

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉLUCIDATION DE MÉTABOLITES RÉACTIFS D'ESTROGÈNES ET DE  
L'ACIDE TIENILIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA  
SPECTROMÉTRIE DE MASSE À HAUTE RÉOLUTION

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

À LA MAITRISE EN BIOCHIMIE

PAR

KAHINA CHABI

DECEMBRE 2022

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.04-2020). 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

Je voudrais dans un premier temps remercier le professeur Marc Lussier qui a joué un grand rôle dans ma progression académique. Son encadrement depuis la première année du Bac en biochimie, m'a permis de progresser et de devenir l'étudiante que je suis aujourd'hui. Merci pour tout le soutien et les conseils durant toutes ces années.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire qui m'ont tous aidé, encouragé et soutenu tout au long de ma maîtrise. Je me suis sentie privilégiée de faire partie de cette grande famille. J'ai éprouvé beaucoup de plaisir à venir travailler tous les jours.

Je voudrais remercier ma famille, tout particulièrement, mes parents pour m'avoir soutenu et encouragé durant toutes les étapes de mon parcours. Mon mari qui est un pilier dans ma vie et qui a toujours cru en moi et mon fils qui a vécu cette dernière année de maîtrise avec moi à travers ma grossesse.

Finalement, je voudrais remercier ma directrice de recherche le professeur Lekha Sleno qui m'a ouvert les portes de son laboratoire dans le cadre d'un stage et qui m'a permis de poursuivre ma maîtrise au sein de son équipe. Merci pour votre confiance et votre encadrement. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour son soutien durant cette dernière année qui a été grandement mouvementée par les aléas de ma grossesse, merci pour votre aide et vos conseils, sans vous tout cela n'aurait pas été possible.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
TABLE DES MATIÈRES .....	iii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	ix
RÉSUMÉ.....	xii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....	13
1.1 Le métabolisme des molécules endogènes et des xénobiotiques.....	13
1.1.1 La métabolomique.....	13
1.1.2 Le métabolisme .....	14
1.2 Toxicité des métabolites réactifs .....	16
1.3 Analyse <i>in vitro</i> en utilisant différents agents de piégeages .....	21
1.4 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem .....	24
1.4.1 Chromatographie liquide à haute performance .....	24
1.4.2 Spectrométrie de masse.....	26
1.5 Objectif de l'étude .....	35
CHAPITRE 2 ARTICLE SCIENTIFIQUE: ESTRADIOL, ESTRONE AND ETHINYL-ESTRADIOL METABOLISM STUDIED BY HIGH RESOLUTION LC- MS/MS USING STABLE ISOTOPE LABELING AND TRAPPING OF REACTIVE METABOLITES .....	37
2.1 Résumé .....	39
2.2 Abstract.....	40
2.3 Introduction.....	41
2.4 Materials and Methods .....	44
2.4.1 Materials.....	44
2.4.2 <i>In vitro</i> Incubations .....	45

2.4.3 LC-HRMS/MS Analysis and Data Processing .....	45
2.5 Results .....	46
2.5.1 Oxidative metabolites.....	49
2.5.2 Reactive metabolites .....	56
2.6 Discussion.....	60
2.6.1 Oxidative metabolism .....	60
2.6.2 GSH and NAC adducts .....	62
2.7 Conclusions .....	63
2.8 Supplemental Material.....	65
CHAPITRE 3 ARTICLE SCIENTIFIQUE : REACTIVE METABOLITES OF TIENILIC ACID STUDIED BY LC-MS/MS USING DIFFERENT TRAPPING AGENTS .....	72
3.1 Résumé .....	74
3.2 Abstract.....	75
3.3 Introduction.....	76
3.4 Materials and Methods .....	78
3.4.1 Materials.....	78
3.4.2 <i>In vitro</i> Incubation.....	78
3.4.3 LC-HRMS/MS Analysis and Data Processing .....	79
3.5 Results and Discussion .....	80
3.5.1 Oxidative Metabolism.....	81
3.5.2 Reactive metabolites .....	83
3.6 Conclusions .....	90
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....	91
4.1 Le métabolisme de l'estradiol, estrone et ethinyl-estradiol étudié par LC- HRMS/MS en utilisant le marquage isotopique.....	91
4.2 Le métabolisme de l'acide tienilique étudié par LC-MS/MS en utilisant différents agents de piégeage.....	97
CONCLUSION .....	102
BIBLIOGRAPHIE .....	104

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Schéma représentatif de la hiérarchie des sciences «omiques».....	14
Figure 1.2 Métabolisme des xénobiotiques et formation des métabolites réactifs.....	16
Figure 1.3 Études in vitro de la formation de métabolites réactifs .....	21
Figure 1.4 Structures des trois agents de piégeage à l'étude, et exemple de formation d'un adduit GSH à partir d'un métabolite réactif produit par biotransformation de l'estradiol. Le site d'adduction de chaque agent est indiqué en rouge. ....	23
Figure 1.5 Schéma général d'un système de chromatographie en phase liquide à haute performance.....	26
Figure 1.6 Schéma général d'un spectromètre de masse .....	27
Figure 1.7 Schéma simplifié du système d'électronébulisation ESI. ....	28
Figure 1.8 Schéma général d'un spectromètre de masse en tandem de type quadripôle-temps de vol (QqTOF). ....	31
Figure 1.9 Schéma explicatif des deux modes d'acquisition DDA et DIA lors d'une analyse non ciblée en spectrométrie de masse en tandem.....	32
Figure 1.10 Exemple illustrant la différence de masse précise détectable par spectrométrie de masse entre une hormone (estradiol) et sa version marquée par un isotope stable (estradiol-d <sub>4</sub> ).....	34
Figure 1.11 Comparaison entre deux spectres MS représentant un vrai (à gauche) et un faux (à droite) adduit NAC formé suite à l'incubation in vitro de l'acide tienilique. ....	35
Figure 2.1 Chemical structures of the three estrogen analogs used in this study. Deuterated positions (2,4,16) are noted with * for d <sub>4</sub> -isotope-labelled standards used. ....	47
Figure 2.2 Extracted ion chromatograms for protonated E1, E2 and EE2 from control incubations (at 10 μM). Both E2 and EE2 exhibit a facile water loss in the electrospray source.....	47

- Figure 2.3 High-resolution MS/MS spectra of protonated ions of E2-H<sub>2</sub>O, EE2-H<sub>2</sub>O and E1 with annotated fragment ions, including mass accuracies (ppm). ..... 48
- Figure 2.4 High-resolution extraction ion chromatograms of oxidative metabolites formed from E2, EE2 and E1 in human liver microsomal incubations. Some peaks (\*) were increased by 5× for clarity. .... 50
- Figure 2.5 Proposed biotransformation reactions of unlabeled and deuterated E1, E2 and EE2 detected in human and rat microsomal incubations. As estrone and estradiol undergo similar metabolic profiles, only the structures from estrone are proposed to simplify the figure; the adduct formed with GSH can be formed with NAC. Peaks are annotated if structures could be determined for specific retention times. .... 55
- Figure 2.6 Extracted ion chromatograms of E2,EE2 and E1 metabolites and adducts trapped by GSH, for their non-labeled (left) and deuterated versions (right). Some peaks (\*) were increased by 5× for clarity ..... 57
- Figure 2.7 High-resolution MS/MS spectra of isomeric E2+O-2H+GSH adducts in their unlabeled and labeled forms, all fragment ions assigned were under 5 ppm. .... 61
- Figure 2.8 High-resolution extraction ion chromatograms of oxidative metabolites formed from E2, EE2 and E1 in rat liver microsomal incubations. .... 65
- Figure 2.9 Extracted ion chromatograms of E2,EE2 and E1 metabolites and adducts trapped by NAC, for their non-labeled and deuterated versions. Some peaks (\*) were increased by 5× for clarity. .... 66
- Figure 2.10 Extracted ion chromatograms of E2,EE2 and E1 metabolites and adducts trapped by GSH. .... 67
- Figure 3.1 Extracted ion chromatogram of protonated TA (1a) and TOF-MS of precursor isotopic pattern (ppm shown in parentheses) (1b). .... 80
- Figure 3.2 HR-MS/MS spectrum and proposed fragmentation of TA (all fragment ions were within 5 ppm of corresponding ion formula). .... 81
- Figure 3.3 High-resolution extraction ion chromatogram of stable oxidative metabolite (TA+O) formed in rat liver microsomal incubations with TA and NADPH (3a) and HR-MS/MS spectrum and proposed fragmentation of TA+O (all fragment ions were within 5 ppm of corresponding ion formula) (3b). .... 82

Figure 3.4 Extracted ion chromatograms of TA metabolites formed in presence of RLM and trapped by GSH or NAC. Peaks with asterisk (*) were increased by 5× for clarity.....	84
Figure 3.5 HR-MS/MS spectrum of TA-2H+GSH adduct at 7.7 min. ....	85
Figure 3.6 Extracted ion chromatograms of TA metabolites formed in presence of RLM and trapped by NAL. ....	87
Figure 3.7 Proposed biotransformation reactions of TA detected from human and rat microsomal incubations. ....	89



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Exemples de molécules dont les intermédiaires réactifs apparus par biotransformation induisent une toxicité.....	20
Table 2.1 Summary of metabolites and adducts characterized for E1, E2 and EE2 in human and rat liver microsomes .....	51
Table 2.2 Summary of metabolites and adducts characterized for E1, E2 and EE2 in human and rat liver microsomes, fragments related to the trapping agent are shown in bold.....	68
Table 3.1 TA metabolites and adducts detected in RLM and HLM incubations.....	88

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ACN	Acétonitrile
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique ( <i>atmospheric-pressure chemical ionization</i> )
AT	Acide tienilique
BocHis	N $\alpha$ -Boc-L-histidine
BPA	Bisphénol A
CID	Fragmentation induite par collision ( <i>collision induced dissociation</i> )
CYP	Cytochrome P450
CYP450	Cytochrome P450
CYP2C9	Cytochrome P2C9
DDA	Acquisition dépendante des données ( <i>data dependent acquisition</i> )
DIA	Acquisition indépendante des données ( <i>data independent acquisition</i> )
ESI	Électronébulisation ( <i>electrospray</i> )
E2	17 $\beta$ -estradiol
E1	Estrone
EE2	17 $\alpha$ -éthynyl-estradiol
E2-d <sub>4</sub>	17 $\beta$ -estradiol-d <sub>4</sub>

E1-d <sub>4</sub>	Estrone-d <sub>4</sub>
EE2-d <sub>4</sub>	17 $\alpha$ -ethinyl-estradiol-d <sub>4</sub>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
GC	Chromatographie gazeuse ( <i>Gas chromatography</i> )
GSH	Glutathion
HLM	Microsomes hépatique humain
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance ( <i>High-performance liquid chromatography</i> )
HRMS	Spéctrométrie de masse à haute résolution (High-resolution mass spectrometry)
m	Masse
MeOH	Méthanol
MR	Métabolites réactifs
MS	Spectrométrie de masse
NAC	N-acétylcystéine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAL	N-acétyllysine
NAPQI	N- 7 acetyl-p-benzoquinone imine
ppm	Partie par million
Q1	Quadripôle 1
q2	Quadripôle 2

QqTOF	Analyseur à temps de vol quadripolaire ( <i>quadrupole time of flight mass analyzer</i> )
RE	Réticulum endoplasmique
RLM	Microsome hépatique de rat
ROS	Espèces réactives de l'oxygène ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Rotation par minute
TOF	Analyseur à temps de vol ( <i>time of flight analyzer</i> )

## RÉSUMÉ

Les hormones endogènes, synthétiques et les médicaments sont métabolisés par le foie afin d'être correctement éliminés de l'organisme. Toutes ces molécules sont susceptibles de former des métabolites réactifs. Se sont électrophiles puissants capables d'interagir avec les nucléophiles cellulaires (protéines, ADN) causant une toxicité pouvant être mortelle. Les métabolites réactifs formés à la suite du métabolisme des hormones par les microsomes hépatiques sont impliqués dans plusieurs voies métaboliques responsables de l'apparition du cancer du sein chez la femme. L'acide tienilique comme un grand nombre de médicaments a été retiré du marché du fait de l'apparition d'une hépatotoxicité ayant conduit à la mort de certaines personnes. L'exposition quotidienne à ces contaminants nous pousse à développer des méthodes analytiques performantes afin d'en limiter les effets néfastes. Dans le but de détecter et de caractériser un maximum de métabolites réactifs, nous avons développé deux approches analytiques. Nous avons tout d'abord soulevé l'importance du marquage isotopique dans l'analyse structurale des adduits métaboliques. La structure de ces métabolites étant souvent inconnue, le marquage isotopique sert de repère lors de leur caractérisation. Par la suite, nous avons pu démontrer l'importance d'utiliser différents agents de piégeage lors de l'étude *in vitro* du métabolisme de toute sorte de molécules. Chaque composé étant capable d'être biotransformé en une variété de molécules réactives, il est important de ne pas limiter nos analyses à l'utilisation d'un agent de piégeage au risque de passer à côté d'un métabolite potentiellement toxique. Lors de chacune, des expériences menées, la préparation des échantillons et l'analyse par LC-MS/MS ont permis la caractérisation de métabolites connus et encore non identifiés pour chaque molécule à l'étude et ceux avec tous les agents de piégeage. L'efficacité de la méthode démontrée par les résultats obtenus nous permet d'élargir nos recherches à un plus grand nombre de molécules.

Mots clés : Métabolisme , Métabolites réactifs, LC-MS/MS, Estradiol, Estrone, Ethinyl-estradiol, Acide Tienilique, Marquage isotopique, Agents de piégeage, Élucidation structurale.

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 Le métabolisme des molécules endogènes et des xénobiotiques

#### 1.1.1 La métabolomique

Les sciences «-omiques» étudient la biologie dans sa version systémique, elles regroupent la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique (Figure 1.1). La métabolomique se développe depuis la fin des années 1990 et se concentre sur l'étude des métabolites, molécules de petites tailles (< 1500 Da) formées au cours du métabolisme de substances endogènes ou exogènes (xénobiotiques) (Patterson *et al.*, 2010). La métabolomique permet donc l'étude de la composition métabolique d'un échantillon biologique à un temps donné. Les métabolites sont représentatifs des modifications biologiques pouvant apparaître chez un individu résultant de l'exposition à différentes sources internes et externes tels que la génétique, l'alimentation, l'environnement, les médicaments (Ellero-Simatos *et al.*, 2019). La réponse d'une cellule à un toxique, par exemple, conduira à une perturbation biochimique qui pourra être étudiée. L'urine, est le fluide corporel dont le profil biochimique est le plus souvent modifié lors de l'exposition à un stress. Ainsi, l'étude du métabolome (ensemble des métabolites qui comprend les molécules de la famille des acides aminés, glucides, nucléosides, lipides, etc.) permet une meilleure compréhension des processus biologiques et l'identification de biomarqueurs clés pour le diagnostic de diverses maladies (Cui *et al.*, 2018).

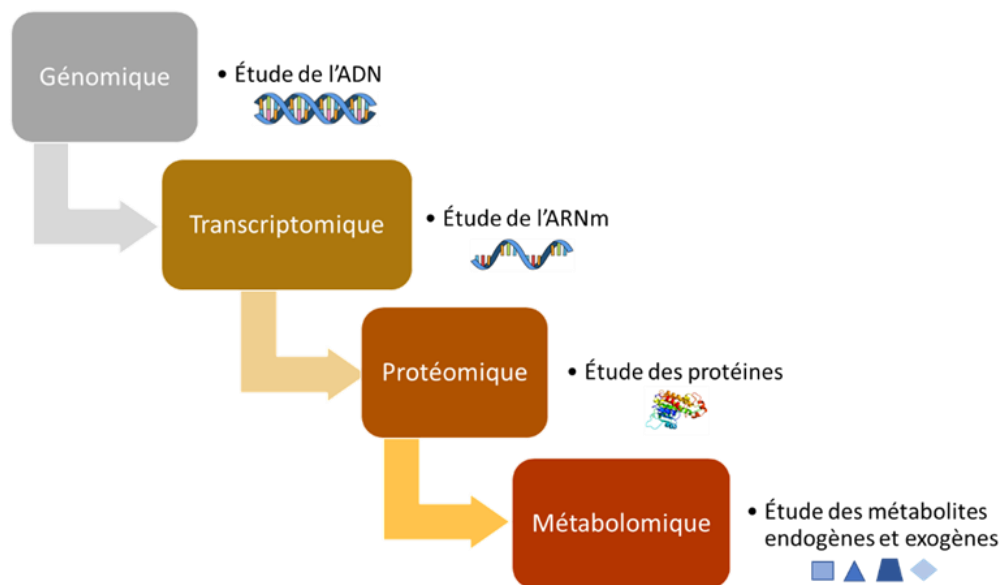


Figure 1.1 Schéma représentatif de la hiérarchie des sciences «omiques».

### 1.1.2 Le métabolisme

Un bon nombre de molécules endogènes ainsi que certains xénobiotiques se trouvent être des molécules hydrophobes capables de traverser la membrane cellulaire et de s'y accumuler. Le métabolisme permet alors, la transformation de ces molécules en substances hydrophiles afin de faciliter leur élimination à travers les fluides biologiques (urine). Ce processus se produit majoritairement dans le foie, mais il peut se dérouler dans différents tissus tels que les reins, les poumons, le placenta, les intestins et les tissus adipeux, etc. Lors du métabolisme, les molécules subiront des biotransformations médiées par des enzymes produites par le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Ellero-Simatos *et al.*, 2019). Les enzymes principalement impliquées dans ce processus métabolique font partie de la famille du cytochrome P450 (CYP450). Les CYP sont une famille d'hémo protéines identifiées pour la première fois comme des pigments présents dans les microsomes de foie de rat. Ces hémo protéines

tirent leur nom de leur capacité à émettre un spectre d'absorbance à 450 nm. Pour agir, les CYP nécessitent une source d'électrons, qui sera est fournie par le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Guéguen *et al.*, 2006). NADPH est également impliqué dans les mécanismes de protection contre le stress oxydatif qui conduit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Testa et Krämer, 2006). Les voies de biotransformation sont divisées en trois phases, qui peuvent se dérouler simultanément ou séquentiellement. Le métabolisme de phase I catalysé essentiellement par les enzymes du CYP450 produit des métabolites polaires, solubles dans l'eau, souvent encore actifs. Il catalyse essentiellement des réactions d'oxydoréduction (molécule + O<sub>2</sub> + NADPH -> molécule\* + H<sub>2</sub>O + NADP<sup>+</sup>) et d'hydrolyse, l'objectif étant d'ajouter ou d'exposer un groupement fonctionnel polaire tel que -OH, -NH<sub>2</sub> ou -COOH. De nombreux produits de cette phase peuvent également devenir des substrats pour la phase II. Les réactions de phase II consistent à rendre la molécule parent ou un des intermédiaires formés en phase I plus hydrophile. On parle dans ce cas de réactions de conjugaison qui comprennent par exemple la glucuronidation, l'acétylation, la sulfation, la conjugaison au glutathion, etc (Attia, 2010).

