

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES LC-MS/MS POUR L'ANALYSE
D'ACIDES BILIAIRES LIÉE À L'HÉPATOTOXICITÉ CAUSÉE PAR
L'ACÉTAMINOPHÈNE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
VIVALDY PRINVILLE

OCTOBRE 2020

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

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner ma gratitude.

Je tiens à remercier toute ma reconnaissance à ma directrice de recherche, Lekha Sleno. Je la remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

Je profite de cette occasion pour adresser mes profonds remerciements aux responsables et aux personnels de l'Université du Québec à Montréal.

Un gros merci à mon épouse, Rébecca, qui m'a toujours encouragé et m'a accompagné tout au long de mon cheminement et aux enfants, Marissa, Mikaël, Nathanaël et Nellyanne, qui ont été une source de motivation. Je remercie mes parents et mes beaux-parents pour leur encouragement.

Je voudrais souligner mon appréciation envers mes collègues, Leanne, Timon, Maxime, Amal, Maggy et Ons qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

DÉDICACE

Je dédie mon travail de recherche à Dieu qui
m'a montré le chemin à suivre

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	x
Liste des symboles et des unités	xiv
RÉSUMÉ	xv
CHAPITRE I Introduction	16
1.1 Acides Biliaires.....	16
1.1.1 L'implication des sels biliaires	16
1.1.2 Structures chimiques des acides biliaires	17
1.1.3 Synthèse des acides biliaires	18
1.1.4 Régulation de la synthèse des acides biliaires.....	26
1.2 ACÉTAMINOPHÈNE	27
1.2.1 Paracétamol	27
1.2.2 Mécanisme de l'APAP dans le foie	28
1.2.3 Transport d'APAP.....	32
1.3 Spectrométrie de masse	33
1.3.1 Introduction à la chromatographie liquide	33
1.3.2 Spectrométrie de masse : un instrument puissant et ingénieux.....	34
1.3.3 Source d'ionisation : l'électronébulisation	35
1.3.4 Analyseur de masse : Quadripôle en tandem	36
1.3.5 Dissociation induite par collision.....	38
1.3.6 Modes de balayage pour la spectrométrie de masse en tandem avec un triple quadripôle	39

1.4	Projet de recherche — Développement de méthodes LC-MS-MS pour l'analyse d'acides biliaires liée à l'hépatotoxicité causée par l'acétaminophène.....	41
1.4.1	La recherche sur les acides biliaires.....	41
1.4.2	Objectif du projet de recherche.....	41
1.4.3	Optimisation des paramètres du MS pour analyse d'acides biliaires.....	44
1.4.4	Séparation des isomères d'acides biliaires.....	49
CHAPITRE II	Article-Targeted analysis of 46 bile acids to study the effect of acetaminophen in rat by lc-ms/m.....	51
2.1	Abstract.....	53
2.2	Introduction.....	55
2.3	Results and Discussion.....	57
2.4	Materials and Methods.....	65
2.4.1	Materials.....	65
2.4.2	Sample Preparation.....	68
2.4.3	LC-MS/MS.....	68
2.4.4	Statistical Analysis.....	71
2.5	Conclusion.....	72
2.6	Supplemental Information.....	74
CONCLUSION	75
RÉFÉRENCES	77

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Structures des acides les plus abondants chez l'humain, ainsi que la glycine et la taurine conjuguées	18
Figure 1.2 Étape de la synthèse initiale des acides biliaires	20
Figure 1.3 Modifications de la structure de l'anneau stérol dans la synthèse d'acides biliaires	23
Figure 1.4 Oxydation de la chaîne latérale dans la synthèse d'acides biliaires	24
Figure 1.5 Conjugaison de l'acide biliaire	25
Figure 1.6 Structure chimique de l'acétaminophène (paracetamol) et un dérivé, la phénacétine.....	28
Figure 1.7 Métabolisme et transport d'APAP dans le foie à des doses thérapeutiques	31
Figure 1.8 Mécanisme d'ionisation de l'électronébulisation	36
Figure 1.9 Analyseur quadripolaire du spectromètre de masse	37

- Figure 1.10 Diagramme montrant le système triple quadripôle. Le premier (Q1) et le troisième (Q3) sont des analyseurs de masse et celui du centre (Q2) est la cellule de collision 38
- Figure 1.11 Modes opérationnels de l'instrument triple quadripôle..... 40
- Figure 1.12 Les 14 acides biliaires utilisés pour le développement de méthode. acide chénodéoxycholique (CDCA); acide cholique (CA); acide déoxycholique (DCA); acide lithocholique (LCA); acide α -muricholique (α -MCA); acide tauro- α -muricholique (α -TMCA); acide glycodéoxycholique (GDCA); acide glycochénodéoxycholique (GDCA); acide glycocholique (GCA); acide taurodéoxycholique (TDCA); acide tauroolithocholique (TLCA); acide taurocholique (TCA)..... 43
- Figure 1.13 Spectre de balayage en Q1 de TCA en mode négatif (A) et en mode positif (B) 46
- Figure 1.14 Spectres MS/MS de TCA en mode négatif avec CE=80 (A) et en mode positif avec CE = 40 (B) 47
- Figure 1.15 Spectres d'optimisation des différentes transitions de TCA en mode négatif (A) et en mode positif (B)..... 48
- Figure 1.16 Chromatographies des isomères d'acides biliaires en mode négatif avec la colonne Kinetex 2,6 μ m Biphenyl 100x2.1mm (A), la colonne Luna 3 μ m PFP 100Å 150x2.0mm (B), la colonne Agilent (Zorbax) Extend C18 1,8 μ m 2.1x100mm (C) et la colonne Aeris Peptide 50

- Figure 2.1 Representative LC-MRM chromatograms in negative mode of a standard mixture containing 46 bile acids (using the most sensitive transition for each bile acid, as shown). Acronyms for each bile acid species are listed in the Abbreviations (and Methods) section. 59
- 2.3 Representative LC-MRM chromatograms from a 20 μ L injection of IS mix containing 0.013-0.1 μ M final concentration of each IS compound. (1) d4-GUDCA (2) d4-GCA (3) d4-TUDCA (4) d4-TCA (5) d4-CA (6) d4-UDCA (7) d4-GCDCA (8) d4-GDCA (9) d4-TCDC (10) d6-TDCA (11) d4-CDCA (12) d4-DCA (13) d4-GLCA (14) d4-LCA 61
- Figure 2.4 Peak area ratios for bile acids having significant changes between 75mg/kg and 600mg/kg APAP dosing, as measured in rat plasma after 24 h. * p-value < 0.05, **p-value < 0.01..... 63
- Figure 2.5 Unsupervised principal component analysis (PCA) of 39 bile acids detected in rat plasma samples (comparing four APAP dosing groups)..... 64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Table 1 Optimized MRM parameters for 46 bile acids along with their retention times	69
Table 2 Optimized MRM transitions and collision energies for 14 internal standards compounds, along with their respective retention times.....	72
Table 3 Comparison of p-values and fold-changes between the four doses of APAP administered in this study (using two MRM transitions for each peak) of known bile acids showing significant differences between the lowest and highest dose APAP	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

12-keto-DCA	12-ketodeoxycholic acid
12-keto-LCA	12-ketolithocholic acid
3-DHCA	3-dehydrocholic acid
6,7-diketo-LCA	6,7-diketolithocholic acid
7-keto-DCA	7-ketodeoxycholic acid
7-keto-LCA	7-ketolithocholic acid
ABC	transporteurs de cassette de liaison à l'ATP
ACA	allocholic acid
ACN	acetonitrile
ACOX1 et ACOX2	acyl-coenzyme A oxydase
AILCA	alloisolithocholic acid
AINS	médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens
APAP	acétaminophène
APCA	apocholic acid
BAREs	éléments de réponse d'acide biliaire
C ₂₇ 3 β -HSD	3 β -hydroxy- Δ^5 -C ₂₇ -steroid oxidoreductase
CA	acide cholique
CA	cholic acid
CDCA	acide chénodéoxycholique
CDCA	chenodeoxycholic acid
CE	collision d'énergie
CID	dissociation induite par collision
CL	chromatographie liquide
CLHP	chromatographie liquide haute performance
CLUHP	chromatographie liquide ultra haute performance
CYP7A1	cholestérol 7 α -hydroxylase
CYP8B1	stérol 12 α -hydroxylase
d ₄ -CA	cholic acid-d ₄
d ₄ -CDCA	chenodeoxycholic acid-d ₄
d ₄ -DCA	deoxycholic acid-d ₄
d ₄ -GCA	glycocholic acid-d ₄
d ₄ -GCDCA	glycochenodeoxycholic acid-d ₄

d ₄ -GDCA	glycodeoxycholic acid-d ₄
d ₄ -GLCA	glycolithocholic acid-d ₄
d ₄ -GUDCA	glycoursodeoxycholic acid-d ₄
d ₄ -LCA	lithocholic acid-d ₄
d ₄ -TCA	taurocholic acid-d ₄
d ₄ -TCDCa	taurochenodeoxycholic acid-d ₄
d ₄ -TUDCA	tauroursodeoxycholic acid-d ₄
d ₄ -UDCA	ursodeoxycholic acid-d ₄
d ₆ -TDCA	taurodeoxycholic acid-d ₆
DCA	acide déoxycholique
DCA	deoxycholic acid
DHCA	dehydrocholic acid
DHLCA	dehydrolithocholic acid
di-oxo-LCA	dioxolithocholic acid
ESI	électronébulisation
FGF-19	facteur de croissance des fibroblastes 19
FXR	récepteur farnésoid X
GCA	acide glycocholique
GCA	glycocholic acid
GCDCA	glycochenodeoxycholic acid
GDCA	acide glycochéno-déoxycholique
GDCA	acide glycodéoxycholique
GDCA	glycodeoxycholic acid
GDHCA	glycodehydrocholic acid
GHCA	glycohyocholic acid
GHDCa	glycohyodeoxycholic acid
GLCA	glycolithocholic acid
GSH	glutathion
GSTs	glutathione-S-transférases
GUDCA	glycoursodeoxycholic acid
HDCA	hyodeoxycholic acid
HNF-4 α	facteur nucléaire hépatocytaire-4 α
IDCA	isodeoxycholic acid
ILCA	isolithocholic acid
IS	internal standard
LCA	acide lithocholique
LCA	lithocholic acid
LC-MRM	chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse avec réaction multiple

LC-MRM	liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring
LRH-1	récepteur homolog-1 du foie
LXR	récepteur hépatique X
MeOH	methanol
MS	spectrométrie de masse
muro-CA	murocholic acid
NAPQI	N-acetyl- <i>p</i> -benzo-quinone imine
NCA	norcholic acid
NDCA	nordeoxycholic acid
NUDCA	norursodeoxycholic acid
PCA	analyse en composantes principales
PCA	principal component analysis
Q1	premier quadripôle
Q2	second quadripôle de cellule de collisions
Q3	troisième quadripôle analyseur de masse
SCL	transporteurs de solutés
SHP	petit partenaire hétérodimère
SULT	sulfotransférases
TCA	acide taurocholique
TCA	taurocholic acid
TCDCa	taurochenodeoxycholic acid
TDCA	acide taurodéoxycholique
TDCA	taurodeoxycholic acid
TDHCA	taurodehydrocholic acid
THCA	taurohyocholic acid
TLCA	acide taurolithocholique
TLCA	taurolithocholic acid
TUDCA	tauroursodeoxycholic acid
UCA	ursocholic acid
UDCA	ursodeoxycholic acid
UGT	enzyme UDP-glucuronosyl transférases
α -MCA	acide α -muricholique
α -MCA	α -muricholic acid
α -TMCA	acide tauro- α -muricholique
α -TMCA	tauro- α -muricholic acid
β -MCA	acide β -muricholique
β -MCA	β -muricholic acid
β -TMCA	acide tauro- β -muricholique

β -TMCA	tauro- β -muricholic acid
ω -MCA	ω -muricholic acid
ω -TMCA	tauro- ω -muricholic acid

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

%	pourcent
°C	degré Celsius
μL	microlitre
Å	angstrom
g	gramme
g/mol	gramme par mole
kg	kilogramme
<i>m/z</i>	ratio masse/charge
mg	milligramme
Micro (μ)	10 ⁻⁶
min	minute
mL	millilitre
rpm	révolution par minute

RÉSUMÉ

L'accumulation des acides biliaires à un niveau toxique peut causer des dommages importants au niveau du foie. L'acétaminophène (APAP), un médicament vendu en vente libre pris pour soulager la douleur et diminuer la fièvre, peut causer une intoxication au foie, même à des doses thérapeutiques s'il est ingéré sur une base régulière. Il a été démontré qu'il interférait dans la voie de synthèse des acides biliaires. Un instrument qui permet une analyse rapide et précise est nécessaire afin d'élucider l'effet de APAP sur le parcours des acides biliaires. Nous avons été en mesure de développer et d'optimiser une méthode quantitative par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse par observation de réactions multiples (LC-MRM) pour visualiser les conséquences des doses à différents niveaux de concentration de APAP sur les acides biliaires dans le plasma de rat. Nous avons pu analyser avec succès 46 acides biliaires par LC-MRM par une simple extraction de précipitation de protéine. Tous les isomères des acides biliaires ont été bien résolus et tous étaient facilement quantifiables. Nos résultats indiquent clairement que APAP joue un rôle majeur dans le métabolisme des acides biliaires. La quantité de la dose d'APAP dans le plasma des rats influence la concentration des acides biliaires, constatant que certains acides biliaires sont plus affectés que d'autres. L'analyse en composantes principales (PCA) nous révèle que l'APAP a un effet marquant à des doses de 600 mg/kg comparativement à ceux plus bas. Notre approche métabolique peut être utilisée pour bénéficier d'une meilleure compréhension de l'effet de l'APAP sur la voie de synthèse des acides biliaires.

Mots clés : Spectromètre de masse, acétaminophène, acides biliaires, métabolomique

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Acides Biliaires

1.1.1 L'implication des sels biliaires

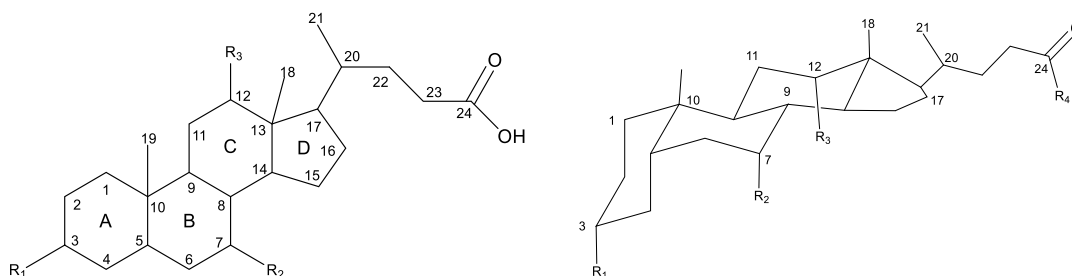
Les acides biliaires appelés aussi sels biliaires sont des dérivés polaires du cholestérol formés à partir d'une série de réactions enzymatiques. Ils sont produits dans le foie et stockés dans la vésicule biliaire. Ils sont par la suite libérés dans l'intestin via le canalicule biliaire. Ils jouent un rôle important dans le processus pathologique et physiologique de l'animal. Les acides biliaires aident aussi à faciliter l'absorption des lipides et du gras et l'assimilation des vitamines liposolubles. Les acides biliaires émulsifient les graisses en petites micelles, ce qui permet d'augmenter la surface accessible aux lipases. Donc, ils favorisent la solubilisation de produits de digestion de lipides. La sécrétion de sels biliaires par le foie s'avère être le seul mécanisme d'élimination du cholestérol.

Ils sont surtout impliqués dans le cycle entérohépatique. Le cycle entérohépatique implique que le foie détruit ou transforme les éléments pour être éliminé dans la bile dans l'intestin. Elle est ensuite réabsorbée à 95 % par l'intestin grêle et retourne au foie par la veine hépatique (Staels et Fonseca, 2009).

1.1.2 Structures chimiques des acides biliaires

Les acides biliaires ont une structure moléculaire dérivée d'un système tétracyclique hydrocarbonperhydrocyclopentanophenanthrene saturé, aussi appelé noyau stéroïde. C'est aussi le squelette d'autres familles de composés comme les hopanoïdes, les brassinostéroïdes (Clouse, 2011), les triterpénoïdes (Connolly et Hill, 2008), les hormones. Le noyau stéroïde consiste d'un anneau à six membres (A, B and C) et d'un anneau à 5 membres (D) avec une structure courbée ou plane selon la transition *cis* ou *trans* (Figure 1.1). La plus importante de ses propriétés est le transport de lipides par solubilisation et l'excrétion de cholestérol par le tractus digestif pour lequel il est peu absorbé. Ces propriétés sont dues à l'existence d'un côté hydrophile et d'un côté hydrophobe. Le ratio entre son côté hydrophobe et hydrophile diffère considérablement entre les différentes molécules d'acides biliaires (Monte *et al.*, 2009). Cette différence dans le rapport signifie que les acides biliaires n'interagissent pas de la même façon avec d'autres substances dans la solubilisation des phospholipides, du cholestérol et autres lipides.

Squelette stéroïdique



Nom des principaux acides biliaires	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Acide cholanique	H	H	H	OH
Acide cholique	OH	OH	OH	OH
Acide chenodéoxycholique	OH _(α)	OH _(α)	H	OH
acide déoxycholique	OH	OH	OH	OH
acide ursodéoxycholique	OH _(β)	OH _(β)	H	OH
acide lithocholique	OH	H	H	OH
acide glycocholique	OH	OH	OH	NHCH ₂ COO
acide taurocholique	OH	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃

Figure 1.1 Structures des acides les plus abondants chez l'humain, ainsi que la glycine et la taurine conjuguées (Monte et al., 2009)

1.1.3 Synthèse des acides biliaires

Dix-sept enzymes sont directement impliquées à la conversion du cholestérol en acide biliaire. Environ 500 mg de cholestérol est converti en acides biliaires dans le foie d'un adulte (Russell, D. W., 2003). Plusieurs de ces enzymes sont exprimés

principalement dans le foie. Les acides biliaires primaires comme l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique sont les produits générés dans le foie. Chez les rongeurs, l'acide chénodéoxycholique est converti en acide α -muricholique et acide β -muricholique (Hu *et al.*, 2014). Les acides biliaires primaires sont transformés en acides biliaires secondaires, l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique, par la flore bactérienne du tube digestif (Hylemon et Harder, 1998).

Dans la voie classique, le cholestérol est converti en 7α -hydroxycholesterol par cholestérol 7α -hydroxylase (CYP7A1), un enzyme microsomal du cytochrome P450 qui se trouve seulement dans le foie (Figure 2) (Russell, D. W., 2003). Cette enzyme a une préférence particulière pour le cholestérol comme substrat (Miyake *et al.*, 2001). L'hydroxylation du cholestérol à 3 positions différentes de la chaîne latérale produit 24-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol et 27-hydroxycholesterol. Ces oxystérols servent comme substrat pour la synthèse d'acides biliaires (Russell, D., 2000).

Pour être convertie en acide biliaire, une étape nécessaire d'hydroxylation en position 7α est catalysée par 2 autres enzymes microsomaux du cytochrome P450 (CYP39A1 oxysterol 7α -hydroxylase et CYP7B1 oxysterol 7α -hydroxylase) (Figure 1.2) (Russell, D. W., 2003). CYP39A1 oxysterol 7α -hydroxylase agit sur 24(S)—hydroxycholesterol. La contribution de cette enzyme à la synthèse d'acides biliaires n'a pas encore été déterminée. Mais, il a été constaté que ARNm de cette enzyme est abondant et constamment exprimé dans le foie de la souris et de l'humain (Li-Hawkins *et al.*, 2000). La conversion du 25-hydroxycholesterol et 27-hydroxycholesterol aux intermédiaires des acides biliaires est catalysée par CYP7B1 oxysterol 7α -hydroxylase (Figure 1.2). La voie du CYP7B1 oxysterol 7α -hydroxylase synthétise de 25 % à 30 % des acides biliaires chez les souris, mais seulement 5 % à 10 % chez l'humain (Schwarz M, 1998).

