willy, M. (2006). Estimates of acetaminophen (paracetomal)-associated overdoses in the united states. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 15(6), 398-405.
- Oberley, L. W., & Buettner, G. R. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer research*, 39(4), 1141-1149.
- Palmer, R. H. (1972). Bile acids, liver injury, and liver disease. *Archives of internal medicine*, 130(4), 606-617.
- Park, B. K., Boobis, A., Clarke, S., Goldring, C. E., Jones, D., Kenna, J. G., . . . Nelson, S. (2011a). Managing the challenge of chemically reactive metabolites in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(4), 292-306.
- Park, B. K., Boobis, A., Clarke, S., Goldring, C. E., Jones, D., Kenna, J. G., . . . Nelson, S. (2011b). Managing the challenge of chemically reactive metabolites in drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(4), 292.
- Parkinson, A., & Ogilvie, B. W. (2001). Biotransformation of xenobiotics. In: McGraw-Hill New York.
- Pelkonen, O., Pasanen, M., Tolonen, A., Koskinen, M., Hakkola, J., Abass, K., . . . Auriola, S. (2015). Reactive metabolites in early drug development: Predictive in vitro tools. *Current medicinal chemistry*, 22(4), 538-550.
- Pessayre, D. (1995). Role of reactive metabolites in drug-induced hepatitis. *Journal of hepatology*, 23, 16-24.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*.

- Qiu, Y., Benet, L. Z., & Burlingame, A. L. (1998). Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28), 17940-17953.
- Qureshi, N. A., Suthar, V., Magsi, H., Sheikh, M. J., Pathan, M., & Qureshi, B. (2017). Application of principal component analysis (pca) to medical data. *Indian Journal of Science and Technology*, 10(20).
- Ramachandran, A., Lebofsky, M., Weinman, S. A., & Jaeschke, H. (2011). The impact of partial manganese superoxide dismutase (sod2)-deficiency on mitochondrial oxidant stress, DNA fragmentation and liver injury during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 251(3), 226-233.
- Rauh, M. (2012). Lc-ms/ms for protein and peptide quantification in clinical chemistry. *Journal of Chromatography B*, 883, 59-67.
- Renner, S. W., Walker, L. M., Forsberg, L. J., Sexton, J. Z., & Brenman, J. E. (2017). Carbonic anhydrase iii (car3) is not required for fatty acid synthesis and does not protect against high-fat diet induced obesity in mice. *PloS one*, 12(4), e0176502.
- Richieri, G. V., Ogata, R. T., & Kleinfeld, A. M. (1994). Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe adifab. *Journal of Biological Chemistry*, 269(39), 23918-23930.
- Rieder, S. V., & Rose, I. A. (1959). The mechanism of the triosephosphate isomerase reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 234(5), 1007-1010.
- Riley, D. P. (1999). Functional mimics of superoxide dismutase enzymes as therapeutic agents. *Chemical reviews*, 99(9), 2573-2588.
- Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current protocols in molecular biology*, 30.32. 31-30.32. 24.

- Rogeberg, M., Malerod, H., Roberg-Larsen, H., Aass, C., & Wilson, S. R. (2014). On-line solid phase extraction–liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 87, 120-129.
- Saavedra, L., Hebert, E. M., Minahk, C., & Ferranti, P. (2013). An overview of “omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies. *Food research international*, 54(1), 925-934.
- Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., Tang, W. H., Keating, S. P., . . . Schaeffer, D. A. (2007). The paragon algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(9), 1638-1655.
- Shin, J.-H., Weitzdoerfer, R., Fountoulakis, M., & Lubec, G. (2004). Expression of cystathionine β -synthase, pyridoxal kinase, and es1 protein homolog (mitochondrial precursor) in fetal down syndrome brain. *Neurochemistry international*, 45(1), 73-79.
- Shin, N.-Y., Liu, Q., Stamer, S. L., & Liebler, D. C. (2007a). Protein targets of reactive electrophiles in human liver microsomes. *Chemical research in toxicology*, 20(6), 859-867.
- Shin, N.-Y., Liu, Q., Stamer, S. L., & Liebler, D. C. (2007b). Protein targets of reactive electrophiles in human liver microsomes. *Chemical research in toxicology*, 20(6), 859.
- Shlens, J. (2014). A tutorial on principal component analysis. *arXiv preprint arXiv:1404.1100*.
- Sigdel, T. K., Nicora, C. D., Hsieh, S.-C., Dai, H., Qian, W.-J., Camp, D. G., & Sarwal, M. M. (2014). Optimization for peptide sample preparation for urine peptidomics. *Clinical proteomics*, 11(1), 7.
- Snyder, A. P. (1996). Electrospray: A popular ionization technique for mass spectrometry. In: ACS Publications.