Certains xénobiotiques subissent après la phase II un métabolisme supplémentaire dit de phase III. Dans cette phase, des transporteurs spécifiques sont impliqués. Les transporteurs ABC «ATP binding cassette» sont des protéines transmembranaires dont la fonction est de permettre aux molécules de franchir la membrane cellulaire, ce processus implique la consommation d'ATP. Les transporteurs SLC «SoLute Carrier» sont des transporteurs actifs secondaires ou indirects qui favorisent un transport actif de solutés. Ce transport ne requiert pas la consommation d'ATP, mais utilise l'énergie produite par la différence de potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane (Patterson *et al.*, 2010).



Le rôle du métabolisme est donc d'inactiver et d'éliminer les métabolites de l'organisme. Cependant, il n'est pas rare que certaines molécules bioactivées et non éliminées présentent une toxicité plus importante que la molécule parent, on parle alors de métabolites réactifs (MR). Ces métabolites toxiques sont hautement réactifs et auront tendance à interagir rapidement avec les molécules présentes dans leur environnement induisant une toxicité cellulaire, s'ils ne subissent pas rapidement une biotransformation supplémentaire permettant leur élimination (Naisbitt *et al.*, 2001). La figure 1.2 résume les voies métaboliques menant à la formation de métabolites réactifs.

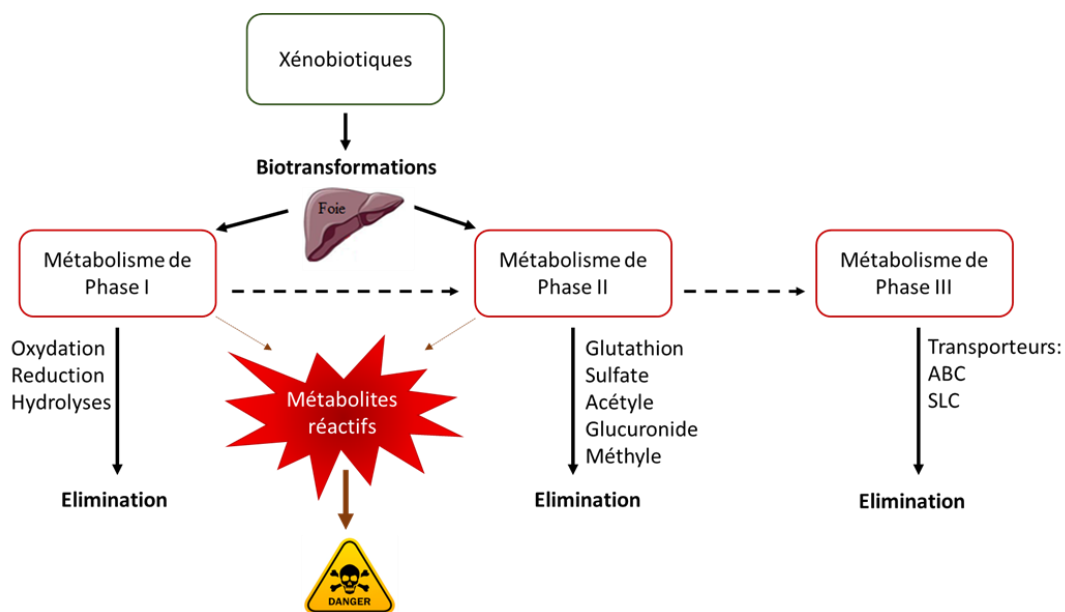


Figure 1.2 Métabolisme des xénobiotiques et formation des métabolites réactifs.

## 1.2 Toxicité des métabolites réactifs

Les métabolites réactifs formés par bioactivation sont réputés pouvoir induire des effets néfastes. Les MR sont des électrophiles ou des radicaux libres, pouvant être classifiés en électrophiles "mous" tels que les époxydes, les carbonyles  $\alpha,\beta$ -insaturés, les

quinones, les quinones-imines, les méthides de quinone, les isocyanates, les isothiocyanates, ou comme des électrophiles "durs" tels que les aldéhydes et les ions « iminium ». Les radicaux libres quant à eux désignent les ROS (Li *et al.*, 2011).

Les quinones par exemple, sont capables d'induire des effets délétères importants provoquant une immunotoxicité, une cytotoxicité et une carcinogénèse (Tableau 1.1). Elles agissent comme pro-oxydant en contribuant à la formation de ROS, en tant qu'électrophiles elles peuvent former des liaisons covalentes avec différents nucléophiles cellulaires. Étant des accepteurs de Michael, les quinones peuvent alkyler les protéines ou l'ADN, elles agissent sur les résidus soufrés des molécules tels que le glutathion (GSH), les résidus de cystéine des protéines, ou encore avec les groupements amines des protéines et de l'ADN (Klopčič et Dolenc, 2019).

Différentes molécules peuvent être oxydées par les ROS causant des dommages irréparables. L'oxydation des protéines peut conduire à une accumulation cellulaire de protéines oxydées qui seront impliquées dans diverses pathologies. Les lipides et l'ADN peuvent également être affectés par les ROS, via l'oxydation des purines (Klopčič et Dolenc, 2019).

La forte réactivité des MR, les poussent à interagir avec les centres nucléophiles des macromolécules cellulaires altérant les systèmes de signalisation cellulaires provoquant des réponses biologiques complexes difficilement caractérisables. L'industrie pharmaceutique est particulièrement sensible à la formation des MR, en effet, chaque année des médicaments sont retirés du marché suite à l'apparition d'effets toxiques induits par la présence de métabolites réactifs. L'acétaminophène est l'exemple le plus classique de médicaments pouvant induire une hépatotoxicité (Tableau 1.1). Ce dernier, est oxydé par le CYP450 en un intermédiaire réactif le N-acétyl-imidoquinone (N-7 acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI), une quinone imide qui peut réagir avec les thiols libres. Ce MR sera naturellement éliminé par conjugaison

au GSH. Cependant, en cas de surdosage, on observe une déplétion du glutathion qui entrainera un stress oxydatif responsable de la liaison covalente du NAPQI aux protéines hépatiques. La réaction immunitaire qui en découle mènera à une nécrose hépatocellulaire (Thompson *et al.*, 2011).

Les MR peuvent également entrainer une inhibition de l'enzyme impliquée dans leur formation. On peut citer en exemple l'acide tienilique qui est un diurétique retiré du marché au bout de 6 mois suite à l'apparition d'hépatite immunoallergique chez certains patients, ayant entrainé la mort dans certains cas. Le groupe de Mansuy a élucidé le mécanisme conduisant à cette immunotoxicité (Tableau 1.1). Chez l'homme, l'acide tienilique est métabolisé par le CYP2C9, le métabolite réactif formé est à son tour capable d'alkyler le CYP2C9 conduisant à une réponse immunitaire (Nishiya *et al.*, 2008).

Parmi les différents xénobiotiques auxquels nous sommes exposés on retrouve le bisphénol A (BPA) utilisé dans divers produits de la vie quotidienne tels que les plastiques (biberons, bouteilles d'eau, boîtes de conservations des aliments, équipements de sport, revêtements de bâtiments, boîtes de conserve et bien plus encore). Depuis quelques années, de nombreuses études ont permis de mettre en avant son rôle de perturbateurs endocriniens par la formation de métabolites réactifs (Tableau 1.1). Dès lors, de nombreux pays comme le Canada, les États-Unis et l'Angleterre ont banni ce composé de la fabrication des contenants alimentaires (Ousji *et al.*, 2020).

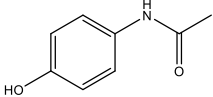
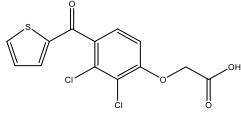
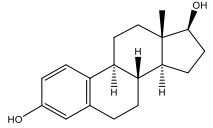
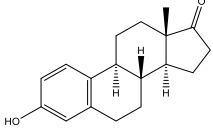
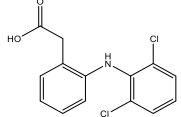
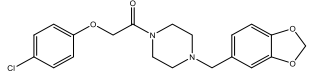
Certaines molécules endogènes peuvent également être source de toxicité. En effet, de plus en plus d'études semblent indiquer que les estrogènes endogènes tels que l'estradiol et l'estrone jouent un rôle essentiel dans le développement du cancer du sein par la formation de métabolites réactifs (Tableau 1.1) (Samavat et Kurzer, 2015). Il a été démontré que la 4-hydroxylation de l'estradiol par les microsomes humains conduit à la formation d'un catéchol estradiol capable d'endommager l'ADN. Il y aurait

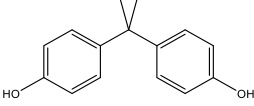
formation d'adduits dépuratifs capables de causer des dommages qui mèneront à l'initiation du cancer du sein. Des études menées sur l'animal semblent indiquer qu'une augmentation de la 16 $\alpha$ -hydroxylation de l'estrone serait associées à une augmentation de la prolifération de cellules mammaires, à une surexpression de l'oncogène RAS et à l'incidence des tumeurs mammaires (Samavat et Kurzer, 2015).

La forte propension des médicaments à former des MR a conduit l'industrie pharmaceutique à augmenter de manière substantielles les efforts menés afin de s'assurer de l'innocuité des médicaments nouvellement mis sur le marché. Cependant, malgré de nombreux efforts, on observe un taux élevé de retrait des médicaments lors des processus précliniques et clinique suite à l'apparition d'une toxicité (Thompson *et al.*, 2011). Bien que de nombreux facteurs puissent être mis en cause dans la toxicité induite par les médicaments, l'un des mécanismes importants par lequel la toxicité survient est la formation de MR. Toutefois, les mécanismes sous-jacents restent complexes à définir et l'apparition de MR ne provoque pas nécessairement d'effets néfastes. En fonction des cellules cibles, de nombreuses enzymes métaboliques peuvent être impliquées, bien que de majoritairement le métabolisme des médicaments se déroule dans le foie impliquant les CYP450.

Notre exposition constante aux métabolites réactifs souligne un besoin urgent de développer des méthodes robustes nous permettant de caractériser le plus précocement possible ces MR afin d'en limiter les effets délétères (Rousu *et al.*, 2009).

Tableau 1.1 Exemples de molécules dont les intermédiaires réactifs apparus par biotransformation induisent une toxicité.

Molécules	Origine	Toxicité	Intermédiaire réactif
<p><b>Acétaminophène</b></p> 	Pharmaceutique	Hépatotoxique	Quinone imine  (Thompson <i>et al.</i> , 2011)
<p><b>Acide Tienilique</b></p> 	Pharmaceutique	Réaction immunoallergique Hépatotoxicité	Époxyde et sulfoxide  (Nishiya <i>et al.</i> , 2008)
<p><b>Estradiol</b></p> 	Endogène	Cancérogène	Quinone (Samavat et Kurzer, 2015)
<p><b>Estrone</b></p> 	Endogène	Cancérogène	Quinone (Samavat et Kurzer, 2015)
<p><b>Diclofénac</b></p> 	Pharmaceutique	Hépatotoxique	Quinone imine (Kawase <i>et al.</i> , 2017)
<p><b>Fipexide</b></p> 	Pharmaceutique	Hépatotoxique et forte fièvre	Quinone (Sleno <i>et al.</i> , 2007)

<p><b>Bisphénol A (BPA)</b></p> 	Contaminant environne-mental	Perturbateur endocrinien	Quinone (Ousji <i>et al.</i> , 2020)
---	---------------------------------	-----------------------------	--

### 1.3 Analyse *in vitro* en utilisant différents agents de piégeages

L'incubation *in vitro* d'espèces endogènes et exogènes en présence de microsomes hépatiques (humain ou animal) est la méthode la plus couramment utilisée pour la détection de métabolites réactifs. Les microsomes sont des structures dérivées de morceaux de réticulum endoplasmique (RE) extraits par centrifugation différentielle de tissus hépatiques contenant les enzymes du cytochrome CYP450 (Guéguen *et al.*, 2006). Les CYP contenues dans les microsomes sont responsables de la biotransformation des xénobiotiques. Lors de ces incubations, un composé à évaluer peut-être facilement ajouté afin d'en étudier le métabolisme. Il sera généralement incubé pendant minimalement une heure à 37°C, dans un tampon phosphate à pH 7,4, en présence d'environ 1,0 mg/ml de fraction microsomale, sans oublier le cofacteur NADPH indispensable au métabolisme oxydatif. Une méthode analytique adéquate sera par la suite utilisée pour caractériser et élucider la structure des métabolites réactifs formés (Ma et Subramanian, 2006). La figure 1.3 résume les étapes d'incubation nécessaire à l'étude de métabolites réactifs *in vitro*.

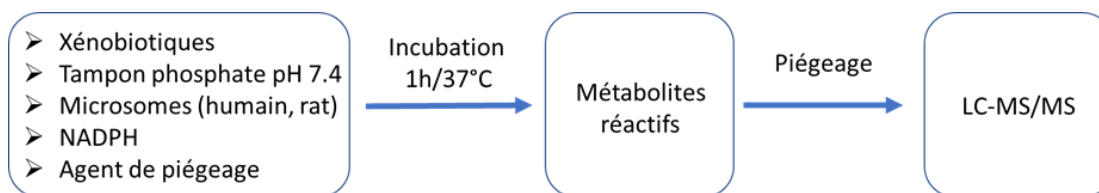


Figure 1.3 Études *in vitro* de la formation de métabolites réactifs.

Les métabolites réactifs sont fortement instables et possèdent une courte durée de vie, ils auront tendance à interagir rapidement avec les molécules cellulaires et seront difficilement détectables dans les fluides corporels (plasma, sérum, urine). C'est pourquoi les approches *in vitro* sont essentielles à l'évaluation de la toxicité d'un composé.

Diverses techniques sont employées pour étudier la formation de métabolites réactifs notamment : le piégeage et la caractérisation des adduits formés, la liaison covalente aux protéines, et l'inhibition du CYP450. Le piégeage est l'une des approches les plus utilisées pour caractériser les MR, par l'étude d'adduits stables formés (Li *et al.*, 2012). Les agents de piégeages sont des nucléophiles, qui doivent être minutieusement sélectionnés afin d'interagir adéquatement avec le type d'électrophile formé lors de l'incubation. Ils seront toujours ajoutés en excès à l'échantillon afin de s'assurer que les MR se lieront de manières covalentes aux agents et non aux protéines microsomales présentes dans le milieu (Li *et al.*, 2012). Le glutathion et son précurseur, le N-acétylcystéine (NAC) sont des agents couramment utilisés. Le GSH est une molécule endogène portant un groupe sulfhydryle libre, faisant de lui un nucléophile doux capable de lier une large gamme d'électrophiles tels que les accepteurs de Michael, les époxydes, les oxydes d'arène, les quinones et bien d'autres (Yan *et al.*, 2007). Étant présent dans quasiment tous les tissus humains, il joue un rôle de détoxifiant naturel. La figure 1.4 représente un exemple de métabolite réactif formé suite à la biotransformation de l'estradiol piégé par le GSH, formant un adduit glutathion. Il a également été démontré que l'utilisation du NAC permettrait d'augmenter la sensibilité de détection des adduits formés (Yan *et al.*, 2007). Cependant, GSH et NAC ne pourront pas être employés pour la détection d'électrophiles durs comme les aldéhydes, des agents alternatifs correspondant à des nucléophiles durs seront alors utilisés. Parmi eux on retrouve le semicarbazide, la méthoxylamine, le N-acétyllysine (NAL),

$N\alpha$ -Boc-L-histidine (BocHis), l'anion cyanure peut être utilisé pour piéger les espèces iminium (Yan *et al.*, 2007).

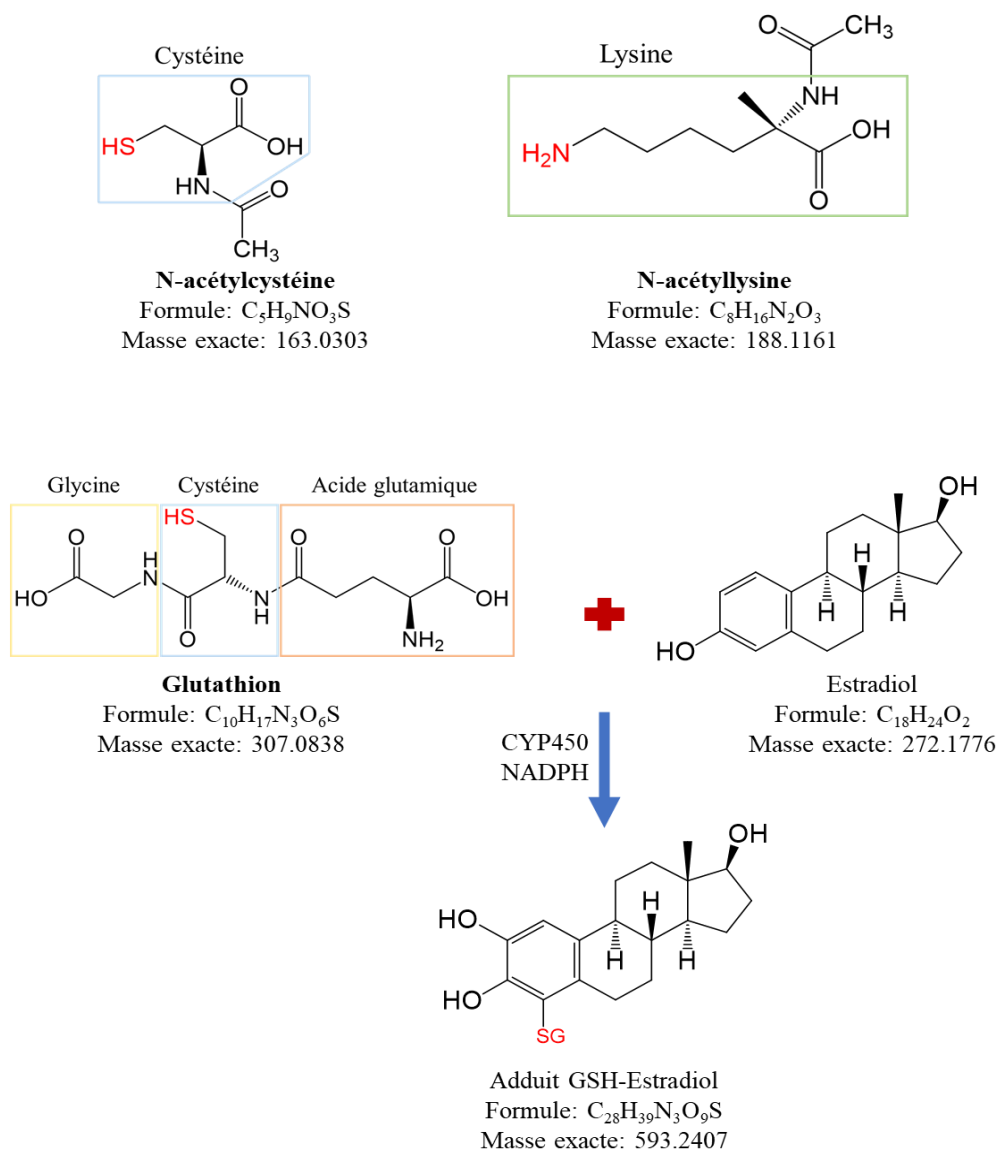


Figure 1.4 Structures des trois agents de piégeage à l'étude, et exemple de formation d'un adduit GSH à partir d'un métabolite réactif produit par biotransformation de l'estradiol. Le site d'adduction de chaque agent est indiqué en rouge.