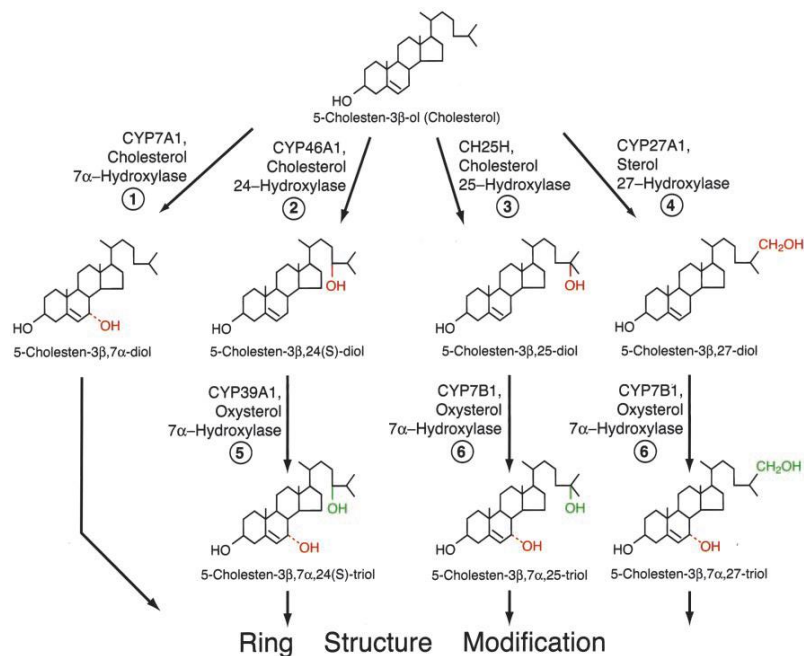


Figure 1.2 Étape de la synthèse initiale des acides biliaires (Russell, D. W., 2003)

Il y a ensuite modification de l'anneau. Les intermédiaires du 7 α -hydroxylés dérivés du cholestérol et de l'oxystérol sont les prochains à être convertis sous leur forme 3-oxo, Δ^4 par la microsomal 3 β -hydroxy- Δ^5 -C₂₇-steroid oxidoreductase (C₂₇ 3 β -HSD) (Figure 1.3). Une perte de cette enzyme bloque la synthèse de tous les acides biliaires. C₂₇ 3 β -HSD chez l'humain et la souris est un enzyme lié à la membrane contenant 369 acides aminés qui partage environ 34 % de son identité séquentielle avec C₁₉ et C₂₇ 3 β -HSD impliqué dans la biosynthèse d'hormones de stéroïdes (Schwarz *et al.*, 2000). L'enzyme C₂₇ 3 β -HSD agira seulement sur les stérols avec un groupement 7 α -hydroxyle, il dépend par conséquent du cholestérol et du oxystérol 7 α -hydroxylases.

Le produit de l'enzyme C₂₇ 3 β -HSD peut prendre 2 chemins qui amènent à la synthèse d'acides biliaires. Si l'intermédiaire est en réaction avec l'enzyme stérol 12 α -hydroxylase (CYP8B1) (Figure 1.3), le produit sera converti systématiquement

en acide cholique. En l'absence de 12α -hydroxylation, c'est plutôt l'acide chénodéoxycholique ou d'autres acides biliaires qui sont formés. Le niveau de l'enzyme stérol 12α -hydroxylase dans le foie détermine la quantité relative des 2 acides biliaires primaires.

Les intermédiaires du 12α -hydroxylés et ceux produits par C_{27} 3β -HSD subissent une réduction du lien double dans l'anneau-A par l'enzyme Δ^4 -3-oxostéroïde 5β -réductase (Figure 1.3). Il utilise NADH comme cofacteur. Il catalyse les réactions d'oxydation-réduction à partir de substrats endogènes ou xénobiotiques. La dernière étape de la modification de l'anneau implique une réduction du groupement 3-oxo en alcool et est catalysée par 3α -hydrostéroïde déshydrogénase (Figure 1.3).

Les produits de la modification de l'anneau entament une oxydation progressive et une diminution de la chaîne latérale du stérol (Figure 1.4). Les premières étapes de cette voie commencent par le stérol 27 -hydroxylase, le même qui amorce la synthèse d'acides biliaires à travers la formation de 27 -hydroxycholestérol. L'enzyme introduit un groupement hydroxyle au carbone 27 et par la suite oxyde ce groupement en aldéhyde. L'alcool déshydrogénase catalyse la réaction d'oxydation. La participation du stérol 27 -hydroxylase dans l'initiation de la chaîne latérale d'oxydation signifie qu'il doit réagir avec l'enzyme avant la formation des acides biliaires indépendamment de leur origine. Un mauvais fonctionnement du stérol 27 -hydroxylase accumule du cholestanol, un dérivé toxique du cholestérol (Seyama, 2003). Les intermédiaires d'acides biliaires oxydés provenant du stérol 27 -hydroxylase sortent de la mitochondrie et sont les prochains à subir un raccourcissement de la chaîne latérale. Les 3 atomes de carbone terminal sont retirés dans les peroxysomes par une série de réactions analogues à ceux impliqués dans la β -oxydation des acides gras (Reddy et Hashimoto, 2001).

La première réaction est catalysée par bile acid coenzyme A ligase qui active les intermédiaires de stérol en le conjuguant avec le coenzyme A (Figure 1.4). Very long-chain coenzyme A synthetase et very long-chain acyl-coenzyme A synthetase homolog 2 sont des enzymes identifiés pour ces activités (Melton *et al.*, 2011). Ils activent également de très longues chaînes d'acides gras contenant au minimum 18 carbones. Very long-chain coenzyme A synthetase est responsable de l'activation des intermédiaires C₂₇ de la biosynthèse des acides biliaires (Figure 1.4). Very long-chain acyl-coenzyme A synthetase homolog 2 est impliqué dans l'activation des acides biliaires C₂₄ qui sont déconjugués dans le petit intestin et retournés dans le foie par la circulation entérohépatique (Mihalik *et al.*, 2002).

Dans la voie de biosynthèse des acides biliaires, les atomes de carbones en position 25 des intermédiaires sont prochirales, c'est-à-dire 2 groupements méthyls équivalents comme substituant. Stérol 27-hydroxylase arrive à reconnaître la non-équivalence des 2 groupements méthyls et catalyse en produisant presque qu'exclusivement l'isomère 25 (R) (Gustafsson et Sjostedt, 1978). Après l'activation des intermédiaires avec la coenzyme A par bile acide ligase, les isomères 25 (R) sont convertis en isomères 25 (S) avant que le raccourcissement de la chaîne puisse être entamé. 2-methylacyl-coenzyme A racemase catalyse cette réaction (Figure 1.4). Cette enzyme agit également du côté de la chaîne des acides gras. Une mutation de cette enzyme amène une accumulation des intermédiaires des acides gras (Kotti *et al.*, 2000).

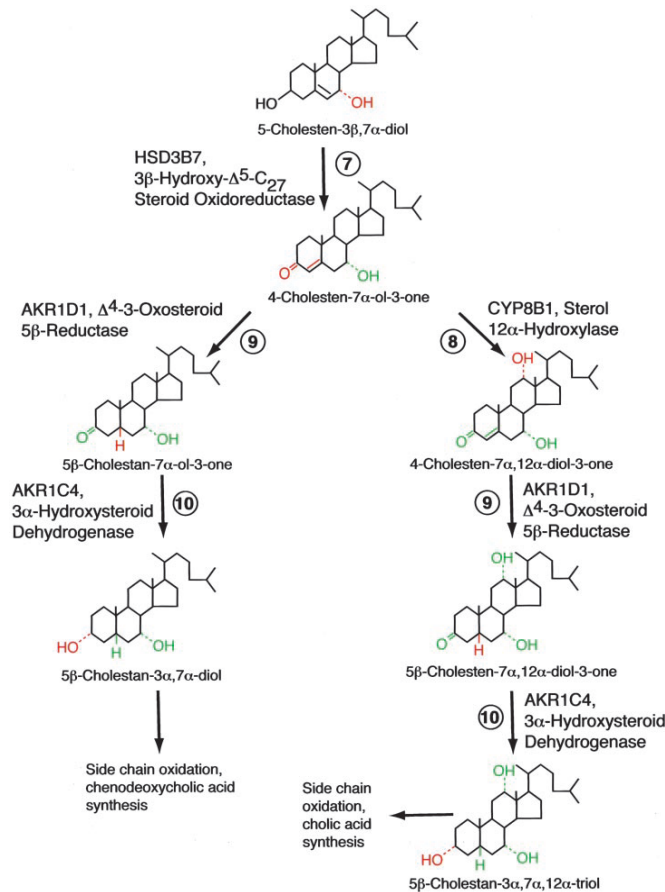


Figure 1.3 Modifications de la structure de l'anneau stérol dans la synthèse d'acides biliaires (Russell, D. W., 2003)

Les produits déhydrogénés du stérol de l'enzyme racemase sont catalysés par une enzyme FAD-contenant chaîne ramifiée acyl-coenzyme A oxydase pour engendrer des dérivés non-saturés 24,25— trans (Figure 1.4). L'enzyme transfère les électrons à une molécule d'oxygène et produit du peroxyde d'hydrogène comme sous-produit. Il y a 2 enzymes reliés à acyl-coenzyme A oxydase (ACOX1 et ACOX2) dans l'humain et le rat. ACOX1 déhydrogénise les chaînes linéaires d'acides gras et d'eicosanoïdes

(Baes *et al.*, 2002). ACOX2 agit sur les intermédiaires dans la voie de synthèse des acides biliaires et la chaîne ramifiée 2-méthyl des acides gras.

La prochaine étape de la biosynthèse implique une réaction d'hydratation et d'oxydation au lien Δ^{24} et est catalysé par une protéine D-bifonctionnelle (Figure 1.4). Cette enzyme péroximale de 736 acides aminés catalyse à la fois les étapes de réaction d'hydratation en ajoutant une molécule d'eau à travers le double lien pour former un intermédiaire alcool C_{24} . La réaction d'oxydation de cette alcool forme le produit C_{24} -oxo (Figure 1.4). La dernière étape d'oxydation de la chaîne latérale des intermédiaires des acides biliaires est catalysée par peroxysomal thiolase 2, qui clive le lien $C_{24} - C_{25}$ pour former propionyl-coenzyme A et un intermédiaire d'acides biliaires C_{24} -coenzyme A (Figure 1.4).

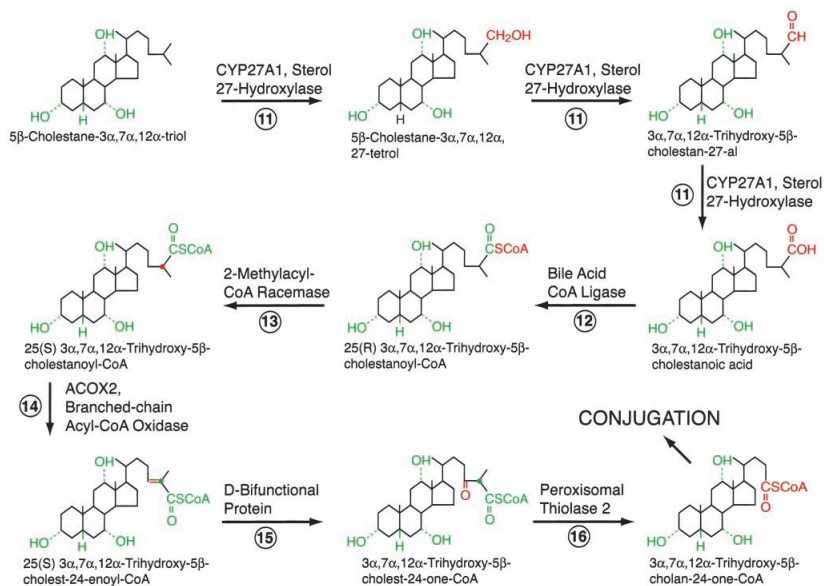


Figure 1.4 Oxydation de la chaîne latérale dans la synthèse d'acides biliaires (Russell, D.W., 2003)

La dernière étape de la synthèse d'acides biliaires amène l'addition de la glycine ou taurine au carbone 24 (Figure 1.5). Cette réaction est catalysée par l'enzyme amino acide N-acyltransférase. Les acides biliaires excrétés du foie sont à 98 % groupés à la glycine ou la taurine, ce qui montre la grande efficacité de cette enzyme. Les substrats du N-acyltransférase est bile acide coenzyme A thioester ou la glycine et taurine. Le ratio de glycine/taurine conjugués chez l'humain est dépendant de l'abondance relative des 2 acides aminés et n'a aucune conséquence sur le fonctionnement et la régulation. Le ratio d'acides aminés non conjugués et conjugués peut être contrôlé par PPAR α qui active coenzyme A thioesterase 2 pour catalyser la réaction d'hydrolyse de bile acide coenzyme A thioesters en acides biliaires et coenzyme A (Hunt *et al.*, 2002). La conjugaison d'acides biliaires augmente l'amphiphile et améliore la solubilité des molécules, ce qui les rend imperméables à la membrane cellulaire.

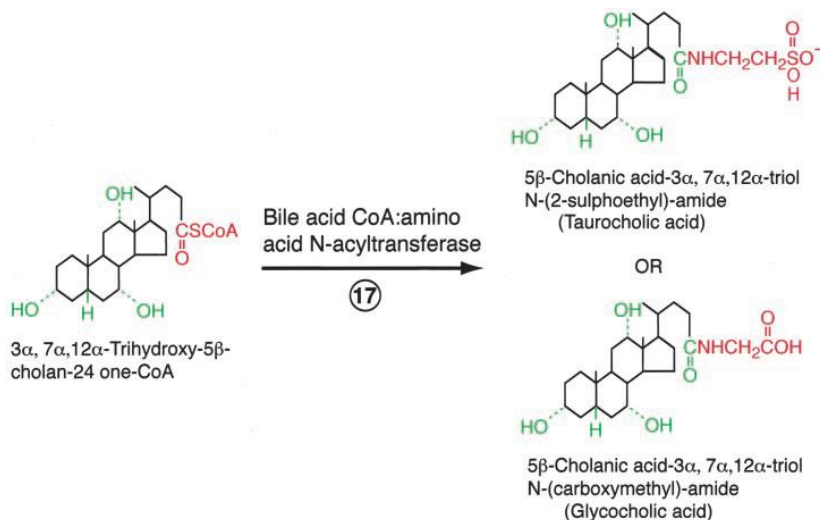


Figure 1.5 Conjugaison de l'acide biliaire (Russell, D. W., 2003)

1.1.4 Régulation de la synthèse des acides biliaires

Les acides biliaires exercent une rétroaction négative sur leur propre synthèse particulièrement en inhibant l'activité et l'expression de CYP7A1 (Heuman DM, 1989; Pandak *et al.*, 1994). Les enzymes du cytochrome P450 CYP7A1, CYP8B1 et CYP27A1 impliqués dans la synthèse d'acides biliaires sont sujet à une rétroaction négative de la régulation par les acides biliaires, qui est principalement médiée par le récepteur farnésoid X (FXR). FXR est un capteur qui protège le foie de la toxicité de l'acide biliaire en régulant la transcription de gènes impliqués dans l'homéostasie des acides biliaires (Insook Kim, 2007). Lors de l'activation par des acides biliaires hydrophobiques comme CDCA, FXR augmente l'expression du répresseur transcriptionnel du petit partenaire hétérodimère (SHP) (Lew *et al.*, 2004). SHP interagit négativement avec d'autres facteurs de transcription, le récepteur homolog-1 du foie (LRH-1) et le facteur nucléaire hépatocytaire-4 α (HNF-4 α), qui se lie aux éléments de réponse d'acide biliaire (BAREs) situé dans la région promoteur du gène de CYP7A1 et CYP8B1 (Stroup *et al.*, 1997; Yang Y, 2002). Cela amène une répression de la synthèse d'acides biliaires (Lu *et al.*, 2000). Aussi, la sécrétion de facteur de croissance des fibroblastes 19 (FGF-19) et son récepteur FGFR4 contrôlent la synthèse d'acides biliaires.

Le cholestérol régularise son propre catabolisme en acides biliaires au niveau transcriptionnel. Les oxystérols activent le récepteur hépatique X (LXR), qui en retour contrôle l'expression de CYP7A1 dans le foie du rat. Cependant, LXR n'a pas vraiment d'effet sur CYP7A1 de l'humain en raison d'une faible réponse des éléments LXR dans le gène de ce dernier (Chiang *et al.*, 2001).

Les hormones et les composantes exogènes peuvent affecter la synthèse des acides biliaires. L'insuline régule vers le bas certains enzymes de la voie de biosynthèse

comme CYP7A1 et CYP27A1 (Twisk *et al.*, 1995). Les hormones de la thyroïde augmentent le gène de transcription CYP7A1 chez le rat (Ness et Lopez, 1995), mais chez l'humain, les résultats restent controversés.

1.2 ACÉTAMINOPHÈNE

1.2.1 Paracétamol

APAP, aussi appelé paracétamol (structure chimique en Figure 1.6), est synthétisé en 1878 par Morse et utilisé pour la première fois en clinique par von Mering. Il a été rapidement écarté en faveur de la phénacétine. Les études de Brodie et d'Axelrod ont amené à la redécouverte et mise en marché dans les années 1950 aux États-Unis comme un analgésique remplaçant la phénacétine condamné à cause de sa néphrotoxicité (Bertolini *et al.*, 2006). Des inquiétudes non fondées ont retardé le fait que sa réapparition ne soit acceptée et répandue avant les années 1970. Depuis ce temps, APAP est devenue un des médicaments les plus utilisés retrouvés en vente libre pour les traitements de fièvre et de douleur.

APAP occupe une position unique parmi les analgésiques. Contrairement aux médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), APAP est plutôt inefficace dans les inflammations et aussi dans les douleurs très intenses. Comparativement aux opiacés, il est inefficace contre l'augmentation de la douleur d'un spasme musculaire et n'a aucun effet dépressur sur la respiration. De plus, il ne produit pas de

dommages gastro-intestinaux ou de problèmes cardio-rénaux indésirables (Bertolini *et al.*, 2006).

APAP est très sécuritaire lorsque la posologie est bien suivie. Mais à des doses élevées, il devient toxique. Très fréquemment utilisé pour le soulagement de douleur ou de fièvre, la toxicité d'APAP compte pour 46 % de tous les causes d'insuffisance hépatique aiguë aux États-Unis et entre 40 et 70 % de tous les cas dans le Royaume-Uni et l'Europe (Lee, 2017). Sa toxicité entraîne encore plus de décès reliés à une insuffisance hépatique aiguë que toutes les prescriptions de médicaments combinés.