- Song, W.-C., Qian, Y., & Li, A. P. (1998). Estrogen sulfotransferase expression in the human liver: Marked interindividual variation and lack of gender specificity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(3), 1197-1202.
- Song, W., Moore, R., McLachlan, J., & Negishi, M. (1995). Molecular characterization of a testis-specific estrogen sulfotransferase and aberrant liver expression in obese and diabetogenic c57bl/ksj-db/db mice. *Endocrinology*, 136(6), 2477-2484.
- Srivastava, A., Maggs, J., Antoine, D., Williams, D., Smith, D., & Park, B. (2010). Role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity. In *Adverse drug reactions* (pp. 165-194): Springer.
- Stephens, C., Andrade, R. J., & Lucena, M. I. (2014). Mechanisms of drug-induced liver injury. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 14(4), 286-292.
- Stevenson, W. S., Hyland, C. D., Zhang, J.-G., Morgan, P. O., Willson, T. A., Gill, A., . . . Masters, S. L. (2010). Deficiency of 5-hydroxyisourate hydrolase causes hepatomegaly and hepatocellular carcinoma in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16625-16630.
- Strakova, J., Gupta, S., Kruger, W. D., Dilger, R. N., Tryon, K., Li, L., & Garrow, T. A. (2011). Inhibition of betaine-homocysteine s-methyltransferase in rats causes hyperhomocysteinemia and reduces liver cystathionine β -synthase activity and methylation capacity. *Nutrition research*, 31(7), 563-571.
- Strott, C. A. (1996). Steroid sulfotransferases. *Endocrine reviews*, 17(6), 670-697.
- Su, S., Duan, J., Wang, P., Liu, P., Guo, J., Shang, E., . . . Tang, Z. (2013). Metabolomic study of biochemical changes in the plasma and urine of primary dysmenorrhea patients using uplc-ms coupled with a pattern recognition approach. *Journal of proteome research*, 12(2), 852-865.
- Su, Y.-C., Tung, Y.-C., Sheu, S.-S., Lin, S.-C., & Chen, C.-T. (1995). High doses of acetaminophen elevate the hepatic levels of superoxide dismutase and catalase in mice. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 47(6), 555-565.

- Sun, J., Schnackenberg, L. K., Holland, R. D., Schmitt, T. C., Cantor, G. H., Dragan, Y. P., & Beger, R. D. (2008). Metabonomics evaluation of urine from rats given acute and chronic doses of acetaminophen using nmr and uplc/ms. *Journal of Chromatography B*, 871(2), 328-340.
- Talalay, P., De Long, M. J., & Prochaska, H. J. (1988). Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(21), 8261-8265.
- Tang, W. H., Shilov, I. V., & Seymour, S. L. (2008). Nonlinear fitting method for determining local false discovery rates from decoy database searches. *Journal of proteome research*, 7(9), 3661-3667.
- Tautenhahn, R., Cho, K., Uritboonthai, W., Zhu, Z., Patti, G. J., & Siuzdak, G. (2012). An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the metlin database. *Nature biotechnology*, 30(9), 826-828.
- Teng, Y.-W., Mehedint, M. G., Garrow, T. A., & Zeisel, S. H. (2011). Deletion of betaine-homocysteine s-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36258-36267.
- Tittarelli, R., Pellegrini, M., Scarpellini, M., Marinelli, E., Bruti, V., di Luca, N., . . . Zaami, S. (2017). Hepatotoxicity of paracetamol and related fatalities. *European review for medical and pharmacological sciences*, 21(1 Suppl), 95-101.
- Turley, S. D., & Dietschy, J. M. (1978). Re-evaluation of the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *Journal of Lipid Research*, 19(7), 924-928.
- Vance, M. A., Gray, P. D., & Tolman, K. G. (1994). Effect of glycine on valproate toxicity in rat hepatocytes. *Epilepsia*, 35(5), 1016-1022.

- Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J., & Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews*, 24(5), 613-646.
- Walgren, J. L., Mitchell, M. D., & Thompson, D. C. (2005). Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Critical reviews in toxicology*, 35(4), 325-361.
- Watkins, P. B., Kaplowitz, N., Slattery, J. T., Colonese, C. R., Colucci, S. V., Stewart, P. W., & Harris, S. C. (2006). Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of acetaminophen daily: A randomized controlled trial. *Jama*, 296(1), 87-93.
- Williams, A., & Frasca, V. (2001). Ion-exchange chromatography. *Current protocols in protein science*, 8.2. 1-8.2. 30.
- Winnike, J. H. (2010). *The metabolomics of acetaminophen toxicity observed in human biofluids and cultured primary human hepatocytes*. The University of North Carolina at Chapel Hill,
- Woolbright, B. L., & Jaeschke, H. (2016). Role of the inflammasome in acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure. *Journal of hepatology*.
- Woolbright, B. L., & Jaeschke, H. (2017). Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury. In *Cellular injury in liver diseases* (pp. 55-76): Springer.
- Xiao, J. F., Zhou, B., & Ransom, H. W. (2012). Metabolite identification and quantitation in lc-ms/ms-based metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 32, 1-14.
- Xie, Y., McGill, M. R., Cook, S. F., Sharpe, M. R., Winefield, R. D., Wilkins, D. G., . . . Jaeschke, H. (2015). Time course of acetaminophen-protein adducts and acetaminophen metabolites in circulation of overdose patients and in heparg cells. *Xenobiotica*, 45(10), 921-929.

- Xu, C., Li, C. Y.-T., & Kong, A.-N. T. (2005). Induction of phase i, ii and iii drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research*, 28(3), 249.
- Yin, P., Wan, D., Zhao, C., Chen, J., Zhao, X., Wang, W., . . . Xu, G. (2009). A metabonomic study of hepatitis b-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma by using rp-lc and hilic coupled with mass spectrometry. *Molecular BioSystems*, 5(8), 868-876.
- Yoshikawa, Y., Morita, M., Hosomi, H., Tsuneyama, K., Fukami, T., Nakajima, M., & Yokoi, T. (2009). Knockdown of superoxide dismutase 2 enhances acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat. *Toxicology*, 264(1), 89-95.
- Zafarullah, M., Li, W., Sylvester, J., & Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of n-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(1), 6-20.
- Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M.-C., & Yates III, J. R. (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews*, 113(4), 2343-2394.
- Zhao, L., & Pickering, G. (2011). Paracetamol metabolism and related genetic differences. *Drug metabolism reviews*, 43(1), 41-52.
- Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., & Ransom, H. W. (2012). Lc-ms-based metabolomics. *Molecular BioSystems*, 8(2), 470-481.
- Zhou, S., Chan, E., Duan, W., Huang, M., & Chen, Y.-Z. (2005). Drug bioactivation covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug metabolism reviews*, 37(1), 41-213.
- Zhou, S., Song, Q., Tang, Y., & Naidong, W. (2005). Critical review of development, validation, and transfer for high throughput bioanalytical lc-ms/ms methods. *Current pharmaceutical analysis*, 1(1), 3-14.
- Zuber, R., Anzenbacherova, E., & Anzenbacher, P. (2002). Cytochromes p450 and experimental models of drug metabolism. *Journal of cellular and molecular medicine*, 6(2), 189-198.