Les incubations microsomales sont souvent des mélanges complexes et la concentration des différents adduits formés est inférieure à celle du composé parent, c'est pourquoi il est important de posséder une technique de détection sensible et sélective afin de permettre la caractérisation des métabolites piégés et limiter les faux positifs.

#### 1.4 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

##### 1.4.1 Chromatographie liquide à haute performance

Le principe de base de la chromatographie est la séparation des composants de mélanges plus ou moins complexes. Il existe trois grands types de chromatographie : la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie gazeuse (CG) et la chromatographie sur couche mince (CCM).

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéressons à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La qualification de «haute performance» indique qu'une pression élevée sert à générer le débit nécessaire à la séparation des molécules présentes dans l'échantillon à analyser. À ses débuts cette technique portait le nom de chromatographie liquide haute pression et pouvait atteindre une pression de 500 psi. Au début des années 1970 sont apparus des instruments HPLC ayant la capacité d'atteindre des pressions allant jusqu'à 6000 psi. Les progrès technologiques, réalisés sur ces instruments, ont conduit à l'appellation haute performance. La HPLC est désormais l'outil le plus utilisé en chimie analytique, permettant la séparation et la quantification de composés présents à l'état de trace dans divers types d'échantillons pouvant être solubilisés.

Le système HPLC se compose d'un réservoir contenant les phases mobiles. Plusieurs solvants ou tampons de polarités différentes peuvent être utilisés afin de réaliser un gradient d'éluion (Figure 1.5). Une pompe à haute pression permet de programmer le

gradient d'élution, avec une variation de la composition de la phase mobile. Le débit généré par la pompe varie selon le modèle, dans un régime de microlitres à millilitres par minute (Figure 1.5). Le système d'injection permet d'introduire un volume précis d'échantillon dans le flux de la phase mobile, afin qu'il soit transporté jusqu'à la colonne (Figure 1.5). La colonne chromatographique qui contient la phase stationnaire dont la composition permet une séparation des composés (Figure 1.5). Généralement, trois caractéristiques principales de l'échantillon sont utilisées pour déterminer la colonne à utiliser : la polarité, la charge électrique, la taille moléculaire. Les échantillons analysés dans le cadre de ce projet sont séparés en fonction de leur polarité sur une colonne C<sub>18</sub> en phase inverse. Cette colonne se compose de silice greffée par des chaînes linéaires de 18 carbones, ce qui crée une phase stationnaire apolaire (hydrophobe). La phase mobile étant polaire, les composés les plus retenus sont apolaires et possèdent une forte affinité pour la phase stationnaire, et les composés polaires faiblement retenus sont élués en premier. La phase mobile se compose d'une phase aqueuse (eau) et de solvant organique polaire tel que l'acétonitrile et le méthanol. La robustesse de la phase inverse permet une bonne reproductibilité, ce qui en fait un outil de choix. Elle est aujourd'hui utilisée dans plus de 75% des analyses en HPLC. Pour finir, le détecteur permet de percevoir les pics correspondants aux molécules séparées avec des temps de rétention différents (Figure 1.5). Le temps de rétention permet de caractériser qualitativement une substance. L'amplitude des pics et l'aire sous le pic permettent une mesure quantitative.

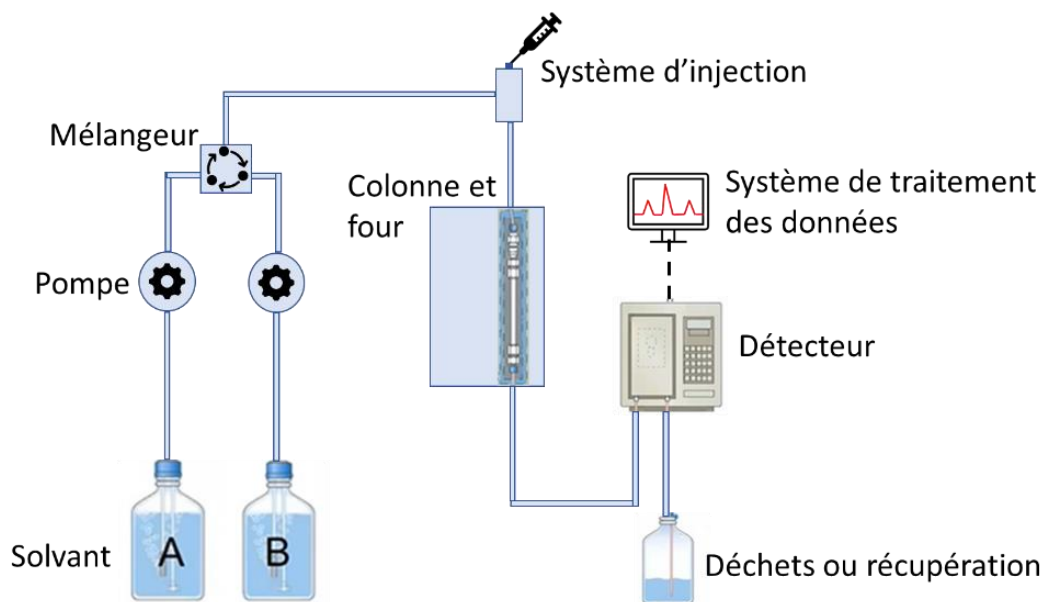


Figure 1.5 Schéma général d'un système de chromatographie en phase liquide à haute performance.

#### 1.4.2 Spectrométrie de masse

Bien qu'elle permette une séparation efficace des constituants d'un mélange complexe, la chromatographie liquide ne permet pas une interprétation structurale des composés. Dès les années 1960, l'idée de coupler la chromatographie à un autre instrument analytique s'est imposée. Les premiers couplages concernaient la chromatographie gazeuse et la spectrométrie de masse. C'est en 1974 que la chromatographie liquide fut associée à la spectrométrie de masse formant la LC-MS.

La spectrométrie de masse est aujourd'hui l'outil analytique de choix dans l'étude du métabolome, particulièrement depuis l'introduction de méthodes d'ionisation dites douces telles que l'électronébulisation (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Couplée à la chromatographie liquide à haute performance, la

spectrométrie de masse devient la technique la plus utilisée pour l'étude du métabolisme des xénobiotiques. C'est un outil polyvalent ne nécessitant pas la dérivation chimique de l'échantillon pour permettre son analyse comparativement à la chromatographie gazeuse (Ma et Subramanian, 2006). De nos jours, la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) s'impose comme la technique de base dans l'étude de métabolites réactifs (Cui *et al.*, 2018).

Un spectromètre de masse se compose d'un système d'introduction, d'une source d'ionisation, d'un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ), d'un détecteur qui reçoit un signal électrique proportionnel aux ions reçus et d'un système de traitements des données qui produira des spectres de masse (Figure 1.6) (Xian *et al.*, 2012).



Figure 1.6 Schéma général d'un spectromètre de masse.

L'introduction de méthodes d'ionisation dites douces telles que l'électronebulisation (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), a permis une avancée considérable dans l'étude de molécules organiques polaires, telles que les métabolites. L'ESI utilisée dans le cadre de cette étude est la méthode la plus employée pour l'analyse de xénobiotiques et leurs métabolites, ainsi que plusieurs autres catégories de biomolécules, telle que les acides aminés, les acides nucléiques, les peptides, et les carbohydrates. Elle repose sur la désolvation d'ions générés par un champ électrique puissant appliqué à la surface d'un liquide. L'échantillon en solution

peut être introduit directement à l'aide d'un système d'introduction (seringue) ou par couplage à un HPLC. La figure 1.7 résume les principales étapes de l'ionisation ESI. L'analyte passe à travers un capillaire métallique maintenu à un potentiel entre 3 et 6 kV, provoquant la formation d'un brouillard de gouttelettes mono- ou multi-chargées. En mode positif, les ions chargés positivement s'accumulent à la surface des gouttelettes. Le solvant s'évapore aidé par le gaz de séchage (azote) qui circule à contrecourant. La taille des gouttelettes diminue jusqu'à ce que la tension de surface ne puisse plus s'opposer aux forces de répulsions électrostatiques entre charges de même signe. Ce qui crée une explosion des gouttelettes, on parle alors d'explosion coulombienne. Ces fissions se poursuivent jusqu'à ce que les gouttelettes ne contiennent plus qu'un seul ion chargé. Lorsque le solvant s'évapore de la dernière gouttelette, un ion en phase gazeuse se forme. Enfin, une série de lentilles placées sous vide permet de focaliser le faisceau d'ions à l'entrée du spectromètre de masse. Un gaz rideau (curtain gas) assure l'évaporation totale du solvant et empêche l'entrée dans le spectromètre de masse.

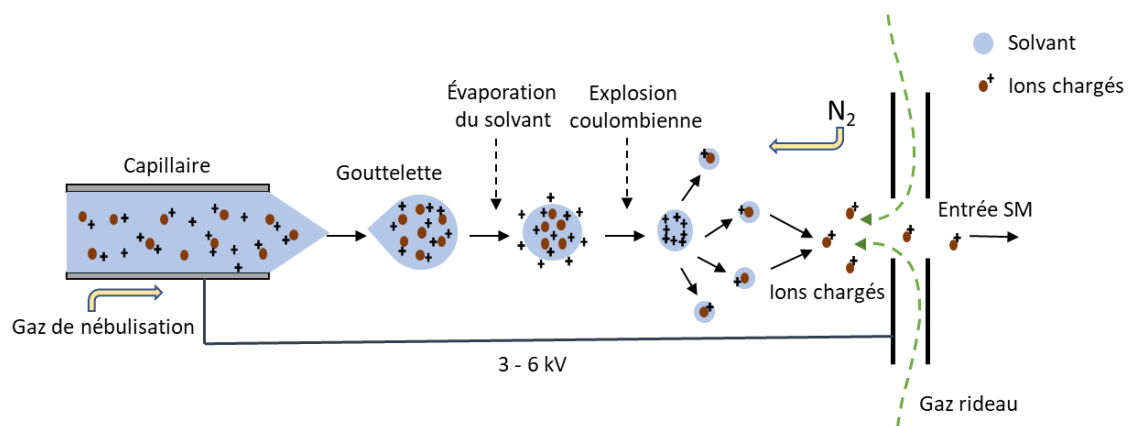


Figure 1.7 Schéma simplifié du système d'électronébulisation ESI.

La spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) se caractérise par sa capacité à séparer deux pics de masse proche (résolution) et de mesurer la masse exacte d'un

composé avec une précision inférieure à 0,001 Da ce qui permet d'étudier la composition élémentaire d'un ion (Xian *et al.*, 2012). Le pouvoir de résolution en masse est indispensable à l'évaluation des performances d'un analyseur de masse. La résolution en masse se définit comme la différence de masse minimale entre deux pics du spectre de masse nécessaire pour qu'une vallée se forme entre eux. Le pouvoir de résolution de masse entre deux pics de masse  $m_1$  et  $m_2$  est égal à  $(m_1/(m_2-m_1))$ . La résolution peut également être définie pour un pic seul de masse  $m$ , elle correspond alors à  $m/m_{50\%}$ ,  $m_{50\%}$  correspond à la pleine largeur à mi-hauteur du pic. Expérimentalement, les pics sont souvent de hauteurs inégales, le pouvoir de résolution nécessaire pour produire une vallée entre ces deux pics doit souvent être très élevé (G. Marshall *et al.*, 2013). La précision de masse se calcule en partie par million (ppm) en divisant la masse mesurée et la masse exacte théorique d'un composé par la masse exacte multipliée par un million. Les spectromètres de masse à haute résolution nous permettent d'obtenir des précisions inférieures à 5 ppm. La résolution élevée ainsi que la précision de masse permettent de réduire le nombre de formules possible lors de l'élucidation de structure de molécule inconnue. Il existe différents spectromètres de masse haute-résolution, l'analyseur à temps de vol (TOF, *Time of flight*) utilisé dans le cadre de cette étude, les analyseurs Orbitrap et les analyseurs à résonance cyclonique ionique (FTICR). L'analyseur TOF utilisé offre une résolution spectrale d'environ 30 000 avec une précision de masse inférieure à 5 ppm. L'Orbitrap, par exemple, permet d'obtenir une résolution spectrale allant supérieur à 500 000, et une précisions de masse inférieure à 1 ppm, cependant ces appareils sont fortement couteux. (Xian *et al.*, 2012).

Les échantillons étant souvent très complexes il est nécessaire de posséder un appareil d'une grande sensibilité afin caractériser les métabolites réactifs formés. Les analyseurs à temps de vol fournissent un niveau de sélectivité important. En effet, ils sont capables de séparer efficacement des ions de masse similaire, avec une mesure de masse exact,

ce qui est non négligeable lorsque l'on doit prédire la formule et la structure d'un composé inconnu.

Les échantillons étant souvent très complexes, il est nécessaire de posséder un appareil de détection puissant d'une grande sensibilité afin de bien caractériser les métabolites réactifs formés. Les analyseurs à temps de vol fournissent un niveau de sélectivité important. En effet, ils sont capables de séparer efficacement des ions de masse similaire, avec une mesure de masse exacte, ce qui est non négligeable lorsque l'on doit prédire la formule et la structure d'un composé inconnu. La spectrométrie de masse en tandem permet d'obtenir des renseignements supplémentaires sur l'analyte en permettant une analyse plus précise de sa structure grâce à la fragmentation. Le spectromètre de masse à temps de vol quadripolaire (QqTOF) est un instrument hybride combinant un quadripôle à un analyseur de masse à temps de vol (Allen et McWhinney, 2019). Le premier quadripôle (Q1) fonctionne comme un filtre de masse, il permet soit la sélection d'ions spécifiques dépendamment du rapport masse sur charge ou de laissez-passer tous les ions vers une cellule de collision, correspondant au quadripôle (q2). Dans cette cellule les ions entrent en collision avec des molécules de gaz neutre (hélium, azote, argon) permettant leur fragmentation. Dans cette étude, la fragmentation induite par collision (CID, collision induced dissociation) est utilisée. Lors de la collision, l'énergie cinétique de collision est convertie en énergie interne entraînant la fragmentation de l'ion précurseur. À la sortie du q2 les ions sont accumulés avant d'être pulsés par un champ électrique à travers l'analyseur à temps de vol dans un vide poussé orthogonalement à leur direction d'origine. Les ions de même rapport  $m/z$  recevront une quantité égale d'énergie cinétique, de sorte qu'ils atteindront le détecteur dans l'ordre inverse de leur masse c'est-à-dire que les ions de faible masse atteindront le détecteur en premiers suivis par des ions de masse plus importante. Le rapport  $m/z$  des ions sera alors calculé à partir du temps nécessaire pour traverser le tube-de-voil (Allen et McWhinney, 2019).

L'analyseur TOF permet une sensibilité importante lors d'acquisition de données sur une large gamme de masse sur un temps très court, il faut quelques microsecondes pour qu'un ion traverse le tube de vol et atteigne le détecteur produisant un spectre de haute résolution. Dans le but d'augmenter la résolution et la précision de masse, les analyseurs TOF sont dotés un dispositif nommé réflectron qui permet de corriger la dispersion et les variations d'énergie acquise dans l'espace par des ions de même  $m/z$ , leur permettant d'arriver au même moment au détecteur (Figure 1.8) (Allen et McWhinney, 2019). L'étude des spectres de fragmentations obtenus en bout de ligne permette l'étude structurale des métabolites.

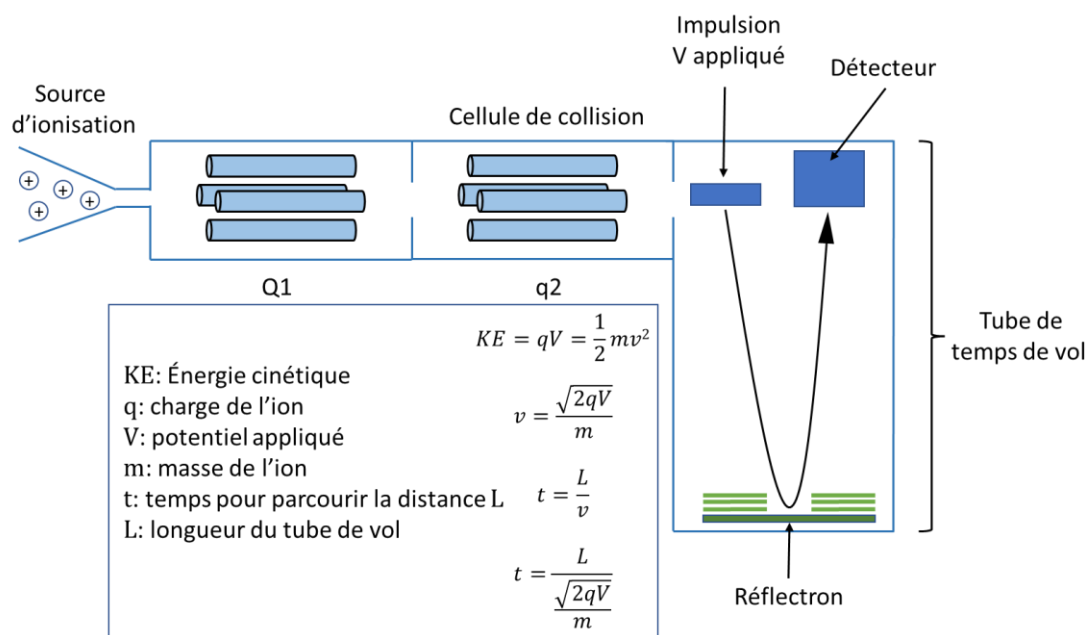


Figure 1.8 Schéma général d'un spectromètre de masse en tandem de type quadripôle-temps de vol (QqTOF).



La spectrométrie de masse peut être classée en deux catégories distinctes: l'analyse ciblée basée sur une approche quantitative pour des métabolites connus et l'analyse non ciblée qui vise à détecter un maximum de métabolites généralement inconnus. L'étude du métabolisme des xénobiotiques dans l'objectif de déceler une éventuelle toxicité se fait généralement en mode non ciblée.