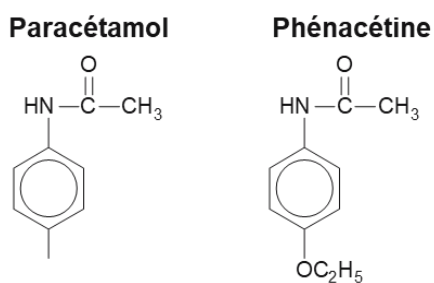


Figure 1.6 Structure chimique de l'acétaminophène (paracétamol) et un dérivé, la phénacétine

1.2.2 Mécanisme de l'APAP dans le foie

Le foie, l'intestin et le rein sont les organes majeurs impliqués dans le métabolisme d'APAP (Bessemis et Vermeulen, 2001). L'acétaminophène pris oralement est absorbé en grande partie dans l'intestin grêle par le transport passif. Il est métabolisé dans le foie par glucuronidation (52-57 %) et par sulfatation (30-44 %) pour devenir des conjugués non toxiques. Moins de 5 % d'APAP excrétés sont non modifiés

(Prescott, 1983). Une partie est également oxydée par le système de l'enzyme cytochrome P450 pour former un métabolite hautement toxique, N-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI). Dans des conditions normales, NAPQI est détoxiqué par la conjugaison avec le glutathion (GSH) pour former APAP-GSH, qui est excrété par l'urine conjuguée avec la cystéine et l'acide mercapturique (APAP-cys) (Bessems et Vermeulen, 2001). L'excrétion d'APAP requiert un transport complexe des métabolites entre le foie, le rein et l'intestin à travers la bile et le système sanguin pour être éliminée par l'urine ou par les matières fécales. NAPQI est formé dans le foie. Les reins métabolisent aussi APAP en NAPQI et le conjuguent avec la cystéine pour le relâcher dans la bile et dans le sang pour être éliminés par l'urine. Dans le foie, la plupart des glucuronides et des métabolites sulfatés sont transportés dans les reins par le système sanguin, tandis que APAP-gluc apparaît dans la bile et est transporté vers l'intestin. Le rein est l'endroit principal où est disposé l'APAP sulfaté qui sont directement excrétés ou qui sont biotransformés pour finalement être disposé par excrétion rénale (Bessems et Vermeulen, 2001).

Cependant, à des doses très élevées (plus grand que 4 g/jour), la voie de sulfation devient saturée. La glucuronidation et l'oxydation augmentent et une petite quantité d'APAP sécrétée est inchangée. Après une dose toxique d'APAP, la glucuronidation devient saturée et une plus grande portion d'APAP éliminé est inchangée (environ 10 %) et sont oxydés en NAPQI (Figure 1.7). Un excès de NAPQI épuise la réserve de GSH accumulé et commence à former des adduits de protéines en se liant à un groupement cystéine sur les protéines des cellules. NAPQI cible principalement les protéines mitochondriales et les canaux d'ions amenant à la perte de production d'énergie et à la mort cellulaire (Hodgman et Garrard, 2012).

La voie de glucuronidation du métabolisme d'APAP est catalysée par l'enzyme UDP-glucuronosyl transférases (UGT) (Hodgman et Garrard, 2012). UGT rend la molécule d'APAP plus soluble dans l'eau en transférant le groupe glucuronosyl à partir de

l'acide UDP glucuronique. Des études ont démontré que UGT1A1, UGT1A6, UGT1A9 et UGT2B15 sont impliqués dans la glucuronidation d'APAP (Bock *et al.*, 1993; Court *et al.*, 2001). UGT1A6 est important à basse concentration d'APAP tandis que UGT1A9 et UGT1A1 contribue plus à des doses toxiques (Court *et al.*, 2001; Mutlib *et al.*, 2006).

Une famille d'enzyme cytosolique appelé sulfotransférases (SULT) effectue la sulfations d'APAP. Les enzymes SULT transfèrent un groupe sulfate du substrat de PAPS à APAP pour le rendre plus polaire et plus facile pour son élimination. Les enzymes SULT1A1 et SULT1A3/4 ont démontré la catalyse de la réaction de sulfations d'APAP (Reiter C, 1982). Dans le foie d'un fœtus, les enzymes SULT1E1 et SULT2A1 effectue la sulfations d'APAP en plus des enzymes SULT1A1 et SULT1A3/4. L'enzyme SULT1A3/4 semble jouer un rôle majeur dans la sulfations d'APAP; cependant, dans le développement post-natal, c'est plutôt SULT1E1 et SULT2A1 qui jouent ce rôle (Adjei *et al.*, 2008).

Les enzymes du Cytochrome P450 catalysent l'oxydation de l'APAP à NAPQI (Bessemis et Vermeulen, 2001). La contribution exacte des différentes isoformes de CYP dans l'activation d'APA varie et dépend de la concentration de la drogue dans les microsomes du foie. CYP2E1 et CYP1A2 convertissent de grandes doses d'APAP en NAPQI dans les microsomes humains du foie (Raucy *et al.*, 1989). La conjugaison de NAPQI à GSH s'effectue par un processus spontané et une réaction enzymatique catalysée par glutathione-S-transférases (GSTs) (Geib *et al.*, 2019). Une réaction non enzymatique amène aussi à la conjugaison avec GSH, 3-(glutathione-S-yl)acetaminophen (APAP-GSH), un produit de réduction d'APAP sans modification. Chez la famille des GSTs, GSTP1 est le plus efficace pour catalyser la conjugaison de NAPQI avec GSH, suivi par GSTT1 et GSTM1 (Coles *et al.*, 1988). Durant la réaction de réduction de NAPQI, le plus efficace est GSTT1, suivi de GSTM1 et GSTP1.

Le métabolisme d'APAP est dépendant du genre (les femmes l'éliminent plus lentement) et de l'âge (risque plus élevé d'hépatotoxicité chez les personnes âgées). Une personne âgée de 80 ans peut être exposée à 1,5 fois la concentration de NAPQI comparativement à une personne de 20 ans ayant eu la même dose d'APAP. Il y a aussi la génétique d'un individu qui peut agir sur la variation du métabolisme (Twycross *et al.*, 2013).

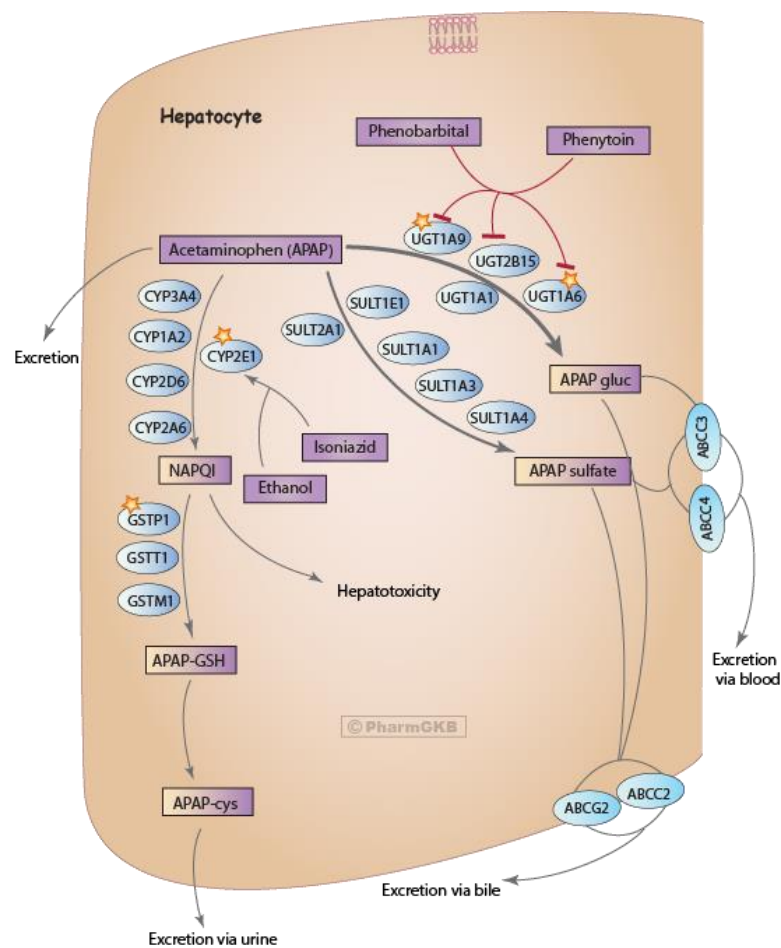


Figure 1.7 Métabolisme et transport d'APAP dans le foie à des doses thérapeutiques (Mazaleuskaya *et al.*, 2015)

1.2.3 Transport d'APAP

L'élimination d'APAP passe par son transport à travers différents types de cellules. Contrairement à l'APAP sous sa forme entière, le déplacement des métabolites d'APAP exige des transporteurs. Deux superfamilles de transporteurs, les transporteurs de solutés (SCL) et les transporteurs de cassette de liaison à l'ATP (ABC) interagissent pour le déplacement de l'APAP (Barnes *et al.*, 2007). Les transporteurs ABC régularisent l'écoulement de substrats à partir de la cellule tandis que les transporteurs SLC sont responsables de l'absorption du substrat dans la cellule. L'excrétion d'APAP-gluc et sulfatée dans la bile implique les transporteurs ABCCE et ABCG2 retrouvés dans la membrane canaliculaire des hépatocytes. Le déplacement de APAP-gluc dans le sang dépend du transporteur ABCC3, tandis que les métabolites sulfatés reposent sur ABCC3 et ABCC4 situés dans le côté sinusoidal des cellules hépatiques. Il a été constaté qu'il y a augmentation du niveau de protéine de ABCB1, ABCG2, ABCC4 et ABCC5 dans le foie des patients ayant une overdose d'APAP (Barnes *et al.*, 2007). Un accroissement de l'expression de ces transporteurs liés à l'écoulement est une adaptation pour arrêter l'accumulation de métabolites toxiques dans la cellule pour prévenir des dommages additionnels. Cette réponse adaptative, en raison du niveau toxique d'APAP, résulte d'une résistance aux attaques répétitives sur le foie. Ce qui amène une autoprotection et développe une tolérance à des doses chroniques et létales d'APAP (Tredger *et al.*, 1995).

1.3 Spectrométrie de masse

1.3.1 Introduction à la chromatographie liquide

La chromatographie liquide (CL) se définit simplement comme étant la séparation de mélange de composés basé sur le taux auquel ils éluent d'une phase stationnaire sur un gradient de phase mobile. Des affinités différentes des composants des mélanges pour la phase stationnaire et mobile conduisent à leur séparation. Certains composés seront plus attirés par la phase mobile et ils élueront plus rapidement tandis que d'autres seront retenus par la phase stationnaire plus longtemps, donc, élueront plus lentement. C'est-à-dire un temps de rétention plus tardif.

En chromatographie liquide à haute performance (CLHP), deux réservoirs de solvant (solvant A et B) vont servir de phase mobile. Le solvant A est constitué d'un mélange aqueux et le solvant B d'une solution organique. Deux pompes sont utilisées comme système de distribution de solvant qui génèrent et mesurent le débit. Une vanne de séparation de solvant permet le mélange des solvants A et B à un ratio précis et à un intervalle de temps. Un échantillonneur automatique injecte l'échantillon au courant de la phase mobile (souvent en plus forte concentration aqueuse) qui l'achemine jusqu'à la colonne analytique. Des tubes et raccords pour haute pression sont utilisés pour connecter la pompe, le système d'échantillonneur automatique, la colonne analytique et le détecteur. Ils forment ainsi un conduit pour l'échantillon, la phase mobile et les composants séparés de l'échantillon.

Dans le cas d'une CLHP en phase inverse, la colonne typique utilisée est emballée de particules de silica-C₁₈H₃₇ qui agit comme une phase stationnaire non polaire. À un

moment précis pendant la séparation CLHP, le solvant B est introduit à la phase mobile en augmentant le ratio graduellement, accroissant ainsi la teneur organique du solvant. Ceci entraîne l'élution du composé retenu par la phase stationnaire non polaire. Un détecteur enregistre le signal du composé élué. Ce signal est amplifié et livré à un ordinateur qui traite et affiche les données sous forme de chromatogramme. (Allwood et Goodacre, 2010)

1.3.2 Spectrométrie de masse : un instrument puissant et ingénieux

La spectrométrie de masse (MS) est l'instrument vedette de cette nouvelle ère moderne au niveau de la recherche. Il a contribué à de nombreuses découvertes en chimie, en biochimie et en physique. La MS est très utilisée dans l'industrie, spécialement pour la découverte et la quantification de drogues, pour le contrôle qualité, etc. Son gros avantage est dû au fait qu'il permet une identification directe des molécules basée sur le ratio masse/charge (m/z) et les modèles de fragmentations.

Le principe général de la MS est la séparation d'une espèce chargée électriquement sous sa phase gazeuse. Cette espèce chargée est produite dans la source. L'ion sous forme gazeuse est transféré dans l'analyseur de masse. Ce dernier trie les ions dans le temps ou l'espace selon le ratio m/z . Cette séparation d'ions est repérée par un détecteur d'ion. Le signal électrique produit par le détecteur d'ion est procédé pour donner un spectre de masse. Le spectre de masse donne de l'information sur le nombre d'ions à différentes valeurs m/z . Les ions détectés peuvent correspondre aux molécules originales, à leurs fragments et à d'autres espèces formées durant le processus d'ionisation. Il permet alors d'analyser quantitativement les ions tout en ayant une grande sélectivité (Urban, 2016).

1.3.3 Source d'ionisation : l'électronébulisation

L'électronébulisation (ESI) a émergé comme une technique importante de source d'ionisation des ions. Elle procure la sensibilité, la robustesse et s'avère être un outil fiable pour étudier, à des quantités aussi petites que femtomole avec les volumes de microlitre d'échantillons, des molécules biologiques non volatiles et thermolabiles qui sont impossibles d'analyser par d'autres techniques conventionnelles. Couplé à la CLHP, il permet d'analyser les petites et grosses molécules de différentes polarités dans un échantillon biologique complexe. Avec l'addition de la capacité de séparation de l'analyseur en masse, la purification des échantillons difficiles et les procédures de dérivation habituellement utilisée en chromatographie gazeuse sont beaucoup plus simplifiées avec l'ESI.

ESI utilise une énergie électrique pour assister au transfert d'ions à partir d'une solution transformée en phase gazeuse avant d'être analysée par MS (figure 1.8). Ainsi, les molécules ionisées en solution peuvent être analysées par ESI-MS avec une excellente sensibilité. Le transfert d'ions d'une solution à sa phase gazeuse par ESI implique la dispersion d'une vaporisation de gouttelettes chargées, suivi de l'évaporation du solvant et l'éjection de l'ion à partir de gouttelettes hautement chargées (Ho *et al.*, 2003).

Dans la source ESI, une vapeur continue de solution d'échantillon, passant à travers un tube capillaire en acier inoxydable ou en silice de quartz, est maintenue à une haute tension. Un brouillard de gouttelettes hautement chargées est généré avec la même polarité que la tension du capillaire. L'application d'un gaz nébulisant comme l'azote, cisailant autour de la solution d'échantillon élué, augmente le débit de l'échantillon. Les gouttelettes chargées, générées à la sortie de la pointe de l'électrospray, passent à travers un gradient de pression et un gradient de potentiel à

travers la région de l'analyseur du spectromètre de masse. Avec l'aide d'une température élevée de la source ESI et du courant d'azote, les gouttelettes chargées sont continuellement réduites en taille par l'évaporation du solvant, amenant à une augmentation de la densité de la surface de charge. Le champ électrique dans la gouttelette chargée atteint un point critique dans lequel il est possible aux ions à la surface de la gouttelette d'être éjectés dans la phase gazeuse. Les ions émis sont échantillonnés par une écumeoire (« skimmer » en anglais) et sont par la suite accélérés jusqu'à l'analyseur de masse (Ho *et al.*, 2003).

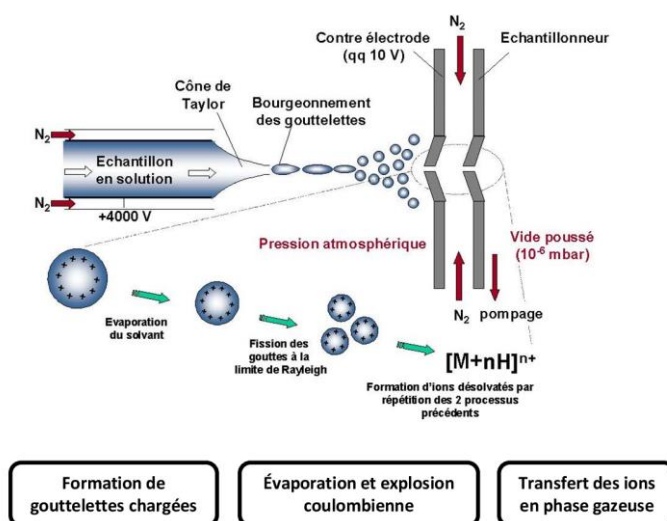


Figure 1.8 Mécanisme d'ionisation de l'électronébulisation (Beuvier, 2016)

1.3.4 Analyseur de masse : Quadripôle en tandem

L'analyseur quadripolaire est formé de 4 tiges métalliques parallèles (Figure 1.9). Une combinaison de tensions électriques constantes et variables (radiofréquence) permet la transmission d'une bande étroite de valeurs m/z le long de la tige. En variant la tension électrique en fonction du temps, il est possible de balayer à travers une gamme de valeurs m/z , soldant en un spectre de masse. La plupart des analyseurs

quadripolaires fonctionnent à plus petit que 4000 m/z et la vitesse de balayage peut atteindre jusqu'à 5000 m/z par seconde (Pitt, 2009).

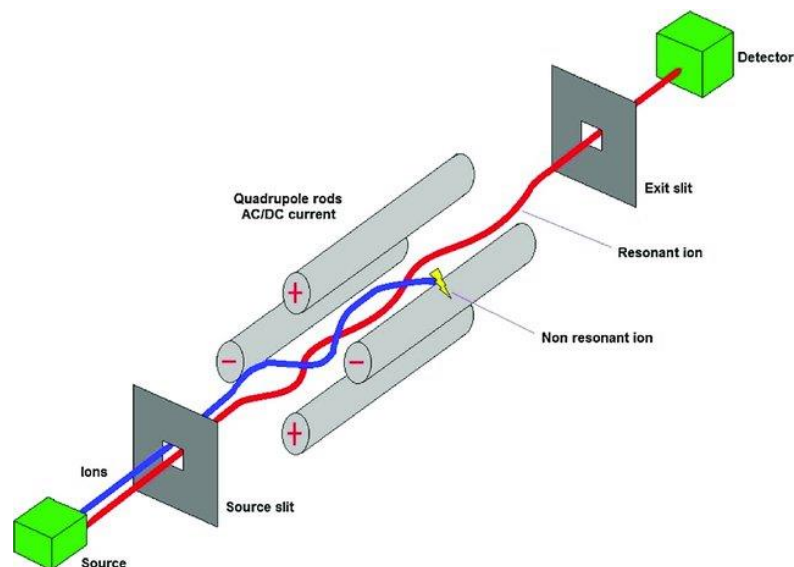


Figure 1.9 Analyseur quadripolaire du spectromètre de masse (Santoiemma, 2018)

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) invoque 2 étapes de l'analyse de masse conjointe à un processus de dissociation ou une réaction chimique qui cause un changement au niveau de la masse ou de la charge de l'ion.

En général, la spectrométrie de masse comporte 2 analyseurs de masses, permettant ainsi de réaliser les expériences MS/MS. Le type d'instrument fréquemment utilisé fonctionne avec des quadripôles comme analyseur. Dans un quadripôle en tandem, il y a 3 quadripôles installés linéairement appelés « triple quad » (Figure 1.10). La masse de l'analyte d'intérêt, appelé ion précurseur, est sélectionnée au premier quadripôle (Q1). Cet ion précurseur entre en collision avec un gaz de collision dans un second quadripôle de cellule de collisions (Q2) émettant des radios fréquences

seulement à l'endroit où il est fragmenté. Ce processus se nomme dissociation induite par collision (CID). Les ions fragmentés résultants du CID sont directement reliés à la structure moléculaire de l'ion primaire et peuvent être sélectionnés par un troisième quadripôle analyseur de masse (Q3). Ce tandem est souvent noté comme MS/MS (Ho *et al.*, 2003)

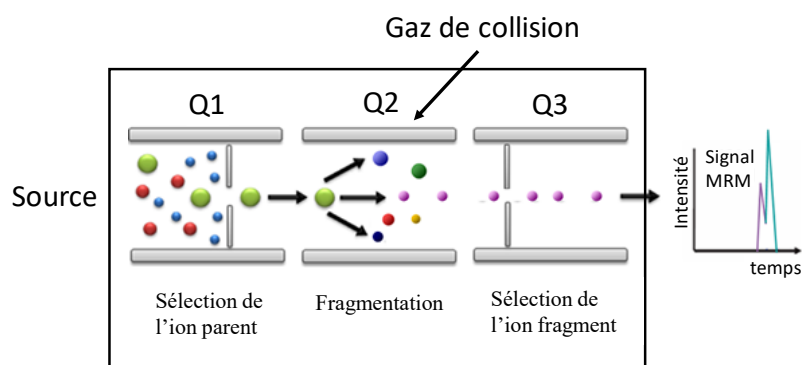


Figure 1.10 Diagramme montrant le système triple quadripôle. Le premier (Q1) et le troisième (Q3) sont des analyseurs de masse et celui du centre (Q2) est la cellule de collision (Boja et Rodriguez, 2011)

1.3.5 Dissociation induite par collision

La spectrométrie de masse en tandem exige la fragmentation de l'ion précurseur sélectionné par le premier analyseur afin de permettre le second analyseur de sonder les produits d'ions. Cette technique de CID permet d'augmenter le nombre d'ions précurseurs qui se fragmentent dans la région de la réaction ainsi que les possibilités de fragmentations. Donc, il est plus facile d'élaborer une analyse structurale de la molécule. Le processus du CID se fait globalement en deux étapes. La première

correspond à la collision entre l'ion et la cible, l'amenant à un état d'excitation. La seconde étape est la décomposition unimoléculaire de l'ion activé (Jennings, 2000; Shukla et Futrell, 2000).

Différentes méthodes existent pour activer les collisions des ions. Le plus commun consiste de percuter les ions accélérés à faible ou haute énergie avec une molécule gazeuse comme cible immobile. Une cellule de collision est placée entre les deux analyseurs de masse afin permettre le processus collisionnel dans l'instrument MS/MS. Cette cellule correspond à une petite chambre contenant un gaz inerte à une pression suffisante pour entraîner les collisions avec les ions (Jennings, 2000).

1.3.6 Modes de balayage pour la spectrométrie de masse en tandem avec un triple quadripôle

Il y a 4 modes principales de balayage d'ions disponibles en utilisant un spectromètre de masse en tandem (Figure 1.11).

Le premier est le balayage des ions fragments (« product ion scan »). Il consiste à sélectionner l'ion précurseur afin de déterminer tous les produits d'ions résultant du CID. Ensuite, le balayage des ions parents (« precursor ion scan ») repose sur le fait de choisir le produit ionique afin de trouver l'ion précurseur. Ce mode demande la focalisation du second analyseur sur un ion sélectionné pendant le balayage de la masse au premier analyseur. Tous les ions précurseurs qui produisent des ions avec une masse sélectionnée à travers la réaction ou la fragmentation sont détectés. Il y a également le balayage en perte de neutre (« neutral loss scan ») qui consiste à choisir un fragment neutre et à détecter toutes les fragmentations amenant à la perte de ce

neutre. Ce balayage requiert que les 2 analyseurs de masses analysent en même temps mais, tout en gardant un décalage constant de la masse entre les 2. Donc, pour une différence de masse x , lorsqu'un ion de masse m passe à travers le premier analyseur de masse, la détection s'accomplit si cet ion produit un ion fragmenté de la masse $(m-x)$ quand il quitte la cellule de collision. Et pour terminer, la multi reaction monitoring (MRM) qui consiste à sélectionner une réaction de fragmentation. Dans cette analyse, les 2 analyseurs de masse se focalisent sur les masses sélectionnées. Les ions choisis par le premier analyseur de masse sont seulement détectés s'ils produisent un fragment donné par une réaction sélectionnée. L'absence de balayage permet de se focaliser sur les ions précurseurs et fragmentés sur une plus longue période, augmentant ainsi la sensibilité et la sélectivité de l'ion monitoré.

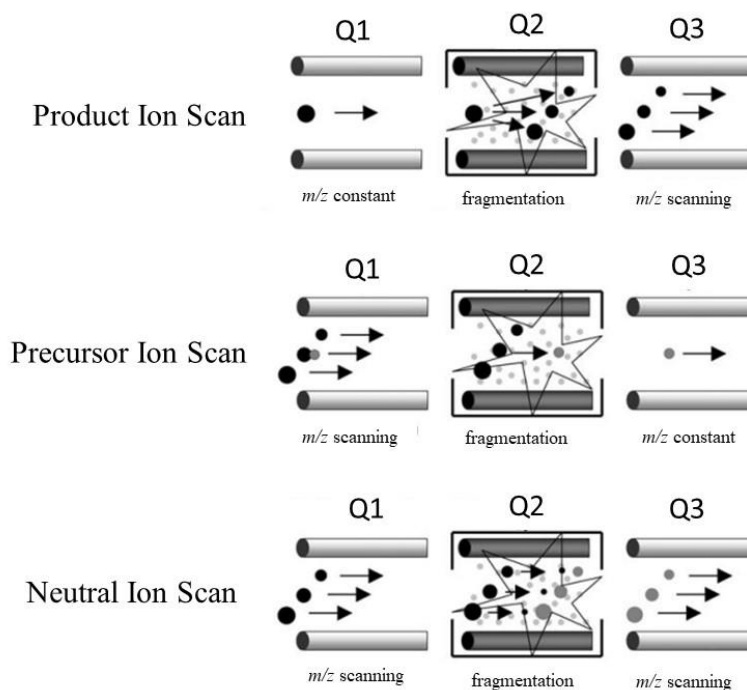


Figure 1.11 Modes opérationnels de l'instrument triple quadripôle (Zeller et König, 2004)

1.4 Projet de recherche — Développement de méthodes LC-MS-MS pour l'analyse d'acides biliaires liée à l'hépatotoxicité causée par l'acétaminophène

1.4.1 La recherche sur les acides biliaires

Les acides biliaires amènent un intérêt grandissant dans le milieu scientifique. Même si sa découverte date de plusieurs décennies, on continue de découvrir d'autres fonctionnalités complexes qui lui caractérisent. Les acides biliaires auraient des influences sur la régulation du métabolisme du glucose (Shapiro *et al.*, 2018), sur la réponse immunitaire (Pols *et al.*, 2017). Il a aussi été démontré le rôle des acides biliaires sur la régénération du foie après une overdose d'APAP (Bhushan *et al.*, 2013). Ils peuvent également être utilisés comme un excellent biomarqueur pour le pronostic d'une concentration élevée d'APAP chez les patients (Woolbright *et al.*, 2014) ou de problèmes reliés à une maladie du foie (Luo *et al.*, 2018). Plusieurs articles scientifiques récents ont permis une séparation des acides biliaires primaires, secondaires et conjugués en utilisant la spectrométrie de masse pour la quantification (Mi *et al.*, 2016; Scherer *et al.*, 2009; Wegner *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

1.4.2 Objectif du projet de recherche

Dans nos précédents projets, notre laboratoire de recherche a étudié l'effet toxique du NAPQI (Geib *et al.*, 2019; LeBlanc *et al.*, 2014), un produit du métabolisme d'APAP. Étant donné que nous savons que le foie joue un rôle important dans le métabolisme

d'APAP, il était logique de poursuivre nos recherches pour analyser son action sur la concentration des différents acides biliaires. Dans le chapitre sur les acides biliaires, nous avons démontré son impact important dans la physiologie animale et de sa toxicité lorsqu'il y a accumulation dans l'organisme. Certaines études ont démontré l'effet de l'APAP sur les acides biliaires (Bhushan *et al.*, 2013; James *et al.*, 2015). Notre travail de recherche s'est concentré sur le développement d'une méthode analytique par CLHP-MS afin d'analyser la concentration des acides biliaires à partir de plasmas de rat à différentes doses d'APAP (75, 150, 300 et 600 mg/kg) collectés 24 h après administration par voie intraveineuse. Nous avons commencé le développement de la méthode avec 14 acides biliaires (Figure 1.12). Plusieurs études ont développé une méthode analytique sur MS (Garcia-Canaveras *et al.*, 2012; Yudai Suzuki, 2013). Ce qui distingue notre méthode des autres déjà existantes est l'excellente résolution obtenue avec les isomères ainsi que le nombre d'acides biliaires qui est envisageable d'analyser (46 acides biliaires) en une seule injection. De plus, notre méthode d'analyse permet d'ajouter d'autres acides biliaires (autres que ceux analysés) tout en gardant une très bonne séparation pour les molécules isomériques.

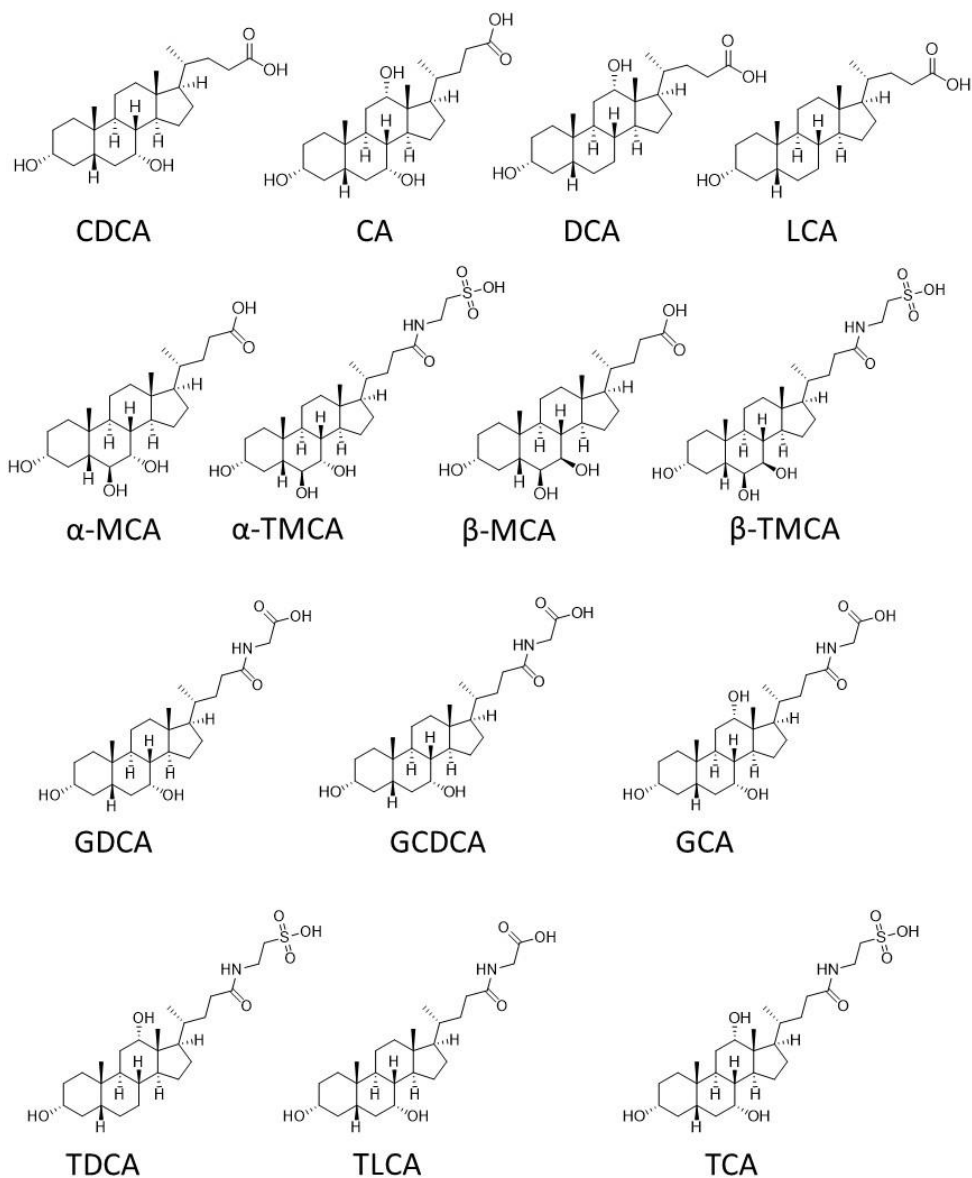


Figure 1.12 Les 14 acides biliaires utilisés pour le développement de méthode. acide chénodéoxycholique (CDCA) ; acide cholique (CA) ; acide déoxycholique (DCA) ; acide lithocholique (LCA) ; acide α -muricholique (α -MCA) ; acide tauro- α -muricholique (α -TMCA) ; acide glycodéoxycholique (GDCA) ; acide glyochénodéoxycholique (GCDCA) ; acide glyocholique (GCA) ; acide taurodéoxycholique (TDCA) ; acide taurolithocholique (TLCA) ; acide taurocholique (TCA)

1.4.3 Optimisation des paramètres du MS pour analyse d'acides biliaires

Nous avons utilisé comme instrument un système de chromatographie liquide ultra haute performance (CLUHP) Nexera (Shimadzu, Columbia, MD). Elle permet de réduire significativement le temps d'acquisition tout en gardant une excellente résolution à pression élevée. Ceci résulte de l'utilisation de la colonne contenant des particules de diamètre pouvant être aussi petit que 2 μ m (Chesnut et Salisbury, 2007). La CLUHP est couplée à un système QTRAP 5500 (Sciex, Concord, ON, Canada). Le QTRAP permet au troisième quadripôle d'opérer en ayant une double fonction (quadripôle et trappe ionique linéaire). Ce spectromètre de masse possède l'avantage d'offrir la possibilité de détecter les acides biliaires à des concentrations aussi basses de l'ordre de 1 μ g/mL.

L'optimisation des paramètres est une étape importante permettant d'obtenir la meilleure sensibilité et un signal stable de notre analyte d'intérêt à des fins d'analyse. L'optimisation a été faite en mode négative et positive, c'est-à-dire que notre source ESI transfère un proton (mode positive) ou enlève un proton (mode négative) pour former des ions. En connaissant la masse exacte (mono-isotopique) de l'acide biliaire à analyser, il est possible de le confirmer à partir d'un spectre MS notre analyte d'intérêt. En infusant un acide biliaire à une concentration de 1 μ g/mL, un balayage en Q1 nous a permis de confirmer la présence de l'analyte et d'identifier sa masse précurseur exacte. La figure 1.13 nous montre un exemple du spectre lorsque l'acide taurocholique (TCA) est infusé dans le MS. En sachant sa masse exacte (515,29 g/mol), nous avons été en mesure d'identifier l'ion moléculaire ayant un m/z de 514,3 en mode négatif et un m/z de 516,3 en mode positif.

Ensuite, il nous a fallu déceler les fragments associés à notre acide biliaire en ajustant le paramètre de collision d'énergie (CE). Ceci entraîne une fragmentation de l'ion moléculaire. En comparant le patron isotopique de TCA en mode négatif et en mode positif de la figure 1.14, on peut noter une différence au niveau du nombre de fragments. Ces informations supplémentaires nous donnent la position des liaisons et sa structure moléculaire. Le paramètre CE est optimisé pour chacun des fragments obtenus du TCA en mode négatif et en mode positif (Figure 1.15) pour finalement seulement garder les 2 transitions les plus abondantes pour notre méthode analytique sur MS.

. Une méthode pseudo-MRM, dans laquelle est sélectionnée le même ion produit comme ion parent, doit être employée pour les isomères non conjugués et les stéréoisomères comme LCA (m/z 375-375) et CDCA ou UDCA (m/z 391-391). Ces acides biliaires non conjugués ne possèdent pas de groupe 12-hydroxyl. Ils se sont simplement fragmentés par déshydratation et déshydrogénation et n'ont présenté aucun fragment discriminant, quels que soient les sites et l'épimérisation des groupes hydroxyle sur le squelette. Pour DCA et CA, il est possible de caractériser un mécanisme de fragmentation distinctive du groupement 12-hydroxyl. Ce groupement induit la rotation de la chaîne latérale du carboxylate et le proton se transfère entre le groupement 12-hydroxyl et 24-carboxyl durant l'électronébulisation (Lan *et al.*, 2016). Cette dissociation permet de les distinguer des autres avec une méthode MRM. Plusieurs articles ont employé ces transitions pour l'analyse d'acides biliaires (Garcia-Canaveras *et al.*, 2012; Tagliacozzi *et al.*, 2003; Xiaohan Caia, 2012; Yudai Suzuki, 2013)

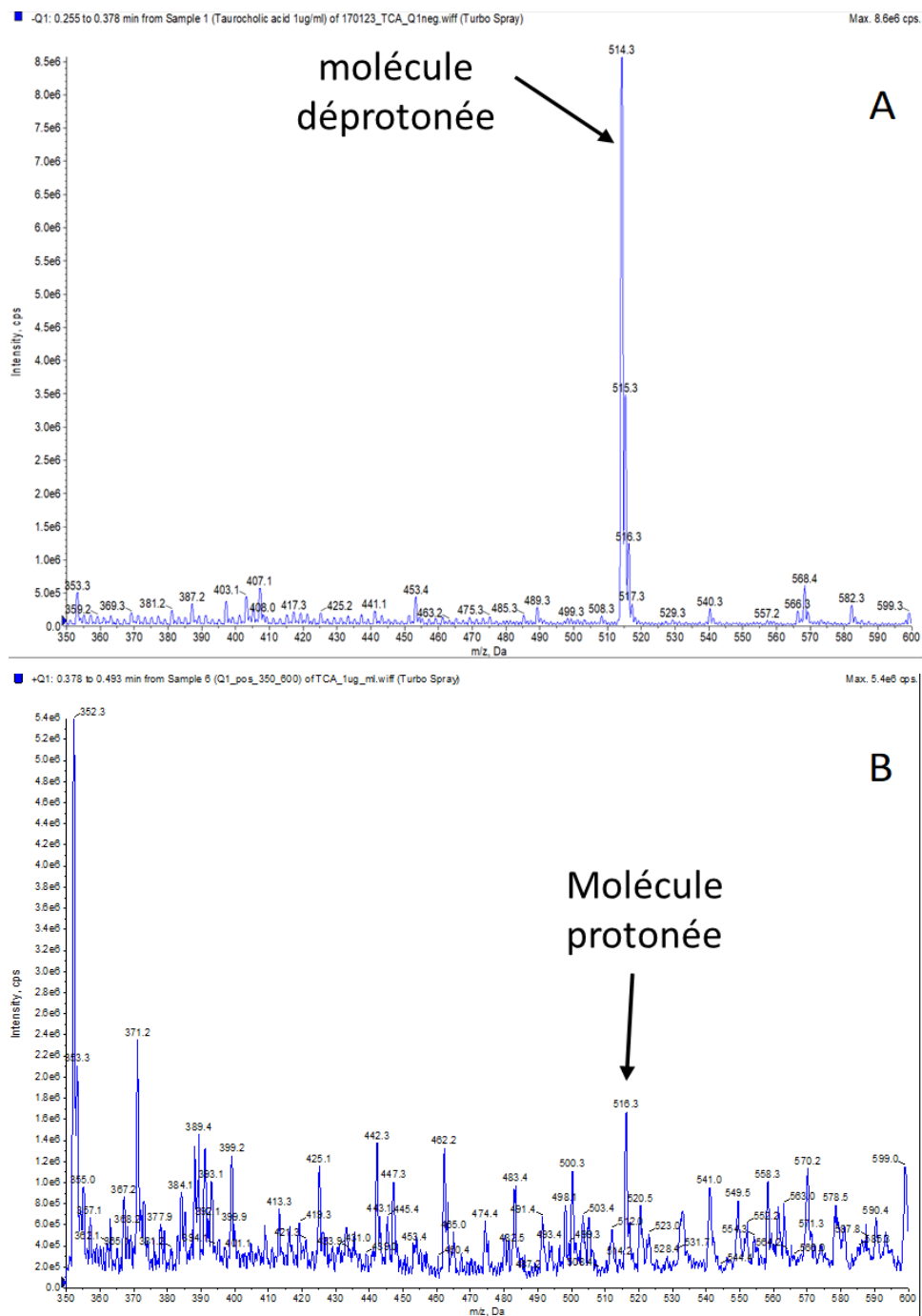


Figure 1.13 Spectre de balayage en Q1 de TCA en mode négatif (A) et en mode positif (B)