L'étude non ciblée des métabolites réactifs peut se faire suivant deux modes d'acquisition : dépendante des données (DDA) et indépendante des données (DIA). En DDA, les ions les plus intenses sont sélectionnés par le Q1 et dirigés vers la cellule de collision pour être fragmentés, la masse des fragments est par la suite mesurée par l'analyseur de masse. Le risque, ici, serait de ne pas sélectionner un ion d'intérêt dont l'intensité serait trop faible. En DIA, une fenêtre étroite de masse de précurseurs est sélectionnée en Q1, tous les précurseurs de cette fenêtre seront fragmentés afin d'obtenir un spectre de fragmentation (spectre MS/MS) (Figure 1.9) (Allen et McWhinney, 2019).

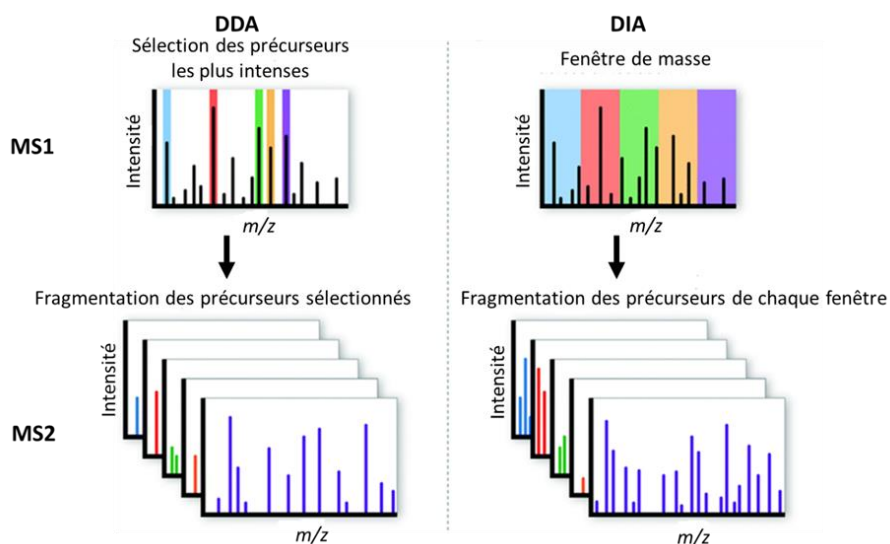


Figure 1.9 Schéma explicatif des deux modes d'acquisition DDA et DIA lors d'une analyse non ciblée en spectrométrie de masse en tandem.

Un grand nombre de données sont collectées lors d'une analyse non ciblée d'incubation *in vitro*. Le principal problème que l'on rencontre lors de leur traitement vient du fait que la majorité des métabolites et adduits formés sont inconnus. Il est alors important d'être en mesure d'étudier la structure et la fragmentation des précurseurs afin de les comparer aux adduits obtenus et ainsi pouvoir localiser les sites de biotransformations..

Lorsque le GSH est utilisé comme agent de piégeage, des fragments caractéristiques sont recherchés. Généralement, les adduits GSH subissent une perte neutre de 129 Da correspondant à la portion pyroglutamique du GSH lors d'une expérience par MS/MS en mode CID. Une méthode de balayage de perte neutre peut alors être effectuée pour rapidement détecter ces adduits (Yan *et al.*, 2007).

Toutefois, cette technique présente un problème, dépendamment de la structure du métabolite réactif, les adduits ne se fragmenteront pas de la même façon. De ce fait, en se limitant à la recherche de perte neutre, on pourrait induire des faux négatifs. De plus, cette méthode ne s'applique pas aux agents de piégeage ne possédant pas de perte neutre caractéristique. La matrice biologique peut également induire un certain nombre d'interférences conduisant à de faux positifs. Ce qui rend difficile l'identification précise des métabolites (Rousu *et al.*, 2009).

Chokkathukalamal *et al.* résume parfaitement les problèmes liés à l'étude de MR et mettent en avant l'utilisation du marquage isotopique pour valider et caractériser les nouveaux MR en facilitant l'interprétation des spectres MS/MS (Chokkathukalam *et al.*, 2014). Le marquage isotopique est employé depuis de nombreuses années afin d'étudier les voies métaboliques. De nos jours, les isotopes stables tels que le deutérium peuvent être utilisés en spectrométrie de masse à haute résolution. Il est possible de séparer de manière fiable les composés marqués grâce à leur différence de masse. Ainsi, la comparaison entre les spectres des MR marqués ou non par un isotope lourd permet de localiser plus facilement les sites de biotransformations. À titre d'exemple, le spectre

de masse présenté figure 1.10 montre la différence de masse précise que l'on peut mesurer entre l'estradiol et sa version marquée par le deutérium. Quatre hydrogènes sont remplacés par quatre deutériums donnant une différence de masse précise de 4.0251 Da (Chokkathukalam *et al.*, 2014).

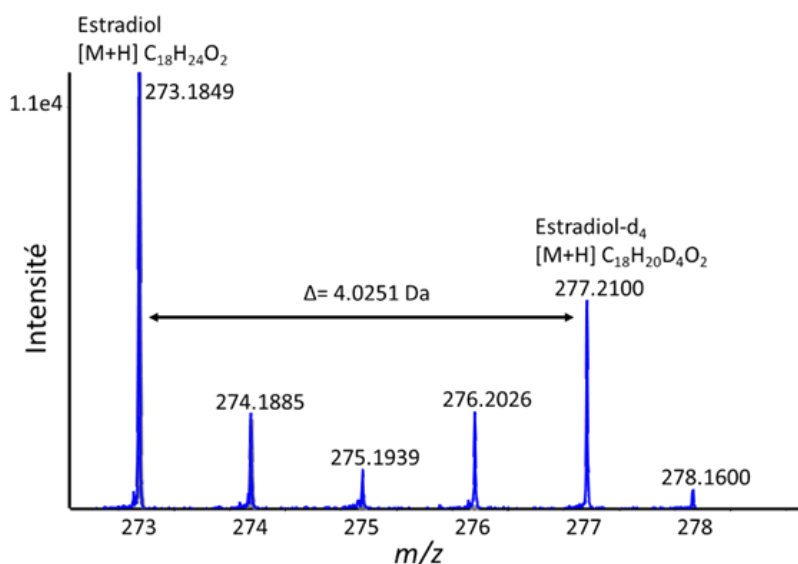


Figure 1.10 Exemple illustrant la différence de masse précise détectable par spectrométrie de masse entre une hormone (estradiol) et sa version marquée par un isotope stable (estradiol-d<sub>4</sub>).

Dans certains cas, l'étude structurale de la molécule mère peut également permettre de limiter les faux positifs. En effet, certaines molécules possèdent un patron isotopique particulier très reconnaissable. L'acide tiénilique, présenté plus haut, possède deux chlores qui lui confèrent un patron isotopique singulier, facilement identifiable en observant son spectre de masse (Figure 1.11). Dès lors, il devient possible d'éliminer un certain nombre de faux positifs en analysant les spectres MS des adduits formés après incubation.

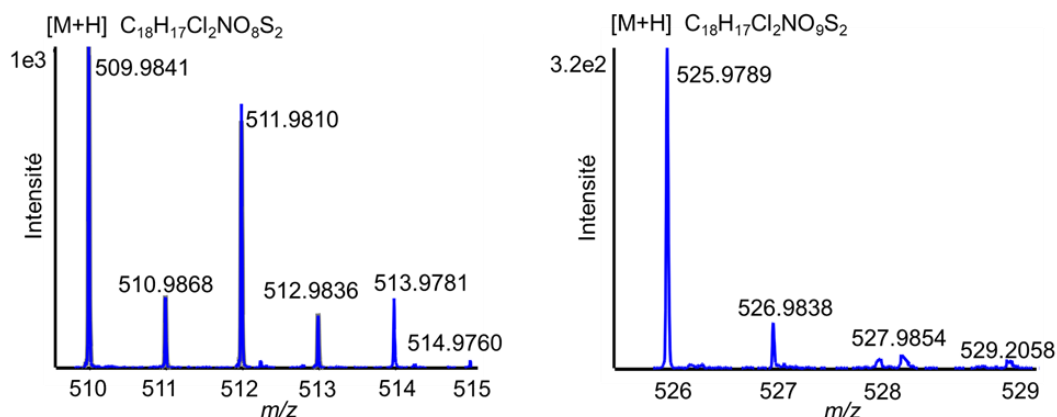


Figure 1.11 Comparaison entre deux spectres MS représentant un vrai (à gauche) et un faux (à droite) adduit NAC formé suite à l'incubation *in vitro* de l'acide tienilique.

### 1.5 Objectif de l'étude

Nous sommes quotidiennement exposés à diverses molécules capables de produire des métabolites réactifs toxiques lorsqu'elles sont métabolisées. Chaque année des médicaments sont retirés du marché, suite à la découverte d'une toxicité induite par des métabolites réactifs. De ce fait, il existe un besoin d'étudier le métabolisme de xénobiotiques, pour mieux comprendre notre potentiel d'exposition aux métabolites réactifs. Ces molécules électrophiles sont capables de réagir facilement avec les nucléophiles cellulaires, comme le glutathion (GSH) présent naturellement dans le corps humain et qui permet le piégeage des métabolites, par formation d'adduit (couplage entre le métabolite réactif et le GSH). Diverses techniques sont disponibles pour évaluer la formation de métabolites réactifs, incluant le piégeage *in vitro* par le glutathion et la caractérisation de ces adduits par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Dans le cadre de ce mémoire, l'objectif était de développer une approche analytique par LC-MS/MS afin d'identifier des métabolites réactifs et de tester l'utilisation de

différents agents de piégeages pour se faire. De plus, le marquage isotopique a été utilisé pour confirmer la présence de métabolites venant des estrogènes, ainsi d'une meilleure élucidation des structures de métabolites.

L'approche expérimentale employée repose sur l'incubation *in vitro* de diverses molécules susceptibles de produire des métabolites réactifs, en présence de microsomes hépatiques et des cofacteurs nécessaires au métabolisme oxydatif. Trois agents de piégeages ont été évalués pour la détection d'adduits stables, incluant le glutathion (GSH), le N-acétyl-lysine (NAL) et N-acétyl-cystéine (NAC).

Notre plateforme de spectrométrie de masse en tandem à haute résolution de type quadripôle-temps de vol (QqTOF, Sciex Triple TOF 5600+) a été utilisée pour l'analyse non ciblée des métabolites stables et réactifs. Notre première étude porte sur l'importance du marquage isotopique lors de l'identification des métabolites produits après l'incubation de trois analogues des estrogènes en présence de GSH et NAC (Chapitre 2). Une seconde étude reposera sur la détection de métabolites réactifs formés suite à l'incubation de l'acide tienilique en présence de trois agents de piégeages : GSH, NAC et NAL (Chapitre 3)

**CHAPITRE 2**

**ARTICLE SCIENTIFIQUE: ESTRADIOL, ESTRONE AND ETHINYL-  
ESTRADIOL METABOLISM STUDIED BY HIGH RESOLUTION LC-  
MS/MS USING STABLE ISOTOPE LABELING AND TRAPPING OF  
REACTIVE METABOLITES**

Kahina Chabi and Lekha Sleno

Article published in:

Metabolites 2022, 12, 931

Copyright: © 2022 by the authors.

ESTRADIOL, ESTRONE AND ETHINYL-ESTRADIOL METABOLISM  
STUDIED BY HIGH RESOLUTION LC-MS/MS USING STABLE ISOTOPE  
LABELING AND TRAPPING OF REACTIVE METABOLITES

Kahina Chabi and Lekha Sleno

Université du Québec à Montréal, Chemistry department, PO Box 8888 Downtown  
Station, Montréal, H3C 3P8, Canada, [sleno.lekha@uqam.ca](mailto:sleno.lekha@uqam.ca)

Kahina Chabi est l'auteure principale de cet article. Elle a effectué la recherche bibliographique, les manipulations au laboratoire, et la rédaction de l'article. Lekha Sleno est l'auteure de correspondance de cet article, elle a conçu et supervisé le projet en plus de réviser et finaliser le manuscrit.

## 2.1 Résumé

**Justification :** Les réactions de biotransformation que subissent les xénobiotiques au cours de leur métabolisme sont cruciales pour leur élimination de l'organisme, mais peuvent également être une source de toxicité, notamment en cas de formation de métabolites réactifs. Les métabolites réactifs instables sont capables de se lier de manière covalente aux protéines et ont souvent été associés à des lésions hépatiques et à d'autres effets secondaires indésirables. Une technique courante pour évaluer la formation de métabolites réactifs consiste à les piéger *in vitro* avec du glutathion et à caractériser les adduits qui en résultent par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Cependant, certains composés endogènes peuvent interférer avec les métabolites d'intérêt, rendant l'analyse plus difficile. Cette étude démontre l'utilité des composés marqués aux isotopes pour détecter et élucider les structures des métabolites stables et des adduits formés suite au métabolisme *in vitro* de trois analogues d'estrogènes.

**Méthode :** Trois analogues d'estrogènes, l'estradiol, l'estrone et l'éthinyl-estradiol, ont été étudiés pour la formation de métabolites réactifs. Ces trois molécules ainsi que leurs versions deutérées (d<sub>4</sub>) ont été incubées en présence de microsomes hépatiques humains ou de rat, en présence de deux agents de piégeage différents, à savoir le glutathion et le N-acétylcystéine. Les échantillons ont été séparés par chromatographie en phase inverse sur une colonne Aeris C18, suivi d'une analyse sur spectromètre de masse de type quadripôle temps de vol en mode non ciblé.

**Résultats :** Lors de cette étude le GSH et NAC se sont avérés être capable de piéger un grand nombre de métabolites réactifs. Les critères suivants ont été utilisés pour valider la liste des métabolites : 1) pic du métabolite absent des contrôles au temps zéro et de ceux incubés sans hormones, 2) précision de masse inférieure à 5 ppm, 3) différence entre les versions légères et marquées inférieure à 0,5 min. La détection de pics deutérés



étroitement élués nous a permis de confirmer la formation de plusieurs métabolites connus, ainsi que de nombreux métabolites non caractérisés auparavant.

Conclusion : La méthode analytique développée a permis la détection d'un grand nombre de métabolites encore inconnus. La structure de chaque produit d'addition a été élucidée par l'analyse détaillée des spectres MS/MS à haute résolution afin d'élucider les voies de fragmentation avec des mesures de masse précises. L'utilisation du marquage isotopique a été cruciale pour aider à confirmer la structure de nombreux métabolites et adduits, ainsi que pour éliminer les interférences endogènes.

## 2.2 Abstract

Rationale: The biotransformation reactions that xenobiotics undergo during metabolism are crucial for their elimination from the body, but can also be a source of toxicity, particularly in the case of the formation of reactive metabolites. Unstable and reactive metabolites are capable of covalent binding to proteins and have often been associated with liver damage and other adverse side effects. A common technique to assess the formation of reactive metabolites is to trap them in vitro with glutathione and characterize the resulting adducts by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). However, some endogenous compounds can interfere with the xenobiotic metabolites of interest, making analysis more difficult. This study demonstrates the utility of isotope-labeled compounds to detect and elucidate the structures of stable metabolites and trapped adducts of three estrogen analogues using non-targeted LC-MS/MS.

Method: Three estrogen analogues, estradiol, estrone and ethinyl estradiol, were studied for the formation of reactive metabolites. These three molecules as well as their deuterated versions (d4) were incubated in the presence of human or rat liver microsome. in the presence of two different scavengers, namely glutathione and N-acetylcysteine. Samples were separated by reverse phase chromatography on an Aeris

C18 column, followed by analysis on a quadrupole time-of-flight mass spectrometer in non-targeted mode.

Results: GSH and NAC were found to be capable of trapping a large number of reactive metabolites. The following criteria were used to validate the metabolite list: 1) metabolite peak absent from controls at time zero and from those incubated without hormones, 2) mass accuracy less than 5 ppm, 3) difference between light and labeled versions less than 0.5 min. The detection of closely eluted deuterated peaks allowed us to confirm the formation of several known metabolites, as well as many previously uncharacterized metabolites.

Conclusion: The developed analytical method allowed the detection of a large number of previously unknown metabolites. The structure of each adduct was elucidated by detailed analysis of high resolution MS/MS spectra to elucidate fragmentation pathways with accurate mass measurements. The use of isotope labeling was crucial to help confirm the structure of many metabolites and adducts, as well as to eliminate endogenous interferences.