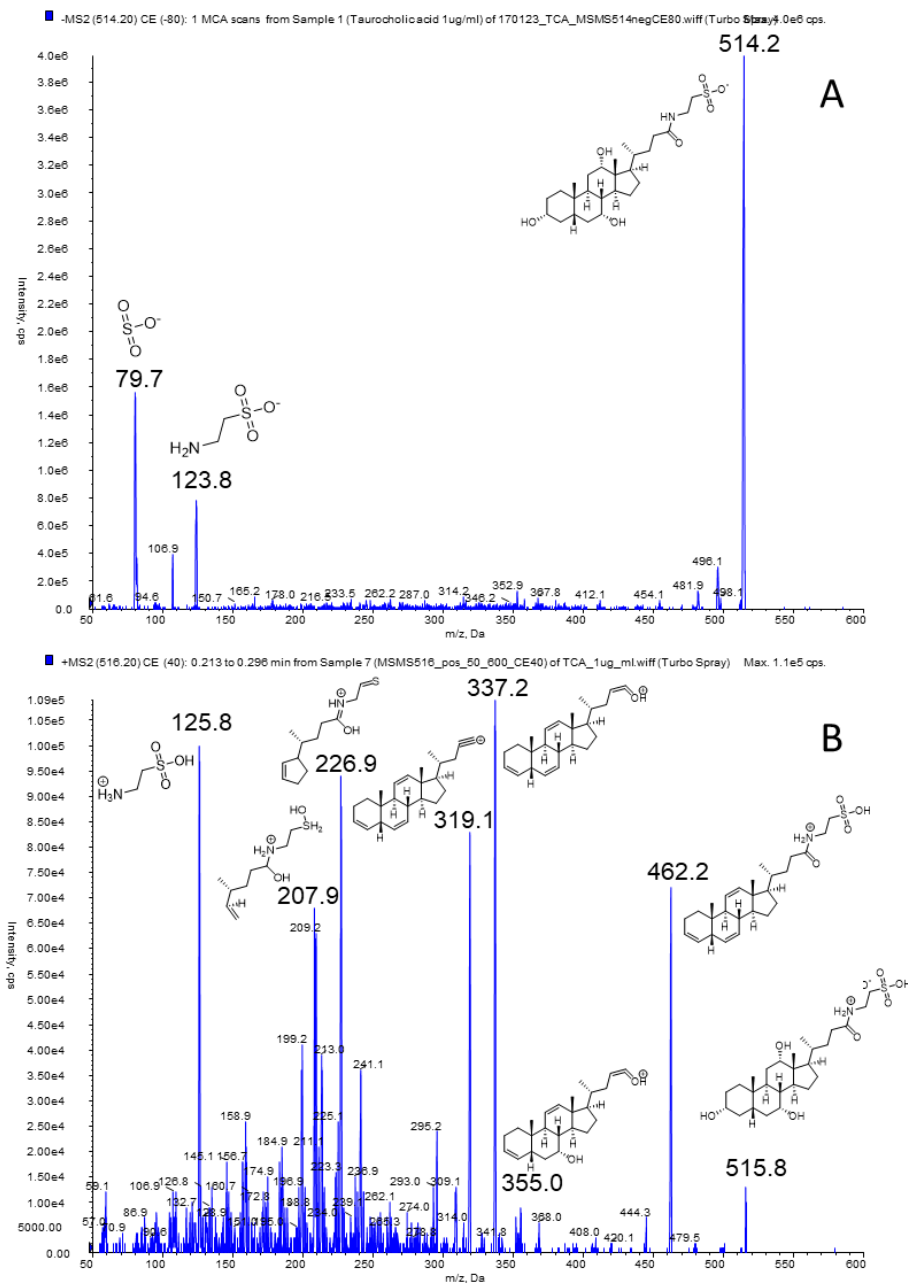


Figure 1.14 Spectres MS/MS de TCA en mode négatif avec CE=80 (A) et en mode positif avec CE = 40 (B)

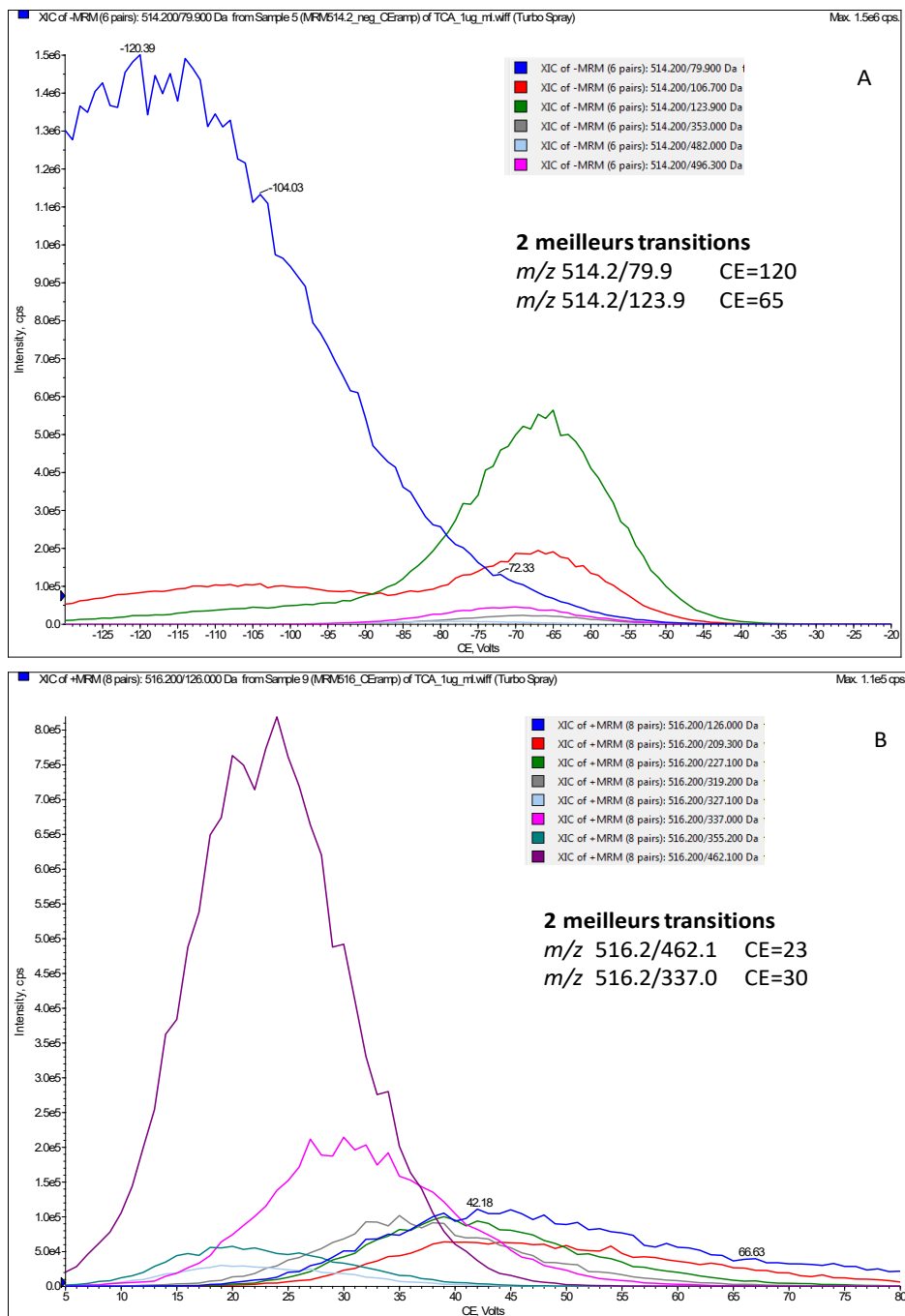


Figure 1.15 Spectres d'optimisation des différentes transitions de TCA en mode négatif (A) et en mode positif (B)

1.4.4 Séparation des isomères d'acides biliaires

Les isomères ne peuvent être seulement séparés par la transition ion précurseur et de son fragment. CLHP permet de faire une première étape de séparation d'échantillon liquide avant d'être acheminé au MS. Elle est constituée d'une phase stationnaire (colonne analytique) et d'une phase mobile. En utilisant la phase inverse dans notre méthode, nous avons employé des colonnes analytiques hydrophobes. Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire. Les phases mobiles utilisées pour la séparation chromatographique sont 0,1 % d'acide formique dans l'eau et 0,1 % de formique acide dans l'acétonitrile. Les composés polaires éluent en premier. Quatre types de colonnes analytiques (Luna 3 μm PFP 100Å 150x2.0mm, Agilent (Zorbax) Extend C18 1,8 μm 2.1x100mm et la colonne Aeris 1,7 μm XB-C18 100x2.1mm) ont été testés afin d'obtenir une excellente séparation des isomères (Figure 1.15). Ceci a entraîné plusieurs injections d'échantillons pour ajuster le gradient des phases mobiles. La colonne Aeris Peptide 1,7 μm XB-C18 100x2.1mm est celle qui sépare efficacement les isomères ω -TMCA, α -TMCA et β -TMCA ainsi que CDCA et DCA.

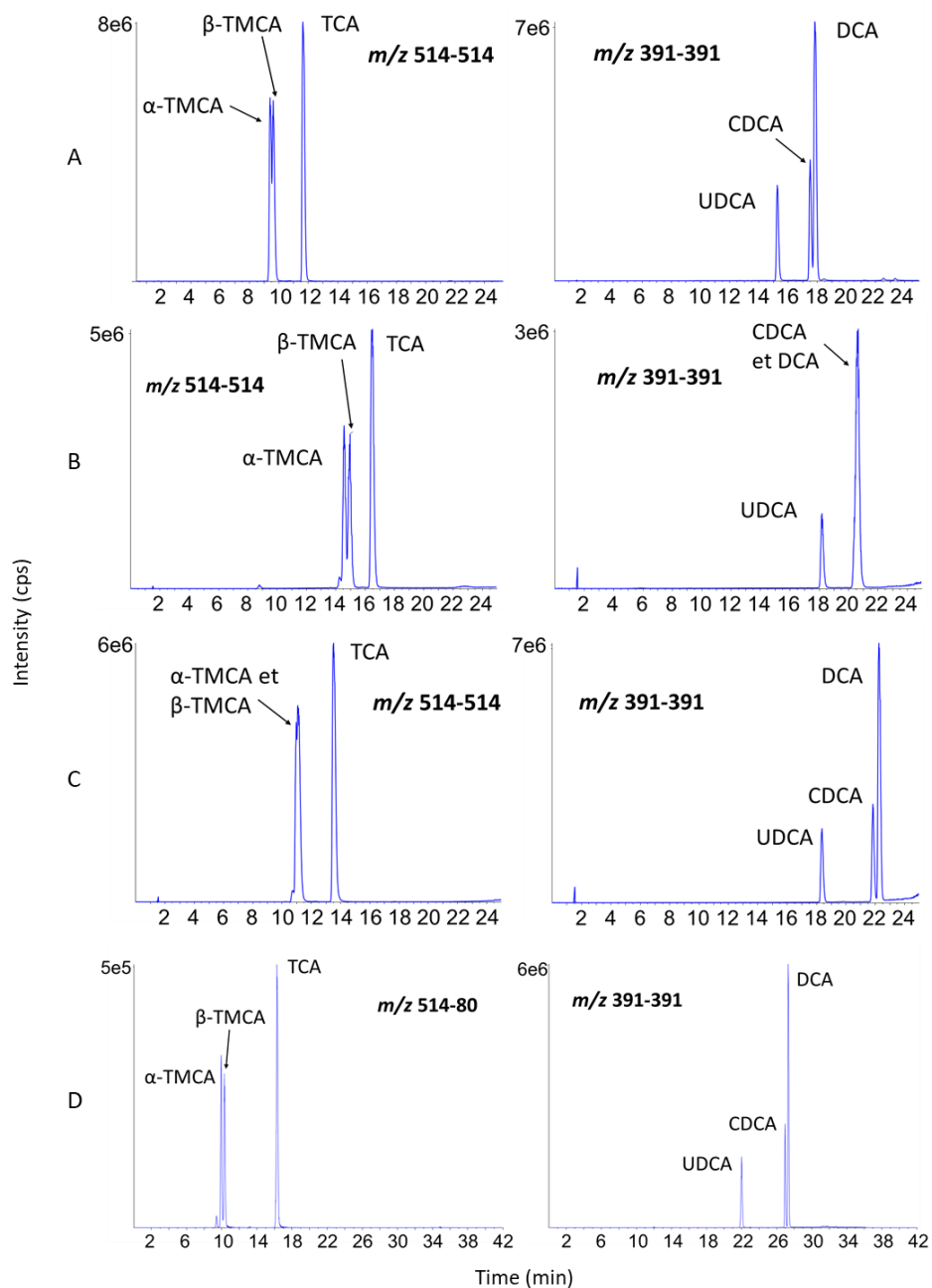


Figure 1.16 Chromatographies des isomères d'acides biliaires en mode négatif avec la colonne Kinetex 2,6 µm Biphenyl 100x2.1mm (A), la colonne Luna 3 µm PFP 100Å 150x2.0mm (B), la colonne Agilent (Zorbax) Extend C18 1,8µm 2.1x100mm (C) et la colonne Aeris Peptide

CHAPITRE II

ARTICLE-TARGETED ANALYSIS OF 46 BILE ACIDS TO STUDY THE EFFECT OF ACETAMINOPHEN IN RAT BY LC-MS/M

Vivaldy Prinville, Leanne Ohlund, Lekha Sleno

Université du Québec à Montréal (UQAM), Department of Chemistry, Montréal, Canada

Article Published in :

Metabolites 2020, Volume 10, Issue 1, 26

Dans ce chapitre, je présente les résultats du travail de recherche de l'influence de l'APAP sur la concentration des acides biliaires qui a été publié dans le journal *Metabolites* 2020. J'ai effectué les manipulations expérimentales et les traitements de données sous la supervision du professeur Lekha Sleno.

Les acides biliaires sont dérivés à partir de réactions enzymatiques du cholestérol. Ils jouent différents rôles cruciaux dans le métabolisme et la santé du foie. Ils aident particulièrement à l'absorption des lipides et du cholestérol. Une accumulation des acides biliaires dans l'organisme est un signe important d'une maladie chronique liée au foie. L'APAP est une drogue prise pour soulager différentes sortes de douleur et pour diminuer la fièvre. Il est la source sérieuse de problèmes reliés au foie en Amérique du Nord et en Europe. Dans les cas sévères, un surdosage de l'APAP peut amener une insuffisance hépatique ou la mort. Dans cet article, une méthode optimisée a été développée avec la CLUHP couplée à un spectromètre de masse afin de démontrer les effets de l'APAP à de différents niveaux de dosage sur la concentration de 46 acides biliaires dans le plasma de rat.

2.1 Abstract

Bile acids represent a large class of steroid acids synthesized in the liver and further metabolized by many bacterial and mammalian enzymes. Variations in bile acid levels can be used as a measure of liver function. There still exists, however, a need to study the variation of individual circulating bile acids, in the context of hepatotoxicity or liver disease. Acetaminophen (APAP), a drug commonly taken to relieve pain and decrease fever, is known to cause acute liver failure at high doses. We have developed a targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to monitor the effects of different doses of APAP on the bile acid plasma profile in a rat model. The analysis method was optimized to ensure chromatographic resolution of isomeric species using a mixture of 46 standard bile acids, and 14 isotopically-labeled internal standard (IS) compounds detected in multiple reaction monitoring (MRM) mode on a triple quadrupole mass spectrometer. Four doses of acetaminophen were studied, the highest of which shows signs of hepatotoxicity in rat. This targeted method revealed that high dose APAP has an important effect on bile acid profiles. Changes were seen in several unconjugated bile acids as well as glycine conjugates, however no obvious changes were apparent for taurine-conjugated species.

Keywords: bile acids; metabolomics; rat plasma; tandem mass spectrometry; liquid chromatography; acetaminophen; hepatotoxicity

Abbreviations: glycodehydrocholic acid (GDHCA), taurodehydrocholic acid (TDHCA), tauro- ω -muricholic acid (ω -TMCA), tauro- α -muricholic acid (α -TMCA), tauro- β -muricholic acid (β -TMCA), taurohyocholic acid (THCA), taurocholic acid (TCA), dehydrocholic acid (DHCA), dioxolithocholic acid (di-oxo-LCA), 6,7-diketolithocholic acid (6,7-diketo-LCA), glycohyocholic acid (GHCA), glycocholic acid (GCA), ursocholic acid (UCA), ω -muricholic acid (ω -MCA), α -muricholic acid (α -MCA), β -muricholic acid (β -MCA), allocholic acid (ACA), cholic acid (CA), glyoursodeoxycholic acid (GUDCA), glycohyodeoxycholic acid (GHDCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), glycodeoxycholic acid (GDCA), nordeoxycholic acid (NDCA), norursodeoxycholic acid (NUDCA), 7-ketodeoxycholic acid (7-keto-DCA), 12-ketodeoxycholic acid (12-keto-DCA), 3-dehydrocholic acid (3-DHCA), norcholic acid (NCA), tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCa), taurodeoxycholic acid (TDCA), murocholic acid (muro-CA), ursodeoxycholic acid (UDCA), hyodeoxycholic acid (HDCA), chenodeoxycholic acid (CDCA), deoxycholic acid (DCA), isodeoxycholic acid (IDCA), 7-ketolithocholic acid (7-keto-LCA), 12-ketolithocholic acid (12-keto-LCA), apocholic acid (APCA), glycolithocholic acid (GLCA), tauroolithocholic acid (TLCA), allosolithocholic acid (AILCA), isolithocholic acid (ILCA), lithocholic acid (LCA) and dehydrolithocholic acid (DHLCA).

2.2 Introduction

Bile acids play many roles crucial for metabolism and liver health. They are formed from cholesterol through a series of enzymatic reactions and they represent the primary pathway for cholesterol catabolism (Scherer *et al.*, 2009). In addition, bile acids emulsify fat from our diet and help absorb lipids and cholesterol (Jean D. Wilson, 1972). Primary bile acids, such as cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) in humans and α -muricholic acid (α -MCA) and β -muricholic acid (β -MCA) in rodents, are synthesized in the liver. Before being secreted by the liver, bile acids can be conjugated to taurine or glycine amino acids. In the intestines, bile acids are unconjugated and converted into secondary bile acids, such as deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid. Most bile acids are reabsorbed in the liver, conjugated again, and excreted in the bile to complete the enterohepatic circulation (Boyer, 2013; Jean D. Wilson, 1972). An increased plasma concentration of bile acids is a sign of liver disease (Hofmann, 1999). High concentrations are toxic, though the potential for toxicity depends on the bile acid profile. For example, it has been reported that chenodeoxycholic acid and lithocholic acid, as well as their conjugates, can damage hepatic cells and induce mitochondrial malfunction, oxidative stress, and apoptosis (Copples B.L., 2010; Fang Y., 2004; Gupta S., 2004; Jaeschke H., 2002). Bile acids can also damage cells within the colon (Nagengast *et al.*, 1995; Reddy BS, 1975). The different physiological functions of bile acids and their implication in pathological processes highlight the importance of understanding circulating bile acid profiles in drug-induced hepatotoxicity.

Acetaminophen (APAP) is a drug commonly used to relieve pain and decrease fever. When taken in therapeutics doses, APAP is considered a very safe drug. With excessive doses, APAP can become highly toxic (Larson AM, 2005). In North America, it is the main cause of acute liver failure, and often requires liver transplantation if too severe or not treated rapidly enough (Lee, 2003). In extreme cases, APAP toxicity can cause death within 48 hours. Previous studies have shown APAP interferes with bile acid synthesis (Bhushan *et al.*, 2013; James *et al.*, 2015; Woolbright *et al.*, 2014).

Different LC-MS based methods to measure bile acids exist (Scherer *et al.*, 2009; Yudai Suzuki, 2013), but a gap still remains with regards to the wide range of bile acid derivatives that exist and their changing profiles with APAP dose. By studying the effect on individual bile acids, specific reactions related to bile acid metabolism can be assessed as being relevant to follow altered hepatic metabolism. The goal of this study was to develop an optimized and semi-quantitative method to evaluate the effects of APAP on numerous bile acids, including free and conjugated forms. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry is a powerful technique that offers many advantages for selective detection of individual bile acids, which are uniquely challenging due to the presence of many isomers. Bile acids can be difficult to analyze due to the similarities between the structures. In this study, we developed a rapid method to monitor 46 bile acids by LC-MS/MS on a triple quadrupole platform, in multiple reaction monitoring (MRM) mode.

2.3 Results and Discussion

A targeted liquid chromatography-multiple reaction monitoring (LC-MRM) method was developed to monitor 46 bile acids in rat plasma following a simple sample preparation to evaluate the effect of increasing APAP dose. Bile acids were extracted by protein precipitation using methanol, following the addition of an isotopically labeled internal standard mix. A reverse-phase solid-core C18 column was employed to separate the 46 bile acids with excellent resolution and peak shape using acidified water and acetonitrile as mobile phase, within a 45 minute gradient. As shown in Figure 2.1, all 46 bile acids in the standard mix were well resolved, including many bile acid isomers (e.g. UDCA, CDCA, and DCA). For example, LC-MRM chromatograms for TMCA, β -TMCA, and TCA in rat plasma show good resolution obtained and highlight the usefulness of this method to monitor these isomers. The list of bile acids assessed in this study was based on the availability of a standard mix as well as multiple isotopically-labeled bile acids for relative quantitation, through a generous gift from MRM Proteomics Inc. The separation of these internal standard (IS) compounds is shown in Figure 2.2.

LC-MRM analyses in negative ion mode yielded better results than in positive ion mode in terms of sensitivity (data not shown), though both were optimized. In positive mode, precursor ions were often associated to in-source water losses and had limited sensitivity as compared to negative mode. In negative mode, unconjugated bile acids were monitored with two transitions, the highest signal coming from monitoring the pseudo-MRM transition of precursor ion to precursor ion, since their fragmentation resulted in a complex mix of fragments, thus limiting sensitivity for

more specific fragment ions (Han *et al.*, 2015). For conjugated bile acids, fragment ions resulting from the taurine and glycine moieties were employed as product ions. For each bile acid, however, secondary transitions were monitored for confirmatory purposes. In rat plasma samples, 39 of the 46 bile acids were measurable, with peaks having signal-to-noise of at least 10 and retention time matching that of the standard mix. No peak was observed for GDHCA, TDHCA, IDCA, DHCA, TLCA, AILCA and ILCA in rat plasma samples. DHCA is a synthetic product of the oxidation of CA and is mainly converted into 3- α -hydroxylated-oxo bile acids (Yousef *et al.*, 1990). It is therefore normal that the conjugated bile acids of DHCA (GDHCA and TDHCA) are not present in rat plasma either. Iso-bile acids (IDCA, AILCA and ILCA) are excreted in the feces of animals (Shefe S., 1982). Of the 39 bile acids remaining, several had very small peaks that did not yield any statistically-significant changes between APAP doses, including GHCA, GLCA, GUDCA, NCA, NUDCA, DHLCA, LCA, di-oxo-LCA and 6,7 diketo-LCA.

The highest APAP dose administered in this study significantly influenced the peaks corresponding to several bile acids (Figure 2.3). Table 3 shows the *p*-values and fold changes seen for each of these changing bile acids at each of the dosing levels compared to the lowest dose. This table also shows the integration data considering both MRM transitions monitored for each of these bile acids, and confirms that for all except two which were too small to properly integrate, these secondary transitions correlated well with the first (more sensitive) transition. Each MRM peak was also investigated for saturation effects. Although no linear ranges were determined directly, based on the peak heights of these bile acids, it was confirmed that we would be able to detect changes in terms of fold change (up or down).

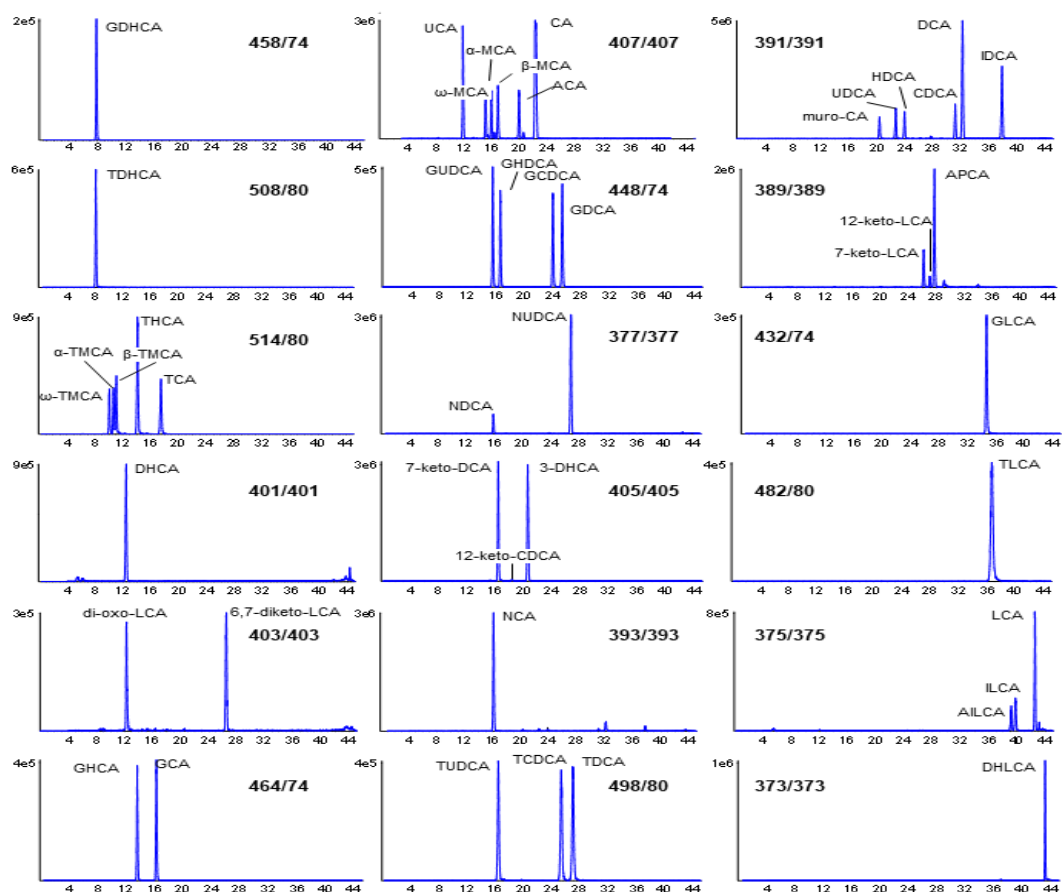
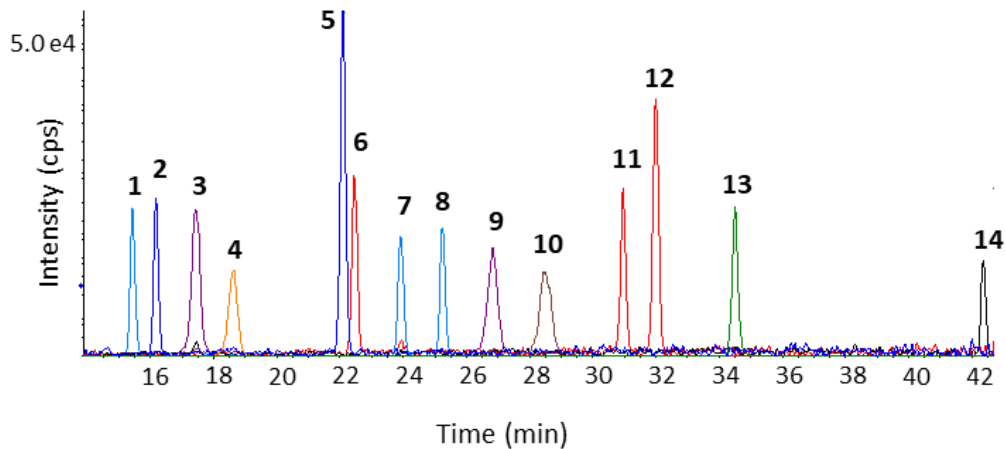


Figure 2.1 Representative LC-MRM chromatograms in negative mode of a standard mixture containing 46 bile acids (using the most sensitive transition for each bile acid, as shown). Acronyms for each bile acid species are listed in the Abbreviations (and Methods) section.

It is, however, very important to state here that fold changes of peak area ratios do not directly translate into concentration fold changes. These results are reported to

determine which bile acids of the 46 from the standard mix were well observed in rat plasma samples and which were altered significantly with increased APAP dose. Thirteen bile acids of the 30 having significant signal-to-noise in our samples, were shown to have statistically-relevant changes between the lowest and highest dose given in this study, with a *p*-value of lower than 0.05, six of which had *p*-values lower than 0.01. Increasing the APAP dose affected the concentration of some bile acids more than others. The bile acids with the most significant changes (with $p < 0.01$) were GCA, GDCA, 7-keto-DCA, APCA, CA and DCA. The graphs in Figure 3 show the peak area ratios at all four doses of APAP. The taurine conjugates monitored did not show any statistically relevant changes with APAP dose. An important effect was seen however for several conjugated glycine conjugates. All four glycine conjugates having adequate peak size (GCA, GCDCA, GDCA and GHDCA) were found to significantly increase between 75 and 600 mg/kg APAP. The three with less obvious quantitative changes were notably much smaller peaks in the rat plasma extracts. For example, the peak area ratio for GDCA was 10.1 times higher (with a *p*-value of 0.0024) with 600 mg/kg compared with 75 mg/kg APAP, while the corresponding taurine conjugate, TDCA, did not show any effect at the highest dose. Since the conjugation of bile acids is an important pathway for their secretion by the liver, our results indicate that APAP could influence the transfer pathway of bile acids from the liver to the bloodstream.



2.2 Representative LC-MRM chromatograms from a 20 μ L injection of IS mix containing 0.013-0.1 μ M final concentration of each IS compound. (1) d4-GUDCA (2) d4-GCA (3) d4-TUDCA (4) d4-TCA (5) d4-CA (6) d4-UDCA (7) d4-GCDCA (8) d4-GDCA (9) d4-TCDC (10) d6-TDCA (11) d4-CDCA (12) d4-DCA (13) d4-GLCA (14) d4-LCA

We found that for the two primary bile acids, CDCA and CA, only CA was found to have a statistically-significant increase with APAP dose levels (fold change of 1.8 and p -value of 0.005 at highest dose). Peak area ratios for α -MCA, and ω -MCA had increased by 4.6-, and 7.4-fold (p -value of 0.0268, and 0.0322), respectively. Given that CDCA is transformed by 6β -hydroxylase in the rat liver into α -MCA, β -MCA, and ω -MCA, it is likely that CDCA is mostly converted into different MCA isomers (W. Voigt, 1968). The peak area ratio of DCA increased 5.6-fold, (with a p -value of 0.0003). Interestingly, DCA has been reported to induce both early apoptosis and necrosis, thus affecting cell development (Shiraki K, 2005). The fold changes between different individual bile acids cannot be directly compared, of course, since

the relative response and sensitivity of each compound by LC-MS/MS is unique. We are not assuming that a larger fold change from this data set gives a stronger change in actual concentration. This would need a follow-up study for absolute quantitation of individual bile acids, with calibration curves for each. This is quite difficult, however, considering we are not able to construct traditional calibration curves for endogenous metabolites in complex biological matrices, such as plasma, as is done for therapeutic drug monitoring.

The LC-MRM data was imported into metabolomics software (MarkerView™) to perform statistical analyses (Student's t-test, as shown previously) and also to visualize data presented within a principal component analysis (PCA). Figure 2.4 shows the PCA plot of the first two principal components (PC1 vs. PC2), with Pareto scaling to alleviate bias to highest peaks. This plot shows clearly that the highest dose of 600 mg/kg clusters separately to the three lower doses (75, 150, and 300 mg/kg), as was evident from the t-testing results of the individual bile acids. The PCA plot, which used all features from the LC-MRM data, following supervised peak integration, serves to show that the high dose had a marked effect compared to the three lower doses, instead of seeing a gradual shift between the four doses.

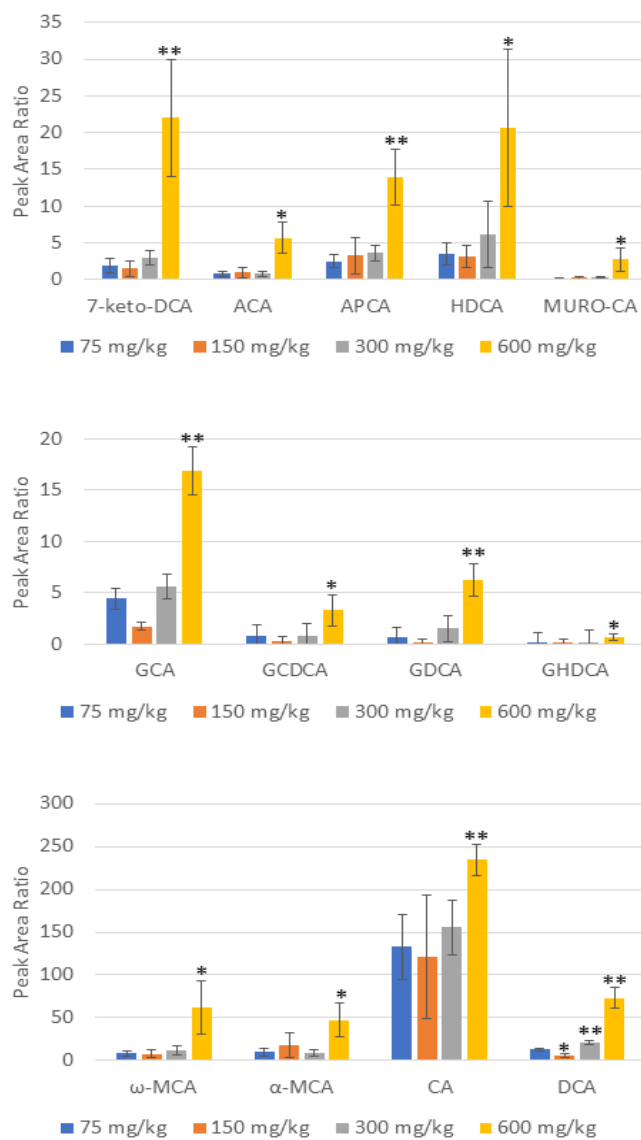


Figure 2.3 Peak area ratios for bile acids having significant changes between 75mg/kg and 600mg/kg APAP dosing, as measured in rat plasma after 24 h. * p-value < 0.05, **p-value < 0.01

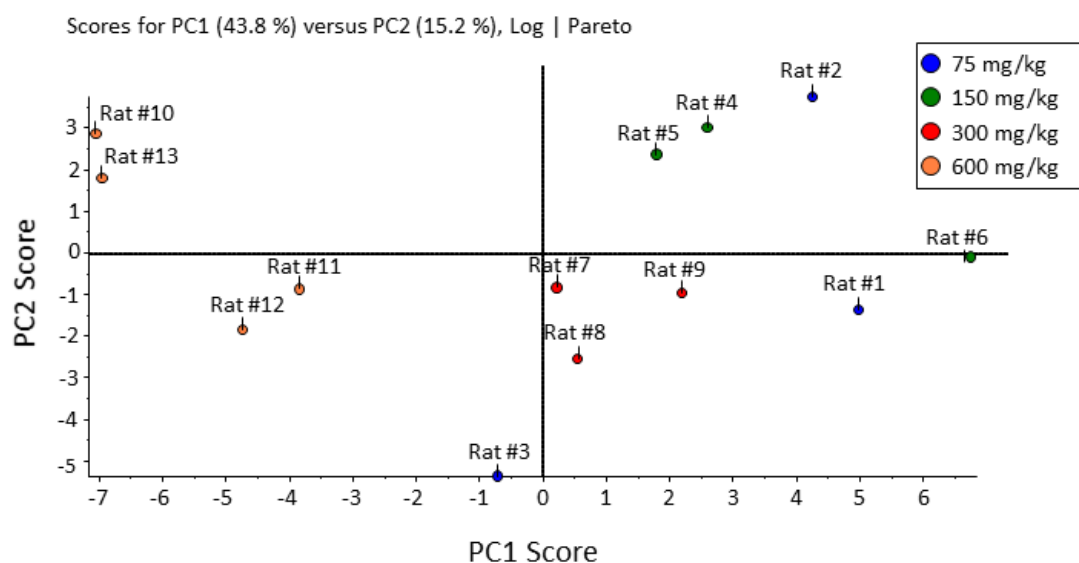


Figure 2.4 Unsupervised principal component analysis (PCA) of 39 bile acids detected in rat plasma samples (comparing four APAP dosing groups).

A higher throughput method could be devised to assess the specific bile acids perturbed by APAP in a follow-up study, for a more rapid assessment of changes in a clinical setting, for instance. It is important to note, however, that there exists many isomers of bile acids in biological samples and that even if we are interested in targeting a finite list of specific ones for a follow-up assay, we would still need to ensure proper separation of all these isomers. The study presented here focused specifically on evaluation the 46 bile acids available from a known standard mix.

This method is not presented for the purpose of being a clinical assay, since it would likely not be high throughput enough considering the chromatographic separation needed to access all these different isomers. It also does not serve to accurately quantify each bile acid (in terms of concentration), rather it looks at relative amounts of bile acids (e.g., their profiles) in a biological matrix (rat plasma) to look for specific effects of APAP dose on individual bile acids. Therefore, this work should not be considered as a new validated method, as per US FDA guidelines. It would be interesting in a future study to validate a method for the bile acids specifically perturbed by high dose APAP. This is quite challenging in the case of endogenous metabolites since it would necessitate stable isotope standards for each metabolite to be quantified, as well as a suitable "blank" biological matrix to be used for preparing calibration curves for each analyte. Additionally, a non-targeted metabolomics approach using high-resolution tandem mass spectrometry would be able to access many more bile acid isomers, as well as sulfate and glucuronide metabolites, without the need for optimizing MS/MS parameters for MRM detection.