### 2.3 Introduction

Estrogens are involved in many key biological processes in development, growth and sexual maturation in humans and animals. The two main estrogens found in humans are  $17\beta$ -estradiol (E2) and estrone (E1) (Denver *et al.*, 2019). In 1943, the FDA (U.S. Food and Drug Administration) authorized the use of a synthetic hormone  $17\alpha$ -ethinyl estradiol (EE2), a structural analog of E2, for specific therapies (Food et Administration, 2009); moreover, it has been the main active ingredient used in hormonal contraceptives since 1960 (Goldzieher, 1993). Although endogenous and synthetic estrogens have been shown to have benefits, including reduced risk of osteoporosis and coronary heart disease (Bolton et Shen, 1996), they have also been linked to potential toxicity for humans and the environment. Numerous studies have shown that estrogens

cause the development of many cancers in humans and animals (breast, endometrial, liver and kidney cancer) (Cavalieri et Rogan, 2017; Guengerich, 1988). Excreted estrogens in the environment are also a major concern, as they harm the development and behavior of many aquatic species (Avar *et al.*, 2016). Therefore, it is important to investigate the deleterious effects of estrogens and other related xenobiotics to which we may be exposed. *In vivo* and *in vitro* studies have shown that these different hormones undergo significant oxidative metabolism in humans and rats (Iverson *et al.*, 1996). This phenomenon is induced by cytochromes P450 (CYP) enzymes, dependent on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (Hayes *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2007). Endogenous and exogenous estrogens are known to metabolize into catechols, which can easily be oxidized to form reactive ortho-quinones (Zhu et Lee, 2005). Zhu *et al.* have developed a GC-MS method to identify several reactive metabolites formed via NADPH dependent oxidative metabolism of E1 and E2, in the presence of microsomal fractions of the human liver and placenta (Zhu et Lee, 2005). Many metabolites were detected, such as 4-OH-E2, 15 $\alpha$ -OH-E2, 16 $\alpha$ -OH-E1, 16 $\beta$ , 17 $\alpha$ -OH-E2 and 2-methoxy-E2, including in urine samples from pregnant and non-pregnant women, in addition to other well-known metabolites 2-OH-E1/E2, 2-methoxy-E1 and 16 $\alpha$ -OH-E2 (Zhu et Lee, 2005). Although there is little information on the oxidative metabolism of EE2, it has been reported that this hormone is highly oxidized by human cytochromes P450 forming mainly 2-OH-EE2 (Wang *et al.*, 2004). The 2-hydroxy derivatives can then be methylated (Wang *et al.*, 2004). If not properly eliminated, these polar metabolites could induce toxicity. Indeed, estrogen metabolites have been linked to increasing concentrations of reactive oxygen species (ROS) which, by binding to DNA, alter immune functions leading to autoimmune diseases (Ali Khan et Khan, 2016). In hamsters, mice and rats, it has been shown that catechols formed from E1 and E2 are responsible for DNA adduct formation by binding to adenine or guanine (Yager, 2015). The 16 $\alpha$ -OH-E1 has been linked to multiple diseases and is able to bind to proteins causing severe tissue damage. Via a “bottom-up” proteomics

approach using LC-ESI-HRMS/MS of tryptic peptides, numerous adduction sites of 16 $\alpha$ -OH-E1 to albumin have been identified (Charneira *et al.*, 2020). Mass spectrometry, coupled to either liquid or gas chromatography, is the most common method used in the identification of endogenous and exogenous metabolites in complex biological samples (Gouveia *et al.*, 2013). LC-MS with electrospray ionization (LC-ESI-MS) is the method of choice for metabolite analysis, with the advantage over GC-MS in that sample preparation and analysis is usually simpler and more universally applicable to biological samples. The development of these techniques has provided new tools for the study of sex steroids, providing new information on the synthesis of steroid hormones and their metabolic pathways (Gouveia *et al.*, 2013). As reactive metabolites are highly unstable, it is useful to trap them with small nucleophilic reagents forming stable adducts for analysis (Kalgutkar, 2017). Glutathione (GSH) is a common endogenous nucleophile used as a trapping reagent to study the formation of reactive metabolites. GSH acts as a detoxifying antioxidant *in vivo* by covalently binding to reactive metabolites, neutralizing their deleterious effects, and leading to their elimination (Inoue *et al.*, 2015; Kalgutkar, 2017). Other similar scavenging reagents have also been used, such as N-acetylcysteine (NAC) and cysteine (Cys) (Inoue *et al.*, 2015). Butterworth *et al.* have identified *in vitro* glutathione conjugates involved in the nephrotoxicity of estradiol, namely 2-hydroxy1-glutathione-S-yl-17 $\beta$ -estradiol, 2-hydroxy-4-glutathione-S-yl-17 $\beta$ -estradiol and 2-hydroxy-1,4-bis-glutathione-S-yl-17 $\beta$ -estradiol (Butterworth *et al.*, 1998). In metabolism studies, the presence of interferences from the biological matrix can make the identification of reactive metabolites complex, making it difficult to accurately identify metabolites in a large, complex set of data. Therefore, using isotope labeling is a good way to address these different problems. Chokkathukalamal *et al.* have expertly reviewed the difficulties encountered during the study of reactive metabolites and the importance of isotopic labeling to validate and characterize new metabolites by facilitating the interpretation of MS/MS fragmentation spectra (Chokkathukalam *et al.*, 2014). In this

study, the oxidative metabolism of E1, E2 and EE2 was evaluated using human and rat liver microsomal incubations, using isotope labeling for the confirmation of formed metabolites and supporting the elucidation of their structures. Liquid chromatography coupled with high-resolution tandem mass spectrometry (LC-HRMS/MS) was performed to characterize all detected adducts formed, using accurate mass measurements, isotope labeling and collision-induced dissociation (CID) fragmentation data. In addition, two trapping agents were used to study the formation of reactive metabolites: GSH and N-acetyl cysteine (NAC). NAC adducts of these compounds have not been investigated previously, and the comparison of results from GSH and NAC helps confirm formed adducts. The use of deuterated analogs helps to distinguish real metabolites from the background biological matrix which has numerous potential interferences, especially for hormone or steroid molecules, as well as helping in the structural elucidation of the detected metabolites and adducts of interest.

## 2.4 Materials and Methods

### 2.4.1 Materials

Three estrogen analogs:  $17\beta$ -Estradiol [E2,  $3,17\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratriene], Estrone [E1, 1,3,5 (10)-Estratrien-3-ol-17-one],  $17\alpha$ -Ethinyl-estradiol [EE2,  $17\alpha$ -Ethinyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17  $\beta$ -diol] were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Their deuterated ( $d_4$ ) versions:  $17\beta$ -Estradiol- $d_4$  [E2-  $d_4$ ,  $3,17\beta$ -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratriene-2,4,16,16-  $d_4$ ], Estrone-  $d_4$  [E1-  $d_4$ , 1,3,5 (10)-Estratrien-3-ol-17-one-2,4,16,16-  $d_4$ ],  $17\alpha$ -Ethinyl-estradiol-  $d_4$  [EE2-  $d_4$ ,  $17\alpha$ -Ethinyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17  $\beta$ -diol-2,4,16,16-  $d_4$ ] were purchased from CDN Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada). Human liver microsomes (HLM) was purchased from Bioreclamation IVT (Westbury, NY, USA). Rat liver microsomes (RLM) were purchased from Corning (Corning, NY, USA). Glutathione (GSH) and N-acetyl-L-

cysteine (NAC) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), as well as HPLC-grade acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), LC-MS-grade formic acid. Ultrapure water was from a Millipore Synergy UV system (Billerica, MA, USA).

#### 2.4.2 *In vitro* Incubations

The three estrogens analogs were incubated with their deuterated ( $d_4$ ) versions in a ratio of 1:1 as well as separately at 10  $\mu$ M, in the presence of human and rat liver microsomes with either GSH or NAC (2.5 mM), in a phosphate buffer at pH 7.4 (100 mM) containing NADPH-regenerating system (5 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM  $NADP^+$ , 10 mM glucose-6-phosphate and 2 units/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase). Both GSH and NAC were used in the human incubations, whereas GSH trapping was also studied in the rat samples. After 1 h at 37°C, adding an equal volume of cold acetonitrile quenched the reaction; samples were then centrifugated for 8 min at 14,000 rpm, at 4°C. The supernatants were dried under vacuum and reconstituted with 5% acetonitrile prior to LC-MS/MS analysis. Control samples were prepared without trapping agent or one of the analogs, as well as incubations quenched before adding the NADPH regeneration system. The NADPH regeneration system is added to incubations to continuously produce NADPH during the incubation time as a cofactor for oxidative metabolism.

#### 2.4.3 LC-HRMS/MS Analysis and Data Processing

Samples were analyzed on a Nexera UHPLC (Shimadzu) coupled to a quadrupole–time-of-flight (TripleTOF<sup>®</sup> 5600) mass spectrometer (Sciex, Concord, ON, Canada). Water and acetonitrile, containing 0.1% formic acid, were used for gradient elution on an Aeris PEPTIDE XB-C18 column (100 x 2.1 mm, 1.7 $\mu$ m) preceded by a SecurityGuard<sup>™</sup> ULTRA C18 cartridge (2.1 x 2 mm) (Phenomenex<sup>®</sup>, Torrance, CA, USA), at 0.30 mL/min with a column temperature of 40°C, and injection volume of 20

$\mu\text{L}$ . The HPLC gradient started at 5% B and was held for 1 min, increased linearly to 85% for 18 min, to 95% for 0.90 min.

TOF-MS acquisition was performed with 300 ms accumulation time, followed by collision-induced dissociation (CID) MS/MS (in high sensitivity mode) using data-dependent acquisition (top 5 ions, with dynamic background subtraction) (150 ms each), used in positive electrospray mode to acquire high-resolution MS/MS. Nitrogen was used as collision gas and collision energy was  $30 \pm 10$  V. Metabolite Pilot<sup>TM</sup> (Sciex) software was used to establish a list of potential metabolites, using a set of known biotransformations (oxidative reactions and GSH and NAC conjugates). Closely eluting isotope-labeled peaks were also searched, having from one to four deuterium labels in the final metabolite formula. Peakview/Masterview<sup>TM</sup> (Sciex) software was then used for processing LC-MS/MS data, to validate the presence of all these metabolites. The fragment ions were proposed by rationally looking at parent compound spectra, high-resolution MS/MS spectra and proposed fragmentation from the literature. From the accurate mass MS/MS data, the molecular formula of fragment ions was determined, considering the starting formula of the precursor ion.

## 2.5 Results

The metabolism of three estrogen analogs and their deuterated versions (Figure 2.1) was studied by LC-HRMS/MS to study the formation of oxidative metabolites *in vitro*. Two analogous soft nucleophiles, GSH and NAC were used as trapping agents to detect unstable electrophilic species, by forming corresponding stable adducts via nucleophilic attack of their free thiol groups. The high-resolution LC-MS profiles for each incubation type was compared to control samples to confirm the formation of metabolites and adducts.

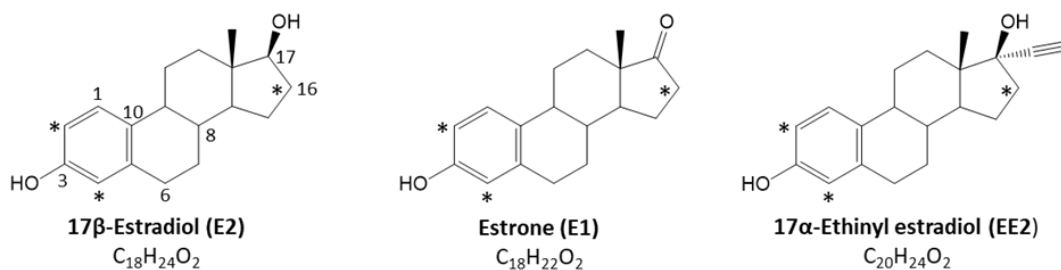


Figure 2.1 Chemical structures of the three estrogen analogs used in this study. Deuterated positions (2,4,16) are noted with \* for d<sub>4</sub>-isotope-labelled standards used.

Electrospray ionization mass spectra of E2 and EE2 (Figure 2.2) revealed that both hormones readily lose a water molecule in the electrospray source at carbon 17, with the dehydrated molecule becoming the predominant ion detected. This in-source fragmentation does not occur in the case of E1 where a carbonyl group is present at C-17. The protonated ions of E2 (-H<sub>2</sub>O) (C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>O<sup>+</sup>) and EE2 (-H<sub>2</sub>O) (C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sup>+</sup>) were detected at retention times 10.6 and 11.2 min, respectively, under our chromatographic conditions. Protonated E1 (C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>) was detected at a retention time of 11.4 min. The fragmentation spectra from collision-induced dissociation indicates that all three hormones undergo similar fragmentation patterns. B, C and D rings cleave sequentially revealing characteristic fragment ions at *m/z* 133, 145, 159, 173 and 185 (Figure 2.3).

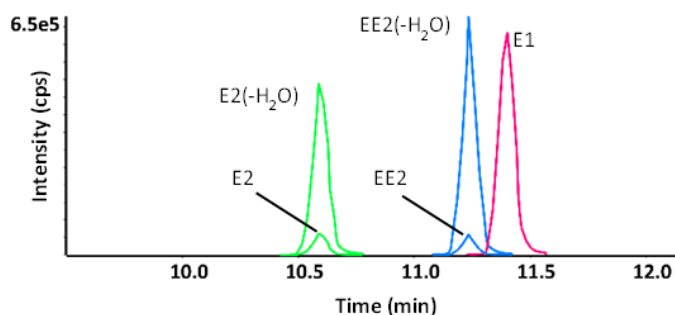


Figure 2.2 Extracted ion chromatograms for protonated E1, E2 and EE2 from control incubations (at 10 μM). Both E2 and EE2 exhibit a facile water loss in the electrospray source.



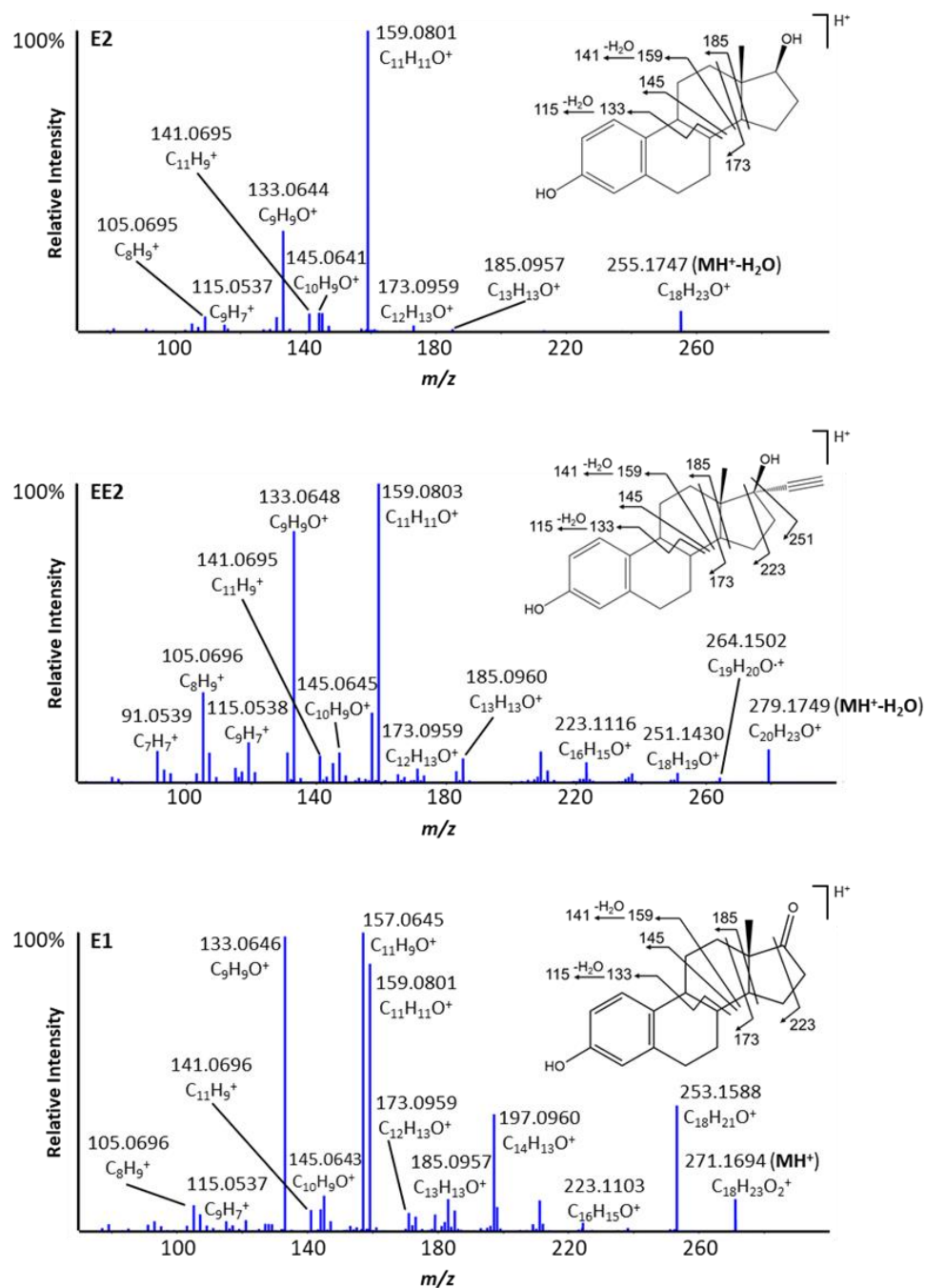


Figure 2.3 High-resolution MS/MS spectra of protonated ions of E2-H<sub>2</sub>O, EE2-H<sub>2</sub>O and E1 with annotated fragment ions, including mass accuracies (ppm).

### 2.5.1 Oxidative metabolites

E2, E1 and EE2 undergo extensive metabolism in humans and animals. Numerous hydroxylated or ketone metabolites have been found, the formation of which is catalyzed by cytochromes P450. Hydroxylated metabolites detected in HLM are presented in Figure 2.4. Hydroxylation is known to occur at the 2- or 4- position of the A-ring, leading to the formation of catechol estrogens. Hydroxylated E2 and EE2 undergo insource water loss as for the parent compounds. Two peaks at 7.3 and 9.5 min, correspond to hydroxylated E2 metabolites (E2+O). In both cases, the fragment ion corresponding to  $C_{11}H_{11}O^+$  for E2 at  $m/z$  159.080 is shifted to  $m/z$  175.075 (Table 2.2), indicating that either A or B ring may be involved. However, analysis of the deuterated version of the two isomers indicates the loss of one deuterium (Table 2.1), meaning the A ring is hydroxylated (at position 2 or 4) involved in both metabolites, forming 2-OH-E2 and 4-OH-E2. E2 can also form E1, therefore many metabolites found in E1 incubations were also observed in E2 incubations corresponding to E2+O-2H (Figure 2.4) and E2+2O-2H (Figure 2.8).

In the case of estrone, the two hydroxylated peaks (at 8 and 10 min, Figure 2.4) correspond to 2-OH-E1 and 4-OH-E1. Analysis of deuterated estrone incubations indicates the exchange of a deuterium in each case. A third hydroxylated metabolite corresponding to E1+O at 8.7 min (Figure 2.4) shows a fragmentation identical to E1. The fragment ion corresponding to  $C_{16}H_{17}O^+$   $m/z$  225.127 is unchanged (Table 2.2), indicating that oxidation does not occur on A, B or C rings. In the deuterated metabolite, one label has been exchanged (Table 2.1), indicating that oxidation has occurred at carbon 16 of the D ring, forming 16-OH-E1.

As for EE2, the hydroxylated metabolite peak of highest intensity (at 10.1 min) corresponds to 2-OH-EE2 or 4-OH-EE2, with similar MS/MS behavior as mentioned above. At present, the literature only reports 2-OH-EE2 as the main metabolite formed

by EE2 (Wan et O'Brien, 2014). A smaller EE2+O metabolite peak (at 8.2 min) yields fragmentation similar to EE2 (Table 2.2) and suggests that metabolism is occurring on the D ring, however, analysis of the labeled version indicates that no deuterium is exchanged. Together with the fact that the fragment ion corresponding to  $C_{18}H_{19}O^+$  in the parent is found unchanged in the MS/MS spectrum of the metabolite (at  $m/z$  251.1431, Table 2.2), the oxidation occurs on the ethynyl group. Interestingly, this new metabolite has never been reported in the literature.