2.4 Materials and Methods

2.4.1 Materials

HPLC-grade acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH), as well as LC-MS-grade formic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Purified water was prepared in-house. MetaboloMetrics™ bile acids analysis kits were

obtained from MRM Proteomics Inc. (Montreal, Quebec, Canada). Kits contained a mix of 46 bile acids and an IS mix of 14 deuterated isotope-labeled internal standards. Sprague-Dawley rats were dosed (IP) with 75, 150, 300, and 600 mg/kg APAP, in triplicate, and plasma was collected after 24 hours at INRS Centre de Biologie Experimentale (Laval, QC), within standard ethical practices. The protocol was approved by the Ethics Committee of the INRS Centre de Biologie Experimentale under the ethical practices of the Canadian Council on Animal Care (project UQLK.14.02). These samples were collected in February 2014 and stored at -80°C until proceeding with sample preparation.

The standard mix containing 46 bile acids (each at 2.5 nmol), except for deoxycholic acid (5 nmol) and taurohyocholic acid (6.5 nmol) was provided as a dried sample (Tube A). The bile acids in the standard mix were as follows: glycodehydrocholic acid (GDHCA), taurodehydrocholic acid (TDHCA), tauro- ω -muricholic acid (ω -TMCA), tauro- α -muricholic acid (α -TMCA), tauro- β -muricholic acid (β -TMCA), taurohyocholic acid (THCA), taurocholic acid (TCA), dehydrocholic acid (DHCA), dioxolithocholic acid (di-oxo-LCA), 6,7-diketolithocholic acid (6,7-diketo-LCA), glycohyocholic acid (GHCA), glycocholic acid (GCA), ursocholic acid (UCA), ω -muricholic acid (ω -MCA), α -muricholic acid (α -MCA), β -muricholic acid (β -MCA), allocholic acid (ACA), cholic acid (CA), glyoursodeoxycholic acid (GUDCA), glycohyodeoxycholic acid (GHDCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), glycodeoxycholic acid (GDCA), nordeoxycholic acid (NDCA), norursodeoxycholic acid (NUDCA), 7-ketodeoxycholic acid (7-keto-DCA), 12-ketodeoxycholic acid (12-keto-DCA), 3-dehydrocholic acid (3-DHCA), norcholic acid (NCA), tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA),

taurodeoxycholic acid (TDCA), murocholic acid (muro-CA), ursodeoxycholic acid (UDCA), hyodeoxycholic acid (HDCA), chenodeoxycholic acid (CDCA), deoxycholic acid (DCA), isodeoxycholic acid (IDCA), 7-ketolithocholic acid (7-keto-LCA), 12-ketolithocholic acid (12-keto-LCA), apocholic acid (APCA), glycolithocholic acid (GLCA), tauroolithocholic acid (TLCA), allosolithocholic acid (AILCA), isolithocholic acid (ILCA), lithocholic acid (LCA) and dehydrolithocholic acid (DHLCA).

Isotopically labeled bile acids were provided as an IS mix for normalization purposes. The labeled bile acids were present at between 0.1-0.75 nmol, as a dried sample (Tube B). The labeled bile acids in the IS mix were as follows: glycooursodeoxycholic acid-d₄ (d₄-GUDCA), glycocholic acid-d₄ (d₄-GCA), tauroursodeoxycholic acid-d₄ (d₄-TUDCA), taurocholic acid-d₄ (d₄-TCA), cholic acid-d₄ (d₄-CA), ursodeoxycholic acid-d₄ (d₄-UDCA), glycochenodeoxycholic acid-d₄ (d₄-GCDCA), glycodeoxycholic acid-d₄ (d₄-5GDCA), taurochenodeoxycholic acid-d₄ (d₄-TCDCa), taurodeoxycholic acid-d₆ (d₆-TDCA), chenodeoxycholic acid-d₄ (d₄-CDCA), deoxycholic acid-d₄ (d₄-DCA), glycolithocholic acid-d₄ (d₄-GLCA) and lithocholic acid-d₄ (d₄-LCA).

2.4.2 Sample Preparation

For the standard mix preparation, 250 μL ACN was added to Tube A, followed by a 1:10 dilution with 40% ACN. This standard mix was injected (2 μL) with the LC-MRM method described (shown in Figure 1) for retention time matching of bile acids in samples. For the internal standard (IS) mix, 7.5 mL of 40% ACN was added to Tube B. Plasma samples (50 μL) were mixed with 50 μL of the reconstituted (Tube B) internal standard solution. The extraction of bile acids from rat plasma was then performed by adding 300 μL MeOH to precipitate proteins. Samples were vortexed and sonicated for 15 min, then centrifuged at 14000 rpm for 8 min. Supernatants (300 μL) were transferred to new microtubes, dried under nitrogen and reconstituted with 150 μL 50% MeOH prior to analysis. Extracts were stored at -20°C until LC-MS analysis.

2.4.3 LC-MS/MS

Extracted plasma and standards were separated on an Aeris™ PEPTIDE XB-C18 column (1.7 μm , 100 mm x 2.1 mm) (Phenomenex®, Torrance, CA) using a Nexera ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) system (Shimadzu, Columbia, MD) at 50 °C with gradient elution using water and ACN, each containing 0.1% formic acid as mobile phase A and B, respectively, at a flow rate of 0.400 mL/min and injection volume of 15 μL . The gradient started at 10% B and was held for 1 min increased linearly to 25% for 2 min, to 35% over 17 min, to 50% over 20 min, to 60% over 2 min and 90% for 1 min, followed by a 10 min column re-equilibration time at starting conditions. MS data was collected using a QTRAP 5500

system (Sciex, Concord, ON, Canada). Electrospray ionization (ESI) in negative ion mode and multiple reaction monitoring (MRM) was used. The MRM parameters (first and second transitions with collision energies (CE)) for all 46 bile acids are listed in Table 1). Each transition was monitored throughout the chromatogram with a dwell time of 7 ms. Because of the fragmentation behavior of the deprotonated unconjugated bile acids, the first transitions chosen for the unconjugated forms were simply precursor to precursor ions, as has been done in many previous reports on bile acid analysis (Garcia-Canaveras *et al.*, 2012; Tagliacozzi *et al.*, 2003; Xiaohan Caia, 2012; Yudai Suzuki, 2013). This was necessary for ensuring the best sensitivity of detection for these unconjugated forms. For glycine conjugated bile acids, there was a specific and sensitive common fragment ion at m/z 74, corresponding to the deprotonated glycine moiety being lost. Similarly, taurine conjugates yielded a common fragment at m/z 80, corresponding to the HSO_3^- ion from the taurine group. The secondary transitions were used for confirmation. For those bile acids altered significantly upon APAP dose, the secondary transition was also integrated and compared.

Table 1 Optimized MRM parameters for 46 bile acids along with their retention times

Bile acid	RT (min)	1st transition (CE)	2nd transition (CE)	IS
GDHCA	7.9	458.2/74.0 (-66)	458.2/348.1 (-41)	CDCA-d4
TDHCA	8.2	508.2/80.0 (-123)	508.2/124.1 (-67)	CDCA-d4
T-ω-MCA	10.1	514.2/80.0 (-135)	514.2/107.0 (-82)	TCA-d4
T-α-MCA	10.7	514.2/80.0 (-135)	514.2/107.0 (-82)	TCA-d4
T-β-MCA	11.1	514.2/80.0 (-135)	514.2/124.0 (-65)	TCA-d4
UCA	11.9	407.2/407.2 (-15)	407.2/343.1 (-46)	CA-d4
di-oxo-LCA	12.3	403.2/403.2 (-18)	403.2/385.2 (-40)	CDCA-d4

Bile acid	RT (min)	1st transition (CE)	2nd transition (CE)	IS
DHCA	12.4	401.2/401.2 (-18)	401.2/331.1 (-36)	CDCA-d4
GHCA	13.6	464.2/74.0 (-82)	464.2/354.1 (-56)	GCA-d4
THCA	14.1	514.2/80.0 (-135)	514.2/107.0 (-82)	TCA-d4
ω-MCA	15.1	407.2/407.2 (-15)	407.2/371.1 (-43)	CA-d4
GUDCA	15.5	448.2/74.0 (-83)	448.2/386.1 (-59)	GUDCA-d4
NDCA	15.8	377.2/377.2 (-15)	377.2/331.1 (-46)	CDCA-d4
α-MCA	16.0	407.2/407.2 (-15)	407.2/371.1 (-43)	CA-d4
NCA	16.1	393.2/393.2 (-15)	393.2/375.1 (-45)	CDCA-d4
GCA	16.2	464.2/74.0 (-82)	464.2/402.1 (-46)	GCA-d4
7-keto-DCA	16.4	405.2/405.2 (-18)	405.2/289.1 (-51)	CDCA-d4
TUDCA	16.4	498.2/80.0 (-130)	498.2/107 (-82)	TUDCA-d4
GHDCa	16.6	448.2/74.0 (-83)	448.2/386.1 (-59)	GUDCA-d4
β-MCA	16.9	407.2/407.2 (-15)	407.2/371.1 (-43)	CA-d4
TCA	17.5	514.2/80.0 (-135)	514.2/124.0 (-65)	TCA-d4
12-keto-CDCA	18.4	405.2/405.2 (-18)	405.2/387.1 (-45)	CDCA-d4
ACA	19.9	407.2/407.2 (-15)	407.2/371.1 (-43)	CA-d4
muro-CA	20.3	391.2/391.2 (-15)	391.2/343.1 (-53)	UDCA-d4
3-DHCA	20.5	405.2/405.2 (-18)	405.2/289.1 (-51)	CDCA-d4
CA	22.2	407.2/407.2 (-15)	407.2/343.1 (-46)	CA-d4
UDCA	22.6	391.2/391.2 (-15)	391.2/373.2 (-48)	UDCA-d4
HDCA	23.9	391.2/391.2 (-15)	391.2/373.2 (-48)	CDCA-d4
GCDCA	24.0	448.2/74.0 (-83)	448.2/404.2 (-46)	GCDCA-d4
TCDCa	25.3	498.2/80.0 (-130)	498.2/124 (-64)	TCDCa-d4
GDCA	25.3	448.2/74.0 (-83)	448.2/404.2 (-46)	GDCA-d4
7-keto-LCA	26.1	389.2/389.2 (-18)	389.2/354.1 (-43)	LCA-d4
6,7-diketo-LCA	26.5	403.2/403.2 (-18)	403.2/347.1 (-39)	LCA-d4
NUDCA	26.7	377.2/377.2 (-15)	377.2/359.1 (-45)	CDCA-d4
TDCA	27.0	498.2/80.0 (-130)	498.2/124 (-64)	TDCA-d6
12-keto-LCA	27.1	389.2/389.2 (-18)	389.2/354.1 (-43)	LCA-d4
APCA	27.6	389.2/389.2 (-18)	389.2/371.1 (-43)	CDCA-d4
CDCA	31.1	391.2/391.2 (-15)	391.2/373.2 (-48)	CDCA-d4
DCA	32.1	391.2/391.2 (-15)	391.2/343.1 (-53)	DCA-d4
GLCA	34.6	432.2/74.0 (-66)	432.2/388.1 (-45)	GLCA-d4
TLCA	36.6	482.2/80.0 (-135)	482.2/107 (-80)	LCA-d4
IDCA	37.8	391.2/391.2 (-15)	391.2/345.1 (-45)	DCA-d4

Bile acid	RT (min)	1st transition (CE)	2nd transition (CE)	IS
AILCA	39.1	375.2/375.2 (-15)	375.2/45 (-50)	LCA-d₄
ILCA	39.7	375.2/375.2 (-15)	375.2/45 (-50)	LCA-d₄
LCA	42.5	375.2/375.2 (-15)	375.2/45 (-50)	LCA-d₄
DHLCA	43.1	373.2/373.2 (-18)	373.2/45 (-50)	LCA-d₄

2.4.4 Statistical Analysis

A mixture of 14 deuterated bile acids was added to the plasma samples prior to metabolite extraction, for normalization of data as peak area ratios (analyte/IS) (see Table 2). For those bile acids without corresponding deuterated analogs, the closest eluting deuterated analog was used as IS, as noted in Table 1. Standards were used to confirm the identity of each bile acid, based on retention and MRM signal. Peak integration was performed using MultiQuant™ 2.1 (Sciex). Statistical analyses were done using MarkerView™ 1.2.1 (Sciex). This software was used to perform Student's t-tests, yielding *p*-values and fold changes between different dosing groups, for each bile acid detected in rat plasma samples. Within Markerview software, principal component analysis was performed on the integrated LC-MRM data, without weighting and using Pareto scaling (unsupervised).

Table 2 Optimized MRM transitions and collision energies for 14 internal standards compounds, along with their respective retention times

IS	RT (min)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)
GUDCA-d₄	15.5	452.3	74.0	-41
GCA-d₄	16.2	468.3	74.0	-45
TUDCA-d₄	17.4	502.3	80.0	-73
TCA-d₄	18.7	518.3	80.0	-80
CA-d₄	22.1	411.3	411.3	-15
UDCA-d₄	22.5	395.3	395.3	-15
GCDCA-d₄	23.8	452.3	74.0	-37
GDCA-d₄	25.3	452.3	74.0	-41
TCDCa-d₄	26.8	502.3	80.0	-80
TDCa-d₆	28.7	504.3	80.0	-80
CDCa-d₄	31	395.3	395.3	-15
DCA-d₄	32	395.3	395.3	-15
GLCA-d₄	34.5	436.3	74.0	-41
LCA-d₄	42.4	379.3	379.3	-15

2.5 Conclusion

In this study, we have developed a targeted metabolomics method to gain a better understanding of the effects of APAP on circulating bile acid profiles. A simple protein precipitation procedure in rat plasma was employed rapidly prepare samples for analysis. A standard mix of 46 bile acids was successfully resolved by LC-MRM, 39 of which were detected in rat plasma samples. These analyses highlighted significant changes in bile acid profiles with increasing APAP dose in rats. In

general, these results indicate that APAP can have an important effect on the metabolism of bile acids. Depending on the dose level, exposure to high or repeated APAP doses has the potential to induce serious health problems, related to bile acid metabolism and excretion. The specificity of these biomarkers to APAP-related toxicity would still need to be investigated. Certain of these bile acids can also serve as biomarkers to establish the level of hepatotoxicity, however more work would be needed to validate specific bile acid biomarkers for clinical use.

2.6 Supplemental Information

Table 3 Comparison of p-values and fold-changes between the four doses of APAP administered in this study (using two MRM transitions for each peak) of known bile acids showing significant differences between the lowest and highest dose APAP

Bile Acid	transition	<i>p</i> -value*			Fold Change		
		150/75	300/75	600/75	150/75	300/75	600/75
7-keto-DCA	405/405	0.6675	0.2508	0.0081	0.8	1.6	11.9
	405/289	0.4568	0.4210	0.0020	0.7	1.3	7.9
ACA	407/407	0.8053	0.9335	0.0136	1.2	1.0	7.1
	407/371 ^a						
APCA	389/389	0.6377	0.2350	0.0043	1.3	1.5	5.7
	389/371	0.7860	0.2221	0.0071	1.2	1.6	5.7
HDCA	391/391	0.8080	0.3706	0.0421	0.9	1.8	6.0
	391/373	0.3062	0.5137	0.0302	0.4	1.8	8.5
MURO-CA	391/391	0.7286	0.0927	0.0455	1.2	1.7	13.9
	391/343 ^a						
GCA	464/74	0.2477	0.6603	0.0022	0.4	1.3	3.8
	464/402	0.2498	0.6622	0.0059	0.4	1.3	3.4
GCDCA	448/74	0.3071	0.8691	0.0499	0.4	0.9	3.9
	448/404	0.3633	0.9288	0.0360	0.2	1.1	6.1
GDCA	448/74	0.2312	0.0751	0.0024	0.2	2.4	10.1
	448/404	0.2169	0.0552	0.0025	0.2	2.6	10.8
GHDCA	448/74	0.3884	0.5019	0.0398	0.4	1.7	7.2
	448/386	0.8624	0.3002	0.0412	0.8	2.8	11.0
ω-MCA	407/407	0.7768	0.4250	0.0322	0.9	1.4	7.4
	407/371	0.7277	0.4623	0.0240	0.9	1.2	6.7
α-MCA	407/407	0.4266	0.6960	0.0268	1.8	0.9	4.6
	407/371	0.5125	0.5562	0.0221	1.5	0.8	4.1
CA	407/407	0.8129	0.4707	0.0051	0.9	1.2	1.8
	407/343	0.5155	0.9920	0.0073	0.7	1.0	2.3
DCA	391/391	0.0125	0.0043	0.0003	0.5	1.6	5.6
	391/343	0.01858	0.00745	0.0005	0.5	1.8	6.0

*in bold, *p*-value < 0.05, underlined *p*-value < 0.01; ^aS/N too low for good integration

CONCLUSION

Les acides biliaires jouent un rôle primordial dans la physiologie animale. La connaissance sur les acides biliaires ne se limite pas seulement au concept de détergent digestif. Avec les années, les recherches ont permis de constater qu'ils agissent aussi comme des hormones impliquées dans la régularisation de divers processus métaboliques.

L'APAP est devenu un médicament qui a pris beaucoup d'ampleur dans les sociétés industrialisées à cause des effets bénéfiques qu'elle apporte lorsque la posologie est bien suivie. Lorsqu'elle est consommée en trop grande quantité, elle provoque une insuffisance hépatique aiguë pouvant amener la mort. Son mécanisme d'action suscite beaucoup d'intérêt étant donné son champ d'action varié.

En connaissant bien les conséquences d'une forte concentration d'APAP sur le foie, le MS est un outil qui nous a permis d'analyser son effet sur les acides biliaires. Il est important de noter que développer une méthode analytique pour 46 acides biliaires représente un énorme défi. Aucune étude n'avait analysé autant d'acides biliaires. Étant donné les nombreux isomères d'acides biliaires, il était difficile de trouver la bonne colonne analytique et le bon gradient qui permettait de bien séparer les analytes d'intérêts. La colonne Aeris™ PEPTIDE XB-C18 column (1,7 μ m, 100 mm x 2,1 mm) de Phenomenex nous a permis de bien séparer les isomères problématiques tels que DCA et CDCA ; ω -TMCA, α -TMCA et β -TMCA. Une simple extraction par précipitation de protéine du plasma de rat a permis d'analyser l'effet sur la concentration des différents acides biliaires. Avec l'efficacité de notre méthode

développée sur MS, nous avons été en mesure de démontrer que certains acides biliaires sont plus affectés que d'autres lorsqu'on compare les rats ayant reçu une dose de 75 mg/kg et ceux ayant reçu 600 mg/kg. Nos résultats ne font que confirmer qu'une dose élevée d'APAP augmente l'activité des cellules hépatiques qui sont liées à la production des acides biliaires (Prinville *et al.*, 2020).

Dans le futur, d'autres acides biliaires potentiels pourraient être ajoutés dans notre méthode pour des fins d'analyses. Également, nous pouvons étendre notre recherche sur les matières fécales et l'urine pour découvrir d'autres acides biliaires qui seraient éliminés à cause d'une concentration élevée d'APAP. En ayant précisément ciblé les acides biliaires affectés, ils seraient possibles de diagnostiquer plus rapidement les symptômes afin de prodiguer aux patients la meilleure thérapie pour une guérison efficace.