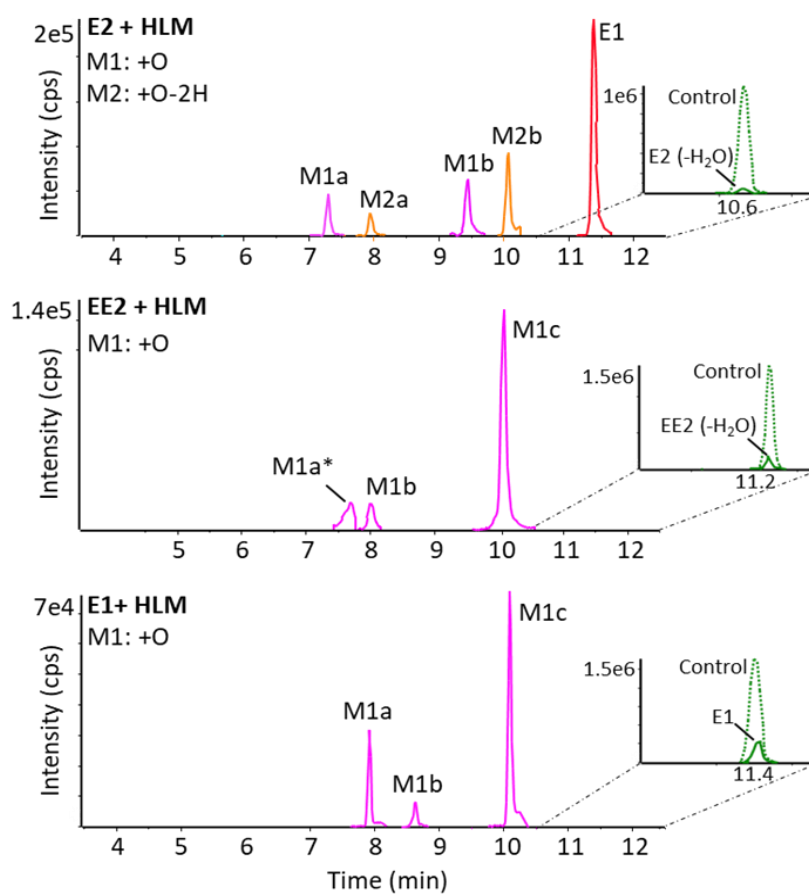


Figure 2.4 High-resolution extraction ion chromatograms of oxidative metabolites formed from E2, EE2 and E1 in human liver microsomal incubations. Some peaks (\*) were increased by 5× for clarity.

Table 2.1 Summary of metabolites and adducts characterized for E1, E2 and EE2 in human and rat liver microsomes.

<b>Biotransformation</b>	<b>Formula</b>	<b>RT (min)</b>	<b><i>m/z</i> (ppm)</b>	<b><math>\Delta m(d_4)</math></b>
<b>Estrone</b>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	11.4	271.1689 (-1.4)	4
+O	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	8.0	287.1641(-0.3)	3
		8.7	287.1642 (-0.6)	3
		10	287.164 (-0.6)	3
+2O	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	4.8*	303.1584 (-2.1)	2
		7.4*	303.1583 (-2.7)	2
+O-2H+GSH	C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S	7.25	592.2309 (-2.4)	3
		7.4	592.2307 (-2.8)	2
		7.6	592.2311 (-2.1)	2
+2O-2H+GSH	C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	6*	608.2278 (0.9)	1
		6.4*	608.228 (1.2)	2
+O-4H+2GSH	C <sub>38</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub>	5.3*	449.155 <sup>+2</sup> (2.4)	2
		5.5	449.1542 <sup>+2</sup> (0.8)	2
		6.2	449.154 <sup>+2</sup> (0.3)	2
+2O-4H+2GSH	C <sub>38</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>2</sub>	5.6*	457.152 <sup>+2</sup> (1.1)	1
+O-2H+NAC	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>6</sub> S	8.7	448.1791 (0.5)	3
		9.1	448.1789 (0.2)	2
		9.3	448.1786 (-0.6)	2
+O-4H+2NAC	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	7.4	609.193 (-0.8)	2
		8.1	609.193 (-0.9)	2
<b><math>\beta</math>-Estradiol</b>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	10.7	273.185 (0.5)	4
$\beta$ -Estradiol	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O	10.7	255.1746 <sup>a</sup> (0.9)	4
-2H (E1)	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	11.4	271.1694 (0.4)	4

+O	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7.3	271.1693 <sup>a</sup> (0.5)	3
		9.5	271.1693 <sup>a</sup> (0.3)	3
+O-2H	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	8	287.1644 (0.7)	3
		10	287.1644 (0.6)	3
+2O-2H	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	4.8*	303.1601 (3.3)	2
		7.4*	303.1591 (0.7)	2
+2O	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	6.5*	287.1647 <sup>a</sup> (1.7)	2
+O-2H+GSH	C <sub>28</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S	6.8	594.2486 (1.0)	3
		7.15	594.2488 (1.4)	2
+2O-2H+GSH	C <sub>28</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	5.6*	610.2426 (-0.5)	1
		5.9*	610.2435 (1.0)	2
+O-4H+2GSH	C <sub>38</sub> H <sub>54</sub> N <sub>6</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub>	5.2	450.1626 <sup>+2</sup> (2.0)	2
		5.75	450.1637 <sup>+2</sup> (2.3)	2
+2O-4H+2GSH	C <sub>38</sub> H <sub>54</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>2</sub>	5.1*	458.1608 <sup>+2</sup> (1.3)	1
		5.4	458.1608 <sup>+2</sup> (1.5)	2
+O-2H+NAC	C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>6</sub> S	8.0	450.1951 (1.4)	3
		8.6	450.1951 (1.3)	2
		8.8	450.1941 (-0.9)	2
+O-4H+2NAC	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	6.8	611.2106 (2.3)	2
		7.4	611.2092 (0.1)	2
<b>Ethinyl-estradiol</b>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	11.2	297.1847 (-0.7)	4
<b>EE2(-H<sub>2</sub>O)</b>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O	11.2	279.1744 (0.2)	4
+O	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7.8	295.1698 <sup>a</sup> (1.7)	4
		8.2	295.1695 <sup>a</sup> (0.9)	4
		10.1	295.1695 <sup>a</sup> (0.8)	3
+2O	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	6.7*	311.1644 <sup>a</sup> (0.6)	3
		7.2*	311.1645 <sup>a</sup> (1.1)	3

+O-2H+GSH	C <sub>30</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S	7.2	618.2492 (1.9)	3
		7.5	618.2477 (-0.4)	2
		7.7	618.2478 (-0.2)	2
+2O-2H+GSH	C <sub>30</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	6.15	634.2418 (-1.7)	2/1
		6.3*	634.2421 (-1.2)	2
		6.5*	634.2423 (-0.9)	3
		6.7	634.2423 (-1.0)	3
+O-4H+2GSH	C <sub>40</sub> H <sub>54</sub> N <sub>6</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub>	5.1*	462.1624 <sup>+2</sup> (1.5)	2
		5.5	462.162 <sup>+2</sup> (0.7)	2
		6	462.1622 <sup>+2</sup> (1.2)	2
+O-2H+NAC	C <sub>25</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>6</sub> S	8.55	474.1940 (-1.0)	3
		9.05	474.1947 (0.3)	2
		9.3	474.1945 (0.0)	2
+2O-2H+NAC	C <sub>25</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>7</sub> S	8.3	490.1885 (-1.9)	2
+O-4H+2NAC	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	7.3	635.2085 (-1.1)	2
		7.9	635.2086 (-0.9)	2

\* Only detected in RLM incubations, <sup>a</sup> *m/z* indicates insource fragment from water loss, <sup>b</sup> metabolites and adducts reported for the first time.

When substituting human for rat liver microsomes, similar results were observed (Figure 2.8). However, some metabolites were uniquely observed in rat samples, for example dihydroxylated metabolites. For estrone, two peaks corresponding to E1+2O were observed at 4.8 and 7.4 min, with MS/MS fragmentation suggesting that oxidation has occurred on both the A and D ring. The fragment ions at *m/z* 133.065 and *m/z* 171.080, respectively, shifted to *m/z* 149.059 and *m/z* 187.075 (Table 2.2) indicating that the one oxidation occurs on the A ring. This proposed structure is also supported by deuterated metabolites, showing an exchange of two labels (Table 2.1). The ion

fragments at  $m/z$  149.059 and  $m/z$  187.075 were shifted to  $m/z$  150.066 and  $m/z$  188.079, indicating that one deuterium was displaced during the oxidation of ring A, at either position 2 or 4, with the second hydroxylation occurring at position 16. The same structure was observed for E2+2O, exhibiting an in-source water loss at 6.7 min. The data for EE2+2O (-H<sub>2</sub>O) (Figure 2.8) indicates that the first oxidation occurs at the A-ring for the two metabolites at 6.7 and 7.2 min. In fact, the ion fragment C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>O<sup>+</sup> at  $m/z$  159.080 shifted to C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> at  $m/z$  175.075 (Table 2.2), and these same peaks are shifted to  $m/z$  176.081, meaning that a deuterium was exchanged at the A ring; however, the second oxidation would affect the D ring without deuterium exchange. E2 undergoes a double hydroxylation (Figure 2.8); analysis of the MS/MS spectrum of the metabolite at 6.5 min indicates that the first hydroxylation is located at ring A, the fragment ion  $m/z$  133.064 is displaced to  $m/z$  149.060 (Table 2.2), while analysis of the deuterated version reveals that two deuterium atoms are exchanged (Table 2.1). The first deuterium exchanged would be located on ring A, as the fragment ion  $m/z$  149.060 is displaced to  $m/z$  150.066, indicating that only one deuterium is displaced on ring A, which implies that the second oxidation is located on the D ring, displacing a deuterium in position 16. The proposed structures for each of the major oxidative metabolites formed during with HLM and RLM are shown in Figure 2.5. As estrone and estradiol undergo the same metabolic pathways, only the structures of the metabolites obtained from estrone are shown to simplify the figure.

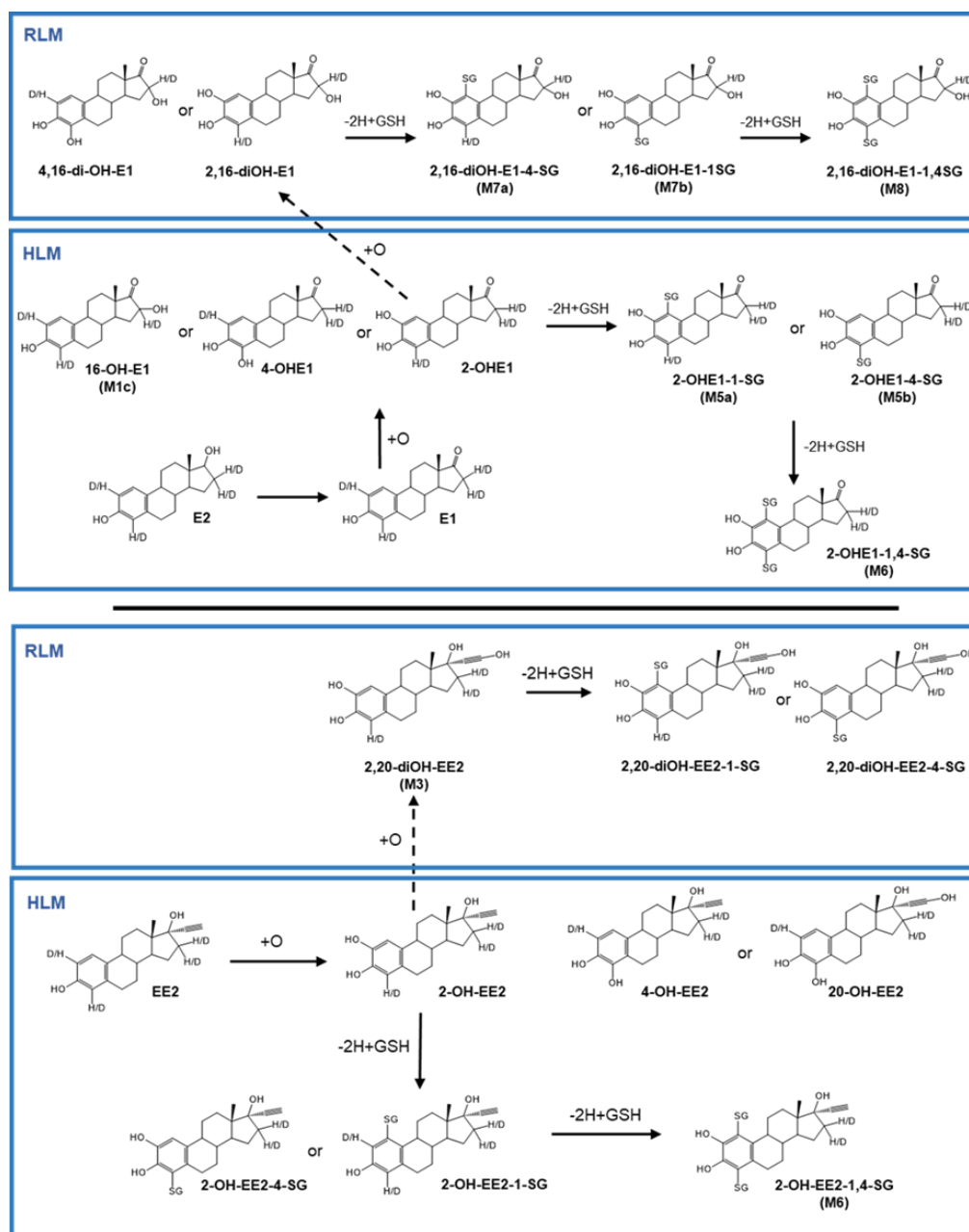


Figure 2.5 Proposed biotransformation reactions of unlabeled and deuterated E1, E2 and EE2 detected in human and rat microsomal incubations. As estrone and estradiol undergo similar metabolic profiles, only the structures from estrone are proposed to simplify the figure; the adduct formed with GSH can be formed with NAC. Peaks are annotated if structures could be determined for specific retention times.



### 2.5.2 Reactive metabolites

Xenobiotics can be metabolized into stable oxidized metabolites to allow their elimination from the body. However, some can also form reactive metabolites, which are unstable electrophiles with the potential to alter endogenous macromolecules, such as proteins and DNA, inducing hepatotoxicity and genotoxicity (Liu *et al.*, 2020). This is one of the many routes by which drugs can exhibit toxicity. Due to their instability, direct detection and structural characterization of reactive metabolites are inherently difficult. They are classified as either soft or hard reactive metabolites, based on their polarizability. Soft reactive metabolites include electrophilic metabolites such as quinones, imine quinones and epoxides (Klopčič et Dolenc, 2019). These metabolites react readily with the sulfhydryl group of cysteine or glutathione. By contrast, hard reactive metabolites, such as aldehydes, preferentially react with the amine groups, such as lysine, arginine, and nucleic acids (Kalgutkar, 2017). A commonly used approach for assessing the formation of reactive metabolites is to trap them with a nucleophilic compound, resulting in stable adducts, which can then be characterized.

#### 2.5.2.1 GSH and NAC adducts

Glutathione (GSH) is commonly used as a scavenging molecule in microsomal incubations to trap soft reactive electrophilic metabolites, similarly to how it scavenges reactive oxygen species in the body as a defence mechanism against oxidative stress. N-acetylcysteine is also used as a soft reactive metabolite scavenger, with the same free thiol group as GSH, and comparing results from both trapping agents helps confirm the results. When E1, E2 and EE2 were incubated under oxidative conditions in the presence of GSH or NAC, several analogous single or double adducts were detected, as shown in Figure 2.6. NAC adducts showed increased retention on the chromatographic column. For instance, the intense peak corresponding to E2+O-2H+GSH at 7.2 min (Figure 2.6) and an analogous signal for E2+O-2H+NAC at 8.8

min (Figure 2.9). This difference could allow the detection of adducts of more polar reactive metabolites for NAC compared to GSH. In addition, NAC trapping allowed the detection of an additional isomer of +O-2H+NAC in E2, most likely from the ability to separate these two isomers of NAC adducts, with the two GSH adducts likely coeluting (Figure 2.9).

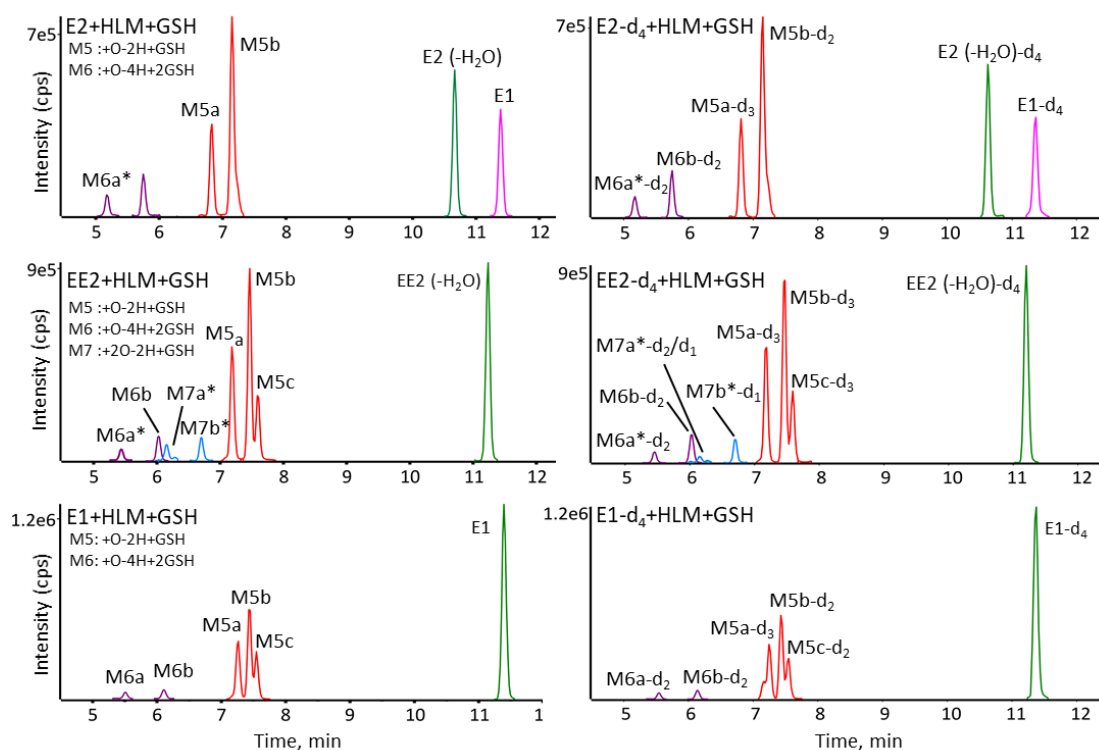


Figure 2.6 Extracted ion chromatograms of E2, EE2 and E1 metabolites and adducts trapped by GSH, for their non-labeled (left) and deuterated versions (right). Some peaks (\*) were increased by 5× for clarity.