RÉFÉRENCES

- Adjei, A. A., Gaedigk, A., Simon, S. D., Weinshilboum, R. M. et Leeder, J. S. (2008). Interindividual variability in acetaminophen sulfation by human fetal liver: implications for pharmacogenetic investigations of drug-induced birth defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 82(3), 155-165. doi: 10.1002/bdra.20535
- Allwood, J. W. et Goodacre, R. (2010). An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem Anal*, 21(1), 33-47. doi: 10.1002/pca.1187
- Baes, M., Gressens, P., Huyghe, S., De, N. K., Qi, C., Jia, Y., . . . Reddy, J. K. (2002). The neuronal migration defect in mice with Zellweger syndrome (Pex5 knockout) is not caused by the inactivity of peroxisomal beta-oxidation. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(4), 368-374. doi: 10.1093/jnen/61.4.368

Barnes, S. N., Aleksunes, L. M., Augustine, L., Scheffer, G. L., Goedken, M. J., Jakowski, A. B., . . . Manautou, J. E. (2007). Induction of hepatobiliary efflux transporters in acetaminophen-induced acute liver failure cases. *Drug Metab Dispos*, 35(10), 1963-1969. doi: 10.1124/dmd.107.016170

Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R. et Leone, S. (2006). Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev*, 12(3-4), 250-275. doi: 10.1111/j.1527-3458.2006.00250.x

Bessems, J. G. et Vermeulen, N. P. (2001). Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol*, 31(1), 55-138. doi: 10.1080/20014091111677

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. *Am J Pathol*, 183(5), 1518-1526. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.07.012

Bock, K. W., Forster, A., Gschaidmeier, H., Bruck, M., Munzel, P., Schareck, W., . . . Burchell, B. (1993). Paracetamol glucuronidation by recombinant rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem Pharmacol*, 45(9), 1809-1814. doi: 10.1016/0006-2952(93)90437-2

Boyer, J. L. (2013). Bile formation and secretion. *Compr Physiol.*, 3(3), 1035-1078. doi: 10.1002/cphy.c120027

Chesnut, S. M. et Salisbury, J. J. (2007). The role of UHPLC in pharmaceutical development. *J Sep Sci*, 30(8), 1183-1190. doi: 10.1002/jssc.200600505

Chiang, J. Y., Kimmel, R. et Stroup, D. (2001). Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α). *Gene*, 262(1-2), 257-265. doi: 10.1016/s0378-1119(00)00518-7

Clouse, S. D. (2011). Brassinosteroids. *Arabidopsis Book*, 9, 1-23. doi: 10.1199/tab.0151

- Coles, B., Wilson, I., Wardman, P., Hinson, J. A., Nelson, S. D. et Ketterer, B. (1988). The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: A stopped-flow kinetic study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 264(1), 253-260. doi: 10.1016/0003-9861(88)90592-9
- Connolly, J. D. et Hill, R. A. (2008). Triterpenoids. *Nat Prod Rep*, 25(4), 794-830. doi: 10.1039/b718038c
- Copple B.L., J. H., Klaassen C.D. . (2010). Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis. *Semin Liver Dis*, 30(2), 195-204. doi: 10.1055/s-0030-1253228
- Court, M. H., Duan, S. X., von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., Patten, C. J., Miners, J. O. et Mackenzie, P. I. (2001). Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*, 299(3), 998-1006.

- Fang Y., H. S. I., Mitchell C., Gupta S., Studer E., Grant S., Hylemon P.B., Dent P. . (2004). Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes. *Hepatology*. *Hepatology*, *40*, 961-971. doi: 10.1002/hep.1840400427
- Garcia-Canaveras, J. C., Donato, M. T., Castell, J. V. et Lahoz, A. (2012). Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method. *J Lipid Res*, *53*(10), 2231-2241. doi: 10.1194/jlr.D028803
- Geib, T., Lento, C., Wilson, D. J. et Sleno, L. (2019). Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Acetaminophen Covalent Binding to Glutathione S-Transferases. *Front. Chem.*, *7*. doi: 10.3389/fchem.2019.00558
- Gupta S., N. R., Payne S.G., Studer E.J., Spiegel S., Dent P., Hylemon P.B. (2004). Deoxycholic acid activates the c-Jun N-terminal kinase pathway via FAS receptor activation in primary hepatocytes: role of acidic sphingomyelinase-mediated ceramide generation in FAS receptor activation. *J Biol Chem.* , *279*, 5821-5828. doi: 10.1074/jbc.M310979200

Gustafsson, J. et Sjostedt, S. (1978). On the stereospecificity of microsomal "26"-hydroxylation in bile acid biosynthesis. *J Biol Chem*, 253(1), 199-201.

Han, J., Liu, Y., Wang, R., Yang, J., Ling, V. et Borchers, C. H. (2015). Metabolic profiling of bile acids in human and mouse blood by LC-MS/MS in combination with phospholipid-depletion solid-phase extraction. *Anal Chem*, 87(2), 1127-1136. doi: 10.1021/ac503816u

Heuman DM, H. P., Vlahcevic ZR. . (1989). Regulation of bile acid synthesis. III. Correlation between biliary bile salt hydrophobicity index and the activities of enzymes regulating cholesterol and bile acid synthesis in the rat. . *J Lipid Res*, 30, 1161-1171.

Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., . . . Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev*, 24(1), 3-12.

Hodgman, M. J. et Garrard, A. R. (2012). A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin*, 28(4), 499-516. doi: 10.1016/j.ccc.2012.07.006

Hofmann, A. F. (1999). Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci*, 14, 24-29. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1999.14.1.24>

Hu, X., Bonde, Y., Eggertsen, G. et Rudling, M. (2014). Muricholic bile acids are potent regulators of bile acid synthesis via a positive feedback mechanism. *J Intern Med*, 275(1), 27-38. doi: 10.1111/joim.12140

Hunt, M. C., Solaas, K., Kase, B. F. et Alexson, S. E. (2002). Characterization of an acyl-coA thioesterase that functions as a major regulator of peroxisomal lipid metabolism. *J Biol Chem*, 277(2), 1128-1138. doi: 10.1074/jbc.M106458200

Hylemon, P. B. et Harder, J. (1998). Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*, 22(5), 475-488. doi: 10.1111/j.1574-6976.1998.tb00382.x

Insook Kim, S.-H. A., Takeshi Inagaki, Mihwa Choi, Shinji Ito, Grace L. Guo, Steven A. Kliewer and Frank J. Gonzalez. (2007). Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J. Lipid Res*, 48.

Jaeschke H., G. G. J., Cederbaum A.I., Hinson J.A., Pessayre D., Lemasters J.J. . (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci*, 65, 166-176. doi: 10.1093/toxsci/65.2.166

James, L., Yan, K., Pence, L., Simpson, P., Bhattacharyya, S., Gill, P., . . . Beger, R. (2015). Comparison of Bile Acids and Acetaminophen Protein Adducts in Children and Adolescents with Acetaminophen Toxicity. *PLoS One*, 10(7), 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0131010

Jean D. Wilson, M., Dallas. (1972). The role of bile acids in the overall regulation of steroid metabolism. *Arch Intern Med.*, 130(4), 493-505. doi: 10.1001/archinte.1972.03650040027004

Jennings, K. R. (2000). The changing impact of the collision-induced decomposition of ions on mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 200(1-3), 479-493. doi: 10.1016/s1387-3806(00)00325-0

Kotti, T. J., Savolainen, K., Helander, H. M., Yagi, A., Novikov, D. K., Kalkkinen, N., . . . Schmitz, W. (2000). In mouse alpha -methylacyl-CoA racemase, the same gene product is simultaneously located in mitochondria and peroxisomes. *J Biol Chem*, 275(27), 20887-20895. doi: 10.1074/jbc.M002067200

Lan, K., Su, M., Xie, G., Ferslew, B. C., Brouwer, K. L., Rajani, C., . . . Jia, W. (2016). Key Role for the 12-Hydroxy Group in the Negative Ion Fragmentation of Unconjugated C24 Bile Acids. *Anal Chem*, 88(14), 7041-7048. doi: 10.1021/acs.analchem.6b00573

Larson AM, P. J., Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, SchiØdt FV, Ostapowicz G, Shakil AO, Lee WM. (2005). Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*, 42, 1364-1372. doi: 10.1002/hep.20948

LeBlanc, A., Shiao, T. C., Roy, R. et Sleno, L. (2014). Absolute quantitation of NAPQI-modified rat serum albumin by LC-MS/MS: monitoring acetaminophen covalent binding in vivo. *Chem Res Toxicol*, 27(9), 1632-1639. doi: 10.1021/tx500284g

Lee, W. M. (2003). Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis*, 23(3), 217-226. doi: 10.1055/s-2003-42641

Lee, W. M. (2017). Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away? *J Hepatol*, 67(6), 1324-1331. doi: 10.1016/j.jhep.2017.07.005

Lew, J. L., Zhao, A., Yu, J., Huang, L., De Pedro, N., Pelaez, F., . . . Cui, J. (2004). The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *J Biol Chem*, 279(10), 8856-8861. doi: 10.1074/jbc.M306422200

- Li-Hawkins, J., Lund, E. G., Bronson, A. D. et Russell, D. W. (2000). Expression cloning of an oxysterol 7 α -hydroxylase selective for 24-hydroxycholesterol. *J Biol Chem*, 275(22), 16543-16549. doi: 10.1074/jbc.M001810200
- Lu, T. T., Makishima, M., Repa, J. J., Schoonjans, K., Kerr, T. A., Auwerx, J. et Mangelsdorf, D. J. (2000). Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*, 6(3), 507-515.
- Luo, L., Aubrecht, J., Li, D., Warner, R. L., Johnson, K. J., Kenny, J. et Colangelo, J. L. (2018). Assessment of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury and liver disease in humans. *PLoS One*, 13(3), e0193824. doi: 10.1371/journal.pone.0193824
- Melton, E. M., Cerny, R. L., Watkins, P. A., DiRusso, C. C. et Black, P. N. (2011). Human fatty acid transport protein 2a/very long chain acyl-CoA synthetase 1 (FATP2a/Acsv11) has a preference in mediating the channeling of exogenous n-3 fatty acids into phosphatidylinositol. *J Biol Chem*, 286(35), 30670-30679. doi: 10.1074/jbc.M111.226316

Mi, S., Lim, D. W., Turner, J. M., Wales, P. W. et Curtis, J. M. (2016). Determination of Bile Acids in Piglet Bile by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Lipids*, 51(3), 359-372. doi: 10.1007/s11745-016-4125-1

Mihalik, S. J., Steinberg, S. J., Pei, Z., Park, J., Kim, D. G., Heinzer, A. K., . . . Watkins, P. A. (2002). Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. *J Biol Chem*, 277(27), 24771-24779. doi: 10.1074/jbc.M203295200

Miyake, J. H., Doung, X. D., Strauss, W., Moore, G. L., Castellani, L. W., Curtiss, L. K., . . . Davis, R. A. (2001). Increased production of apolipoprotein B-containing lipoproteins in the absence of hyperlipidemia in transgenic mice expressing cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Biol Chem*, 276(26), 23304-23311. doi: 10.1074/jbc.M101853200

Monte, M. J., Marin, J. J., Antelo, A. et Vazquez-Tato, J. (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*, 15(7), 804-816. doi: 10.3748/wjg.15.804

Mutlib, A. E., Goosen, T. C., Bauman, J. N., Williams, J. A., Kulkarni, S. et Kostrubsky, S. (2006). Kinetics of acetaminophen glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferases 1A1, 1A6, 1A9 and 2B15. Potential implications in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 19(5), 701-709. doi: 10.1021/tx050317i

Nagengast, F. M., Grubben, M. J. A. L. et van Munster, I. P. (1995). Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *European Journal of Cancer*, 31(7-8), 1067-1070. doi: 10.1016/0959-8049(95)00216-6

Ness, G. C. et Lopez, D. (1995). Transcriptional regulation of rat hepatic low-density lipoprotein receptor and cholesterol 7 alpha hydroxylase by thyroid hormone. *Arch Biochem Biophys*, 323(2), 404-408. doi: 10.1006/abbi.1995.0061

Pandak, W. M., Vlahcevic, Z. R., Heuman, D. M., Redford, K. S., Chiang, J. Y. et Hylemon, P. B. (1994). Effects of different bile salts on steady-state mRNA levels and transcriptional activity of cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *Hepatology*, 19(4), 941-947.

Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 30(1), 19-34.

Pols, T. W. H., Puchner, T., Korkmaz, H. I., Vos, M., Soeters, M. R. et de Vries, C. J. M. (2017). Lithocholic acid controls adaptive immune responses by inhibition of Th1 activation through the Vitamin D receptor. *PLoS One*, 12(5), e0176715. doi: 10.1371/journal.pone.0176715

Prescott, L. F. (1983). Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. *Drugs*, 25(3), 290-314. doi: 10.2165/00003495-198325030-00002

Prinville, V., Ohlund, L. et Sleno, L. (2020). Targeted Analysis of 46 Bile Acids to Study the Effect of Acetaminophen in Rat by LC-MS/MS. *Metabolites*, 10(1). doi: 10.3390/metabo10010026

Raucy, J. L., Lasker, J. M., Lieber, C. S. et Black, M. (1989). Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2. *Arch Biochem Biophys*, 271(2), 270-283. doi: 10.1016/0003-9861(89)90278-6

Reddy BS, W. J., Wynder EL. . (1975). Effects of high risk and low risk diets for colon carcinogenesis on fecal microflora and steroids in man. *J Nutr* 105, 878-884. doi: 10.1093/jn/105.7.878

Reddy, J. K. et Hashimoto, T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*, 21, 193-230. doi: 10.1146/annurev.nutr.21.1.193

Reiter C, W. R. M. (1982). Acetaminophen and phenol: substrates for both a thermostable and a thermolabile form of human platelet phenol sulfotransferase. *J Pharmacol Exp Ther.*, 221(2), 43-51.

Russell, D. (2000). Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta.*, 1529(1-3), 126-135. doi: 10.1016/s1388-1981(00)00142-6

Russell, D. W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*, 72, 137-174. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712

Scherer, M., Gnewuch, C., Schmitz, G. et Liebisch, G. (2009). Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(30), 3920-3925. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.09.038

Schwarz M, R. D., Dietschy JM, Turley SD. (1998). Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 α -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. *J Lipid Res.*, 39(9), 1833-1843.

Schwarz, M., Wright, A. C., Davis, D. L., Nazer, H., Bjorkhem, I. et Russell, D. W. (2000). The bile acid synthetic gene 3beta-hydroxy-Delta(5)-C(27)-steroid oxidoreductase is mutated in progressive intrahepatic cholestasis. *J Clin Invest*, 106(9), 1175-1184. doi: 10.1172/JCI10902

Seyama, Y. (2003). Cholesterol metabolism, molecular pathology, and nutritional implications. *J Med Food*, 6(3), 217-224. doi: 10.1089/10966200360716634

Shapiro, H., Kolodziejczyk, A. A., Halstuch, D. et Elinav, E. (2018). Bile acids in glucose metabolism in health and disease. *J Exp Med*, 215(2), 383-396. doi: 10.1084/jem.20171965

Shefe S., S. G., Hauser S., Dayal B., Batta A.K. (1982). Metabolism of Iso-Bile Acids in the Rat. *J Biol Chem.*, 257(3), 1401-1406.

Shiraki K, I. T., Sugimoto K, Fuke H, Inoue T, Miyashita K, Yamanaka T, Suzuki M, Nabeshima K, Nakano T, Takase K. . (2005). Different effects of bile acids, ursodeoxycholic acid and deoxycholic acid, on cell growth and cell death in human colonic adenocarcinoma cells. . *Int J Mol Med.*, 16, 729-733. <https://doi.org/10.3892/ijmm.16.4.729>

Shukla, A. K. et Futrell, J. H. (2000). Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *Journal of Mass Spectrometry*, 35(9), 1069-1090. doi: 10.1002/1096-9888(200009)35:9<1069::Aid-jms54>3.0.Co;2-c

Staels, B. et Fonseca, V. A. (2009). Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care*, 32 Suppl 2, S237-245. doi: 10.2337/dc09-S355

Stroup, D., Crestani, M. et Chiang, J. Y. (1997). Identification of a bile acid response element in the cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene CYP7A. *Am J Physiol*, 273(2 Pt 1), G508-G517. doi: 10.1152/ajpgi.1997.273.2.G508

Tagliacozzi, D., Mozzi, A. F., Casetta, B., Bertucci, P., Bernardini, S., Di Ilio, C., . . . Federici, G. (2003). Quantitative analysis of bile acids in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: a simple and rapid one-step method. *Clin Chem Lab Med*, 41(12), 1633-1641. doi: 10.1515/CCLM.2003.247

Tredger, J. M., Thuluvath, P., Williams, R. et Murray-Lyon, I. M. (1995). Metabolic basis for high paracetamol dosage without hepatic injury: a case study. *Hum Exp Toxicol*, 14(1), 8-12. doi: 10.1177/096032719501400102

Twisk, J., Hoekman, M. F., Lehmann, E. M., Meijer, P., Mager, W. H. et Princen, H. M. (1995). Insulin suppresses bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes by down-regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase gene transcription. *Hepatology*, 21(2), 501-510.

Twycross, R., Pace, V., Mihalyo, M. et Wilcock, A. (2013). Acetaminophen (paracetamol). *J Pain Symptom Manage*, 46(5), 747-755. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2013.08.001

Urban, P. L. (2016). Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 374(2079). doi: 10.1098/rsta.2015.0382

W. Voigt, P. J. T., S.L. Hsia. (1968). Enzymatic studies of bile acid metabolism. I. 6Beta-hydroxylation of chenodeoxycholic and taurochenodeoxycholic acids by microsomal preparations of rat liver. *J. Biol. Chem.* , 243, 3493-3499.

Wegner, K., Just, S., Gau, L., Mueller, H., Gerard, P., Lepage, P., . . . Rohn, S. (2017). Rapid analysis of bile acids in different biological matrices using LC-ESI-MS/MS for the investigation of bile acid transformation by mammalian gut bacteria. *Anal Bioanal Chem*, 409(5), 1231-1245. doi: 10.1007/s00216-016-0048-1

Woolbright, B. L., McGill, M. R., Staggs, V. S., Winefield, R. D., Gholami, P., Olyae, M., . . . Acute Liver Failure Study, G. (2014). Glycodeoxycholic acid levels as prognostic biomarker in acetaminophen-induced acute liver failure patients. *Toxicol Sci*, 142(2), 436-444. doi: 10.1093/toxsci/kfu195

Xiaohan Caia, Y. L., Xiang Zhoua, Udayakumar Navaneethanb, Bo Shenb and Baochuan Guo. (2012). An LC - ESI - MS method for the quantitative analysis of bile acids composition in fecal materials. *Biomed. Chromatogr.* , 26. doi: 10.1002/bmc.1633

Yang, T., Shu, T., Liu, G., Mei, H., Zhu, X., Huang, X., . . . Jiang, Z. (2017). Quantitative profiling of 19 bile acids in rat plasma, liver, bile and different intestinal section contents to investigate bile acid homeostasis and the application of temporal variation of endogenous bile acids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 172, 69-78. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.05.015

Yang Y, Z. M., Eggertsen G, Chiang JY. (2002). On the mechanism of bile acid inhibition of rat sterol 12 α -hydroxylase gene (CYP8B1) transcription: roles of α -fetoprotein transcription factor and hepatocyte nuclear factor 4 α . *Biochim Biophys Acta* 1583, 63-73.

Yousef, I. M., Mignault, D., Weber, A. M. et Tuchweber, B. (1990). Influence of dehydrocholic acid on the secretion of bile acids and biliary lipids in rats. *Digestion*, 45(1), 40-51. doi: 10.1159/000200223

Yudai Suzuki, R. K., Mina Nomura, Hisao Naito, Kazuya Kitamori, Tamie Nakajima, Tadashi Ogawa, Hideki Hattori, Hiroshi Seno and Akira Ishii. (2013). Simple and rapid quantitation of 21 bile acids in rat serum and liver by UPLC-MS-MS: Effect of high fat diet on glycine conjugates of rat bile acids *Nagoya J Med Sci.*, 75, 57-72. doi: 10.18999/nagjms.75.1-2.57