### 2.5.2.2 Deuterated versions of trapped adducts

To help confirm the specific sites involved in the metabolism of these compounds, deuterated versions of each were incubated under the same conditions. As can be seen in Figure 2.6, labeled compounds exhibit the same retention and with similar intensities as their non-deuterated versions (Figure 2.6). For example, the two GSH adducts of E2 (at 6.8 and 7.2 min, with an  $m/z$  of 594.248, Figure 2.7) can be confirmed using the deuterated versions. The MS/MS spectra of these isomers are dominated by the characteristic fragment ions of GSH, generally observed in positive ion mode at  $m/z$  233 and 179 via neutral losses of glycine 75 D and pyroglutamic acid 129 Da, respectively (Xie *et al.*, 2013). For the 6.8 min isomer, E2-d<sub>4</sub> exchanges one deuterium (Figure 2.7) upon oxidation to form an ortho-quinone in position 2. GSH is then added at position 1 as shown in the proposed structure. The isomer at 7.2 min exchanges two labels, indicating a loss of deuterium in position 1, forming the ortho-quinone, and the addition of GSH in position 4. Another interesting peak appears at 6 min, corresponding to +O-4H+2GSH, with the loss of two labels (Table 2.1), implying that a second oxidation occurs at position 2 forming the ortho-quinone and that two GSH molecules are placed in positions 1 and 4. In RLM incubations (Figure 2.10), two previously unreported adducts were detected involving double hydroxylation and addition of one or two GSH molecules, forming E+2O-2H+GSH and E+2O-4H+2GSH. When incubated with HLM, only EE2 produced the double hydroxylated adduct EE2+2O-2H+GSH. The MS/MS spectra of these different metabolites are dominated by specific fragments of the trapping agent in contrast to the parent hormones. It is therefore difficult to locate the adduction or hydroxylation sites. However, analysis of the deuterated analogs provides more information (Table 2.1). For EE2, for example, a peak is observed (Figure 2.6) corresponding to EE2+2O-2H+GSH at 6.2 min with an  $m/z$  634.242 (Table 2.1). The deuterated version of this adduct shows an exchange of two labels at  $m/z$  636.253, which suggests that the double hydroxylation and adduction

occurred on ring A. A first hydroxylation in position 2 could have led to the formation of ortho-quinone trapped by GSH in position 4, the second hydroxylation would then have occurred in position 1 or another ring without inducing deuterium exchange. When incubated with RLM, E2 can form E2+2O-4H+2GSH at  $m/z$  458.160, implying double hydroxylation and double adduction. Analysis of the MS/MS spectrum of the deuterated version indicates an exchange of three labels yielding a precursor ion with  $m/z$  458.662 at 5.1 min (Table 2.1). This could be explained by a first hydroxylation at position 2 forming the orthoquinone where then GSH attacks at position 4, followed by a subsequent reformation of *o*-quinone and a second GSH added at position 1. The second hydroxylation site is at position 16, displacing a deuterium.

When the three analogs and their deuterated versions were incubated in the presence of NAC (Figure 2.9), similar results to those obtained with GSH were observed. NAC and GSH should form very similar adducts, and the deuterated versions of these adducts confirm this, as the same number of labels are displaced for each adduct formed. For example, the E2+O-2H+NAC isomers at 8.0 and 8.6 min (Figure 2.2) have similar structures as their GSH analogs. Although the MS/MS spectra of the NAC adducts are dominated by the fragmentation of the scavenger (as for GSH), it was possible to demonstrate that the hydroxylation and adduction of NAC are localized on the A ring. Indeed, the two isomers both form a fragment at  $m/z$  173.059 (Table 2.2), corresponding to C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>. This indicates that the hydroxylation could be located on the A or B ring (Figure 2.3). Studying the labeled compounds and their metabolites allows a more precise determination of the hydroxylation and adduction sites. In the case of E2, the use of NAC allowed the identification of a third E2+O-2H+NAC isomer at 8.8 min, whose GSH analog could not be separated chromatographically. Analysis of the deuterated versions indicates that two labels are lost for two adducts and only one is lost in the case of one adduct. Therefore, hydroxylation occurs at position 2 with NAC addition at position 4, or vice versa, for the two possible isomers losing two labels.

In the case of E2, the use of NAC allowed the identification of a third E2+O-2H+NAC isomer at 8.8 min, whose analog with GSH could not be separated chromatographically. Analysis of the deuterated versions indicates that two labels are lost for two adducts and only one lost in the case of one adduct. Therefore, hydroxylation occurs at position 2 with NAC addition at position 4 or vice versa, for the two possible isomers losing two labels.

## 2.6 Discussion

### 2.6.1 Oxidative metabolism

The endogenous estrogens E2 and E1, as well as the synthetic derivative EE2, are known to be highly metabolized in human and various animal models. The resulting metabolites can play a key role in developmental processes but can also exhibit negative side effects. High-resolution tandem mass spectrometry was used to detect and characterize the reactive metabolites capable of forming GSH and NAC adducts *in vitro*. In addition, an isotope-labeled version for each analog was used to facilitate the structural elucidation of metabolites and adducts. Suchar *et al.* demonstrated that incubation of radiolabeled E2 in the presence of rat and mouse liver microsomes produced 15 metabolites (Butterworth *et al.*, 1998; Zhu et Lee, 2005). Lee *et al.* used HPLC-UV and radioactivity to characterize the NADPH-dependent metabolism profile of E2 and E1 in human liver microsomes, with many hydroxylated or ketone metabolites being identified (Lee *et al.*, 2003). Estrone and estradiol are rapidly interconverted in the body by the enzymes 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2, catalyzing the reduction or oxidation of the ketone or hydroxyl found at position 17 (Hilborn *et al.*, 2017).

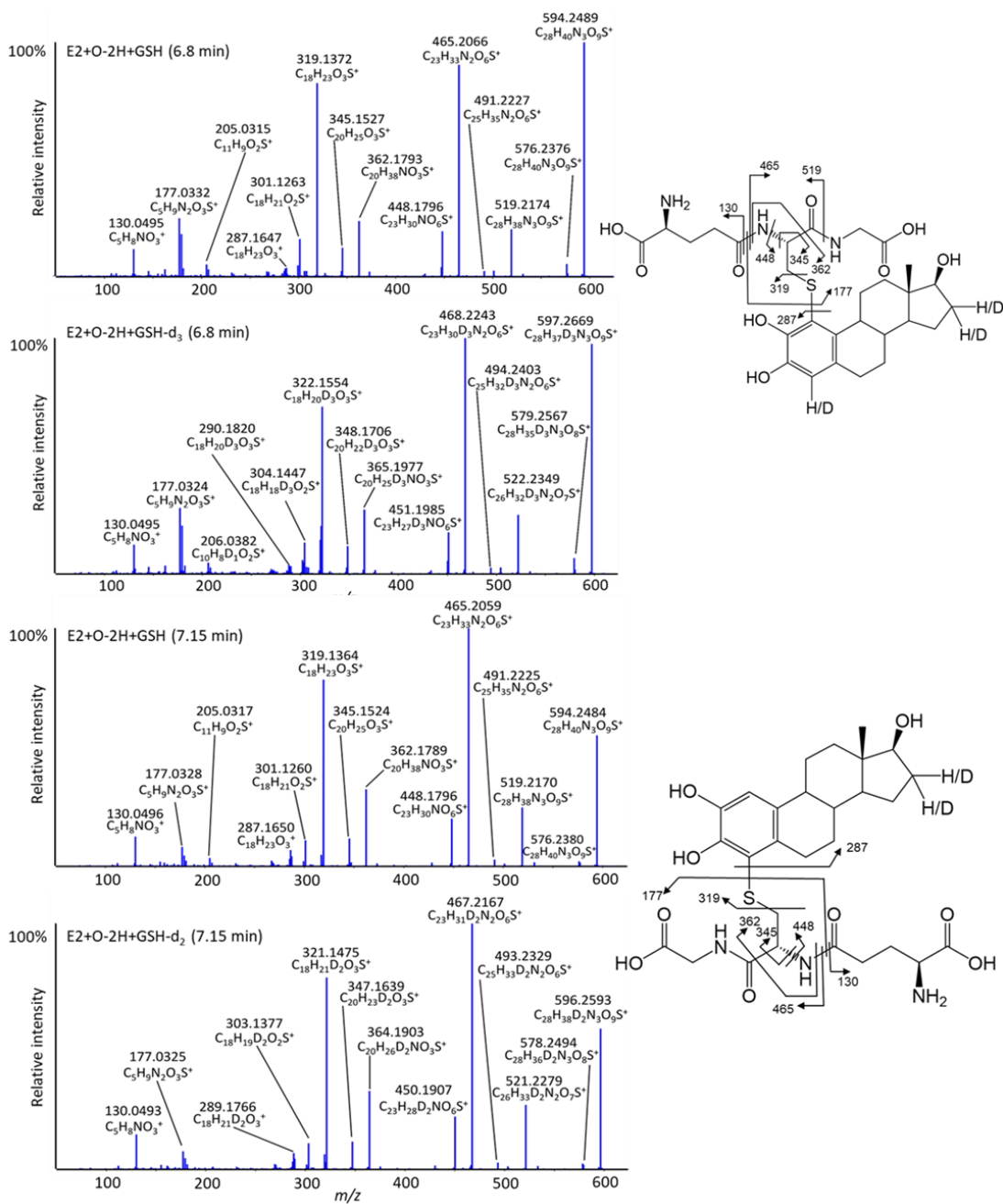


Figure 2.7 High-resolution MS/MS spectra of isomeric E2+O-2H+GSH adducts in their unlabeled and labeled forms, all fragment ions assigned were under 5 ppm.

The main metabolite formed by these two hormones is 2-hydroxy estrogen (2-OHE) followed by 4-hydroxy estrogen (4-OHE), forming catechol estrogens corresponding to the oxidative metabolites detected for each analog (Figure 2.4). However, 4-OH-E2 and 16-OH-E1 have been shown to exhibit high genotoxicity (Samavat et Kurzer, 2015), and 4-OH-E2 is considered the main metabolite involved in estrogen-dependent cancers. It has been shown that 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol is associated with an increased risk of developing breast, uterine and liver cancer. Wan *et al.* have shown the molecular mechanisms of liver damage involve the oxidation of EE2. EE2 undergoes the same P450 isoform-induced metabolism as its analogs (Table 2.1). It has been shown that 2-OH-EE2 is the main oxidative metabolite. However, in our study, we were able to identify a new oxidation site for EE2, in the ethynyl group. It is suggested that EE2, unlike E2 and E1, is less likely to undergo oxidation at the C16 position due to steric hindrance, and the isotopically labeled experiment confirms this. The oxidation occurs instead at the more accessible C20.

### 2.6.2 GSH and NAC adducts

Similar reactive metabolites were seen to be scavenged by GSH and NAC, in the presence of HLM and RLM. Previous studies have shown that oxidation of estrogens by P450 isoforms results in the formation of catechol estrogens, which can subsequently generate reactive ortho-quinones and be trapped by GSH. The ortho-quinone 2-OHE1/E2/EE2 is thought to be more reactive than the 4-OHE1/E2/EE2 and more likely to bind GSH and NAC, forming trapped species +O-2H+GSH (Figure 2.6) and +O-2H+NAC (Figure 2.9). It has been shown that quinones formed by the oxidation of estrogenic catechol undergo redox cycling, allowing them to react with cellular nucleophiles, such as DNA, protein and endogenous glutathione. The binding of GSH to quinones allows their elimination, thus acting as a protective mechanism. However, the binding of quinones to hepatic GSH appears to lead to the formation of

quinone thioethers which are structurally like M4 (+O-2H+GSH), and these have potent nephrotoxic properties. Butterworth *et al.* demonstrated that E2 catechol estrogens cause acute nephrotoxicity in hamsters by inhibiting  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (an enzyme involved in amino acid metabolism), the substrate for quinone thioethers (Butterworth *et al.*, 1998). In the presence of RLM, two additional adducts were detected, with double hydroxylation and double adduction. In a previous study, Iverson *et al.* investigated the factors influencing the rate of P450-catalysed formation of *o*-quinones from 2-OH-E1 and 4-OH-E1 and estrone in rat liver microsomes (Iverson *et al.*, 1996). GSH was used to trap the quinones and they were separated and characterized by HPLC-MS. As indicated by our results, mono-GSH conjugates were observed to be formed from 2-OH-E1-*o*-quinone corresponding. The 2-OH-E1-*o*-quinone appears to also form a di-GSH conjugate corresponding to E1+O-4H+2GSH. *o*-quinones are also responsible for the induction of oxidative DNA damage by estrogen catechol; by alkylating DNA and thus inducing irreversible damage, 4-OH-E1-*o*-quinone modifies adenine at the C8 position on the purine ring under reducing conditions (Lippert *et al.*, 2003). In hamsters, 4-OH-E2 was shown to be responsible for the development of kidney tumors, by reacting with DNA to form a depurative adduct (leaving apurinic sites on the DNA) (Todorovic, 2001).

## 2.7 Conclusions

Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry was used to detect and characterize the oxidative metabolites of three estrogen analogs (E2, E1 and EE2). Two different trapping agents were employed to trap soft electrophiles formed following oxidation of parent compounds as stable adducts. Detailed MS/MS fragmentation pathways, aided by isotope labeling, were used to elucidate the structure of metabolites. Deuterated compounds are specifically interesting to use in the context of metabolism studies since labels can be lost during metabolism. The sites of



deuterium labeling were specifically helpful in pinpointing sites of metabolism and confirming resulting structures. Combining unlabeled and labeled compounds with high-resolution mass spectrometry data is beneficial to confirming which compounds are metabolites of the studied parent compounds, in complex biological samples with many endogenous metabolites having similar chemical formulae. This approach could be used to support studies to identify the metabolites of other estrogen analogs or similar xenobiotics. Many new metabolites and adducts were found for the first time, including those involving di-hydroxylation, as well as NAC adducts. The biological relevance of the formation of these metabolites would necessitate further *in vivo* studies.

## 2.8 Supplemental Material

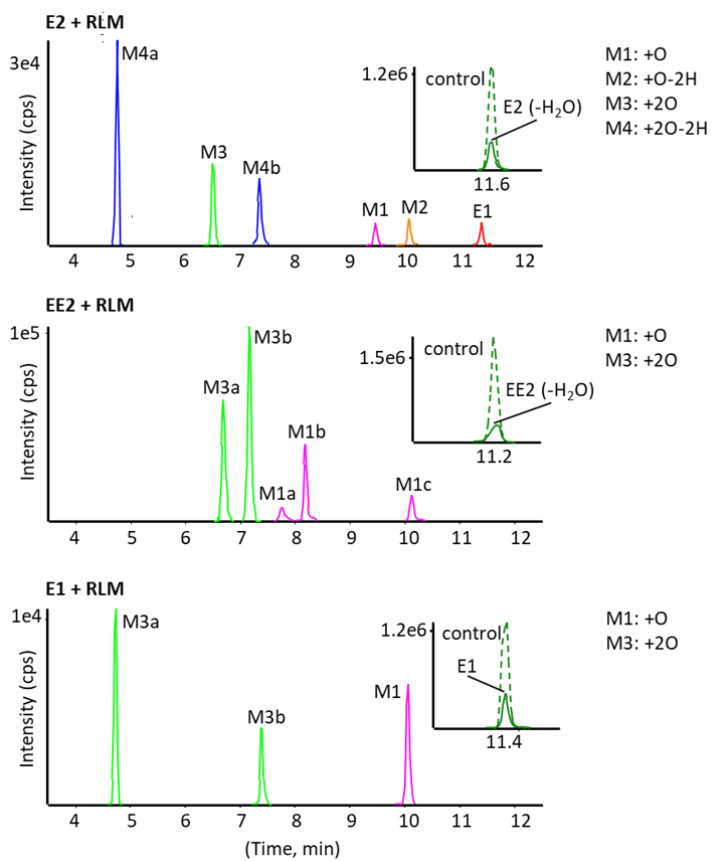


Figure 2.8 High-resolution extraction ion chromatograms of oxidative metabolites formed from E2, EE2 and E1 in rat liver microsomal incubations.

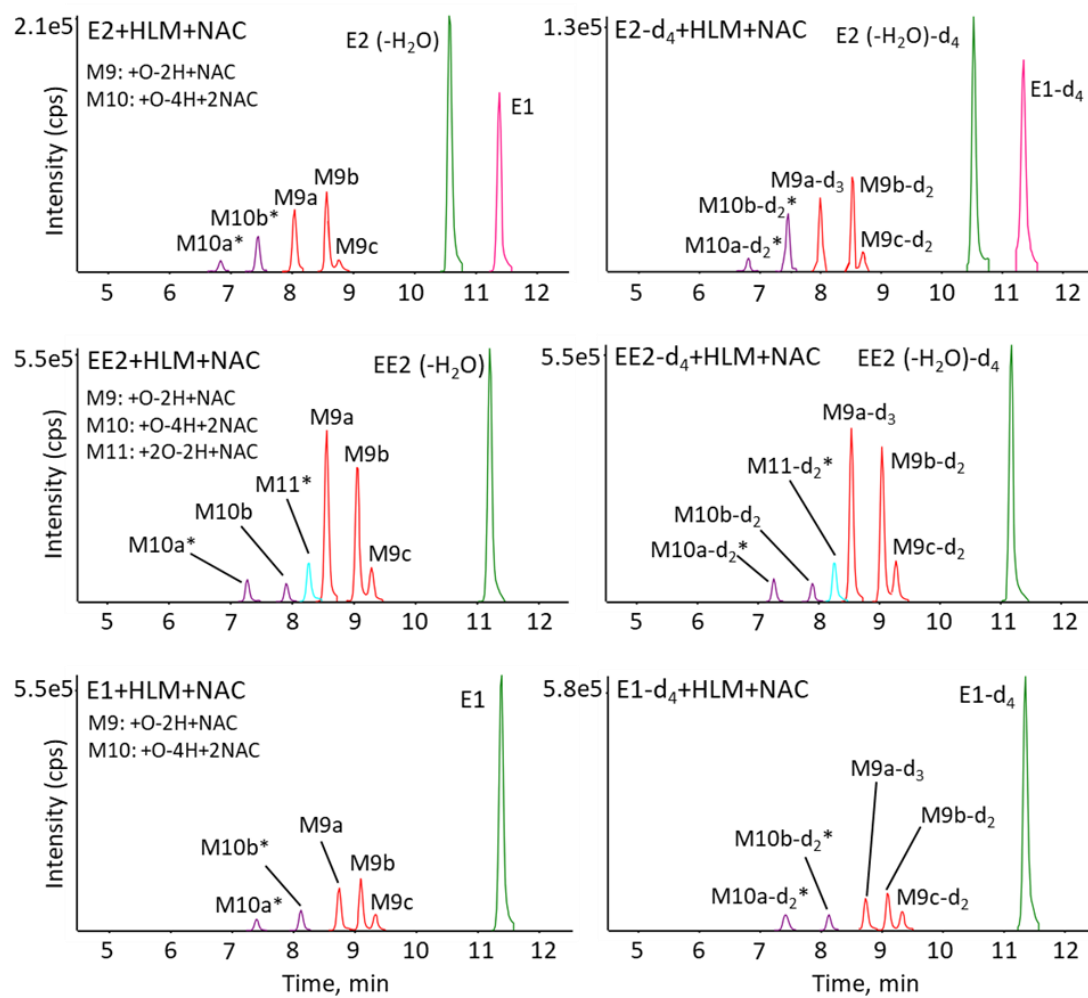


Figure 2.9 Extracted ion chromatograms of E2,EE2 and E1 metabolites and adducts trapped by NAC, for their non-labeled and deuterated versions. Some peaks (\*) were increased by 5× for clarity.

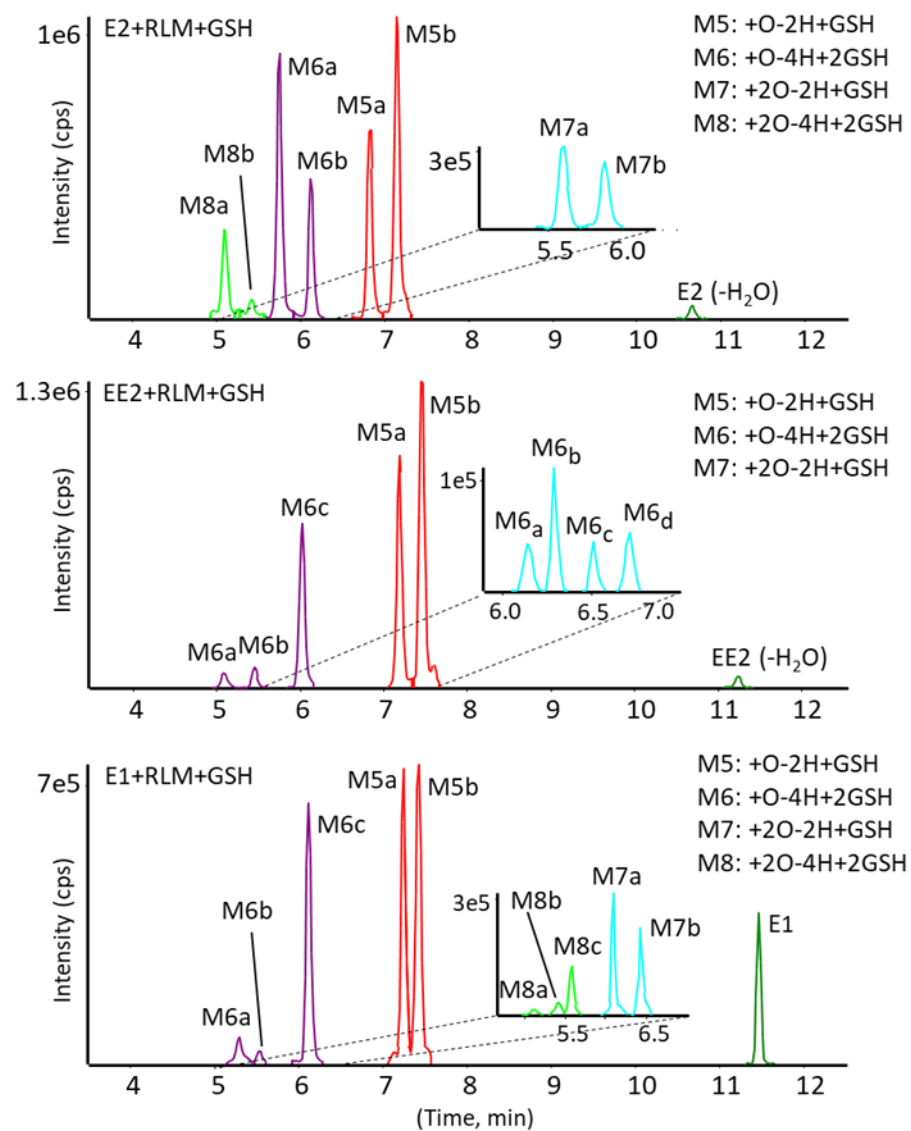


Figure 2.10 Extracted ion chromatograms of E2,EE2 and E1 metabolites and adducts trapped by GSH.

Table 2.2 Summary of metabolites and adducts characterized for E1, E2 and EE2 in human and rat liver microsomes, fragments related to the trapping agent are shown in bold.

<b>Biotransformation</b>	<b>Formula</b>	<b>RT (min)</b>	<b>Measured <i>m/z</i> (ppm)</b>	<b>Selected MS/MS fragments</b>
<b>Estrone</b>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	11.4	271.1689 (-1.4)	253.1588, 223.1103, 197.0960, 185.0957, 173.0959, 159.0801, 157.0645, 145.0643, 141.0696, 133.0646
+O	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	8	287.1641 (-0.3)	269.1536, 213.0909, 199.0756, 175.0748
		8.7	287.16417 (-0.6)	269.1543, 251.1433, 225.1281, 213.1269, 199.1118, 159.0804, 133.0655
		10	287.1640 (-0.6)	269.1531, 229.1218, 213.0907, 199.0750, 161.0592
+2O	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	4.8*	303.1584 (-2.1)	285.1479, 241.1227, 227.1067, 211.0763, 201.0914, 175.0744, 173.0591, 149.0592
		7.4*	303.1583 (-2.7)	285.1490, 267.137, 215.1064, 201.0914, 187.07531, 175.0744, 173.0591, 149.0592
+O-2H+GSH	C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S	7.25	592.2309 (-2.4)	<b>592.2308, 517.1980, 463.1886, 446.1613, 360.1614, 317.1199, 177.0321</b>
		7.4	592.2307 (-2.8)	<b>517.1988, 463.1880, 446.1620, 360.1621, 317.12, 177.0325, 130.0495</b>
		7.6	592.2311 (-2.1)	<b>592.2311, 517.1980, 463.1887, 446.1620, 360.1606, 317.1198, 130.0493</b>
+2O-2H+GSH	C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	6*	608.2278 (0.9)	<b>608.2278, 590.2174, 533.1953, 479.1851, 462.1581, 376.1576, 333.1153, 177.0320, 130.0494</b>
		6.4*	608.2280 (1.2)	<b>608.2278, 533.1954, 479.1850, 462.1571, 376.1582, 333.1158, 177.0320, 130.0495</b>
+O-4H+2GSH	C <sub>38</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub>	5.3*	449.1550 <sup>+2</sup> (2.4)	<b>590.2176, 515.1816, 461.1743, 308.0910, 233.0594, 179.0485, 162.0216, 130.0494</b>
		5.5	449.1542 <sup>+2</sup> (0.8)	<b>622.1881, 606.1981, 590.2190, 549.1731, 515.1746, 495.1565, 461.1686, 443.1637, 177.0298, 130.0500</b>
+O-4H+2GSH	C <sub>38</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub>	6.2	449.1540 <sup>+2</sup> (0.3)	<b>622.1859, 493.1454, 384.6317, 177.0327, 130.0496</b>
+2O-4H+2GSH	C <sub>38</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>2</sub>	5.6*	457.1520 <sup>+2</sup> (1.1)	<b>590.2177, 515.1882, 177.0330</b>

+O-2H+NAC	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>6</sub> S	8.7	448.1791 (0.5)	<b>343.1359, 162.0213</b>
		9.1	448.1789 (0.2)	<b>406.1671, 343.1364, 162.0216, 130.0492</b>
		9.3	448.1786 (-0.6)	<b>406.1673, 343.136, 162.0214, 130.0490</b>
+O-4H+2NAC	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	7.4	609.1930 (-0.8)	<b>448.1788, 404.1501, 343.1403, 162.0216</b>
		8.1	609.1930 (-0.9)	<b>591.1823, 504.1518, 448.1780, 285.1483, 162.0216</b>
		10.7	273.1850 (0.5)	<b>251.1422, 197.0962, 159.0808, 147.0797</b>
<b>β-Estradiol</b>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	10.7	273.1850 (0.5)	<b>251.1422, 197.0962, 159.0808, 147.0797</b>
<b>β-Estradiol</b>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O	10.7	255.1746 (-H <sub>2</sub> O)(0.9)	<b>199.1117, 185.0957, 173.0959, 159.0801, 145.0643, 141.0695, 133.0644</b>
-2H (E1)	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	11.4	271.1694 (0.4)	<b>213.1274, 197.0960, 183.0801, 171.0801, 159.0801, 157.0645, 145.0643, 133.0646</b>
+O	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7.3	271.1693 (-H <sub>2</sub> O)(0.5)	<b>271.1697, 175.0748, 149.0589</b>
		9.5	271.1693 (-H <sub>2</sub> O)(0.3)	<b>271.1696, 175.0746, 161.0593</b>
+O-2H	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	8	287.1644 (0.7)	<b>269.1536, 213.0909, 199.0756, 175.0748</b>
		10	287.1644 (0.6)	<b>269.1531, 229.1218, 213.0907, 199.0750, 161.0592</b>
+2O-2H	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	4.8*	303.1601 (3.3)	<b>285.1479, 241.1227, 227.1067, 211.0763, 201.0914, 175.0744, 173.0591, 149.0592</b>
		7.4*	303.15909 (0.7)	<b>285.1490, 267.137, 215.1064, 201.0914, 175.0744, 173.0591, 149.0592</b>
+2O	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	6.5*	287.1647 (-H <sub>2</sub> O)(1.7)	<b>269.1544, 243.1389, 227.1066, 187.0756, 175.0760, 173.0597, 149.0598</b>
+O-2H+GSH	C <sub>28</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S	6.8	594.2486 (1)	<b>594.2488, 576.2376, 519.2174, 465.2066, 319.1372, 301.1263</b>
+2O-2H+GSH	C <sub>28</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	7.15	594.2488 (1.4)	<b>448.1796, 362.1792, 177.0331, 130.0494</b>
		5.6*	610.2426 (-0.5)	<b>519.2169, 465.2058, 448.1795, 362.1789, 319.1363, 301.1260, 177.0327, 130.0496</b>
		5.9*	610.2435 (1)	<b>535.2105, 481.2000, 464.1736, 378.1735, 335.1310, 317.1208, 177.0323, 130.0496</b>
+O-4H+2GSH	C <sub>38</sub> H <sub>54</sub> N <sub>6</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub>	5.2	450.1626 <sup>+2</sup> (2)	<b>610.2441, 535.2120, 481.2012, 464.1748, 378.1738, 335.1317, 177.0325, 130.0492</b>

+2O-4H+2GSH	C <sub>38</sub> H <sub>54</sub> N <sub>6</sub> O <sub>16</sub> S <sub>2</sub>	5.75	450.1637 <sup>+2</sup> (2.3)	594.2550, 465.2081, 441.1526, 319.1351, 130.0492
		5.1*	458.1608 <sup>+2</sup> (1.3)	624.2043, 606.1940, 594.2486, 465.2013, 549.1765, 495.1604, 177.0334
+O-2H+NAC	C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>6</sub> S	5.4*	458.1608 <sup>+2</sup> (1.5)	565.1653, 511.1562, 177.0326, 130.0495
		8	450.1951 (1.4)	592.2262, 517.1979, 446.1625, 345.1478, 177.0322
		8.6	450.1951 (1.3)	345.1513, 319.1366, 287.1638, 269.1538, 164.0369
		8.8	450.1941 (-0.9)	408.1858, 345.1529, 319.1351, 287.1639, 269.1527, 162.0214
+O-4H+2NAC	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	6.8	611.2106 (2.3)	408.1859, 345.1527, 319.1351, 287.1640, 269.1527, 162.0212
		7.4	611.2092 (0.1)	593.2007, 162.0217, 130.0497
<b>Ethinyl-estradiol EE2</b>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	11.2	297.1847 (-0.7)	185.0956, 145.0638
	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O	11.2	279.1744 (-H <sub>2</sub> O)(0.2)	264.1502, 251.1430, 223.1116, 185.0960, 173.0959, 159.0803, 145.0645, 141.0695 133.0648
+O	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	7.8	295.1698 (-H <sub>2</sub> O)(1.7)	277.1599, 251.1433, 235.1129, 197.0959, 171.0802, 159.0798
		8.2	295.1695 (-H <sub>2</sub> O)(0.9)	277.1587, 251.1431, 235.1109, 227.1425, 211.1118, 197.0956, 185.0961, 171.0805, 159.0799, 145.0642
		10.1	295.1695 (-H <sub>2</sub> O)(0.8)	251.1429, 225.0900, 213.0908, 187.0747, 175.0748, 149.0589
		6.7*	311.1644 (-H <sub>2</sub> O)(0.6)	293.1523, 265.1220, 251.1431, 215.1065, 201.0911, 187.0749, 175.07452, 173.0592
+2O	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	7.2*	311.1645 (-H <sub>2</sub> O)(1.1)	293.1532, 265.1216, 251.1435, 215.1059, 201.0901, 187.0751, 175.0748, 173.0592,
		7.2	618.2492 (1.9)	543.216, 489.2055, 472.1793, 386.1788, 177.0324, 343.1363, 130.0492
+O-2H+GSH	C <sub>30</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S	7.2	618.2492 (1.9)	543.216, 489.2055, 472.1793, 386.1788, 177.0324, 343.1363, 130.0492
		7.5	618.2477 (-0.4)	543.2152, 489.2047, 472.1785, 386.1783, 343.1358, 177.0324, 130.0494
+O-2H+GSH	C <sub>30</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S	7.7	618.2478 (-0.2)	618.2462, 543.2150, 489.2045, 472.1780, 386.1776, 343.1356, 179.0498, 130.0501

+2O-2H+GSH	C <sub>30</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	6.2	634.2418 (-1.7)	616.2314, 531.2153, 505.1992, 488.1705, 402.171, 385.1458, 359.1315, 341.1175, 308.0896, 181.0323, 177.0325, 162.0216, 130.0493
		6.3*	634.2421 (-1.2)	616.2314, 559.2091, 505.1989, 488.1712, 402.1715, 385.1467, 359.13, 306.0757, 274.1029
		6.5*	634.2423 (-0.9)	616.2324, 559.2082, 505.1976, 402.1724, 385.1468, 359.1295, 306.0752, 288.0646, 273.0949, 245.0631, 205.0327, 181.0317, 177.0324, 130.0493
		6.7	634.2423 (-1)	559.2108, 505.1992, 488.1727, 469.1783, 402.1741, 385.1456, 359.1302, 341.1203, 327.1589, 181.0318, 130.0492
+O-4H+2GSH	C <sub>40</sub> H <sub>54</sub> N <sub>6</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub>	5.1*	462.1624 <sup>+2</sup> (1.5)	616.2256, 541.1960, 487.1875, 470.1597, 369.1497, 384.1620, 369.1524, 341.1209, 308.0908, 233.0580, 162.0214, 130.0495
		5.5	462.162 <sup>+2</sup> (0.7)	618.2459, 559.2083, 489.2025, 384.1590, 343.1319, 306.0799, 233.0590, 130.0495
		6	462.1622 <sup>+2</sup> (1.2)	616.2289, 575.1839, 541.1964, 519.1606, 501.1466, 487.1881, 469.1777, 368.1686, 343.1336, 199.0713, 177.0322
+O-2H+NAC	C <sub>25</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>6</sub> S	8.55	474.194 (-1)	432.1821, 369.1508, 343.1359, 311.1636
		9.05	474.1947 (0.3)	432.1829, 369.1512, 343.1364, 311.1639, 293.1537, 162.0212
+2O-2H+NAC	C <sub>25</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>7</sub> S	9.3	474.1945 (0)	432.1829, 369.1516, 343.1362, 311.1640, 162.0214
		8.3	490.1885 (-1.9)	472.1805, 454.1690, 430.1670, 311.1646, 291.1380, 162.0211
+O-4H+2NAC	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	7.3	635.2085 (-1.1)	474.1959, 430.1672, 369.1585, 291.1372, 162.0213
		7.9	635.2086 (-0.9)	430.1672, 369.1587, 291.137, 162.0213



### **CHAPITRE 3**

## **ARTICLE SCIENTIFIQUE : REACTIVE METABOLITES OF TIENILIC ACID STUDIED BY LC-MS/MS USING DIFFERENT TRAPPING AGENTS**

Kahina Chabi and Lekha Sleno

REACTIVE METABOLITES OF TIENILIC ACID STUDIED BY LC-MS/MS  
USING DIFFERENT TRAPPING AGENTS

Kahina Chabi and Lekha Sleno

Université du Québec à Montréal, Chemistry department, PO Box 8888 Downtown Station, Montréal, H3C 3P8, Canada, [sleno.lekha@uqam.ca](mailto:sleno.lekha@uqam.ca)

Kahina Chabi est l'auteure principale de cet article. Elle a effectué la recherche bibliographique, les manipulations au laboratoire, et la rédaction de l'article. Lekha Sleno est l'auteure de correspondance de cet article, elle a conçu et supervisé le projet en plus de réviser et finaliser le manuscrit.

### 3.1 Résumé

**Justification:** Les médicaments subissent une biotransformation au cours du métabolisme afin de faciliter leur excrétion, cependant, les métabolites formés peuvent aussi être une source de toxicité. Les métabolites instables et réactifs sont capables de se lier de manière covalente aux protéines, ce qui a été associé à des lésions hépatiques et à d'autres effets secondaires indésirables. L'acide tienilique (AT) est un diurétique uricosurique utilisé pour le traitement de l'hypertension. Ce médicament a été rapidement retiré du marché car il s'est avéré qu'il provoquait de graves lésions hépatiques. L'hépatotoxicité de l'AT a été liée à sa biotransformation dans le foie, conduisant à la formation de métabolites réactifs qui se lient aux protéines. De ce fait, il est important de développer des méthodes analytiques efficaces nous permettant d'identifier ces métabolites réactifs.

**Méthode :** Diverses techniques sont disponibles pour évaluer la formation de métabolites réactifs, la plus courante employant le piégeage des métabolites formés *in vitro* par le glutathion et la caractérisation des adduits résultants par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Le métabolisme *in vitro* de l'AT a été étudié dans ce travail en utilisant trois agents de piégeage différents, à savoir le glutathion (GSH), la N-acétylcystéine (NAC) et la N-acétyllysine (NAL), combinés à une analyse non ciblée par LC-HRMS/MS pour identifier de manière exhaustive les métabolites réactifs.

**Résultats :** Tous les agents à l'étude ont été capables de former des adduits. Les critères suivants ont été utilisés pour valider la liste des métabolites identifiés : 1) pic du métabolite absent des contrôles à temps zéro et de ceux incubés sans agents de piégeage, 2) précision de masse inférieure à 5 ppm. Au total, un adduits GSH, trois adduits NAC, et deux adduits NAL ont été confirmés. Les trois agents ont été capables de piéger des métabolites similaires, cependant il semblerait que NAC et NAL se soient montrés plus

efficace que le GSH. La structure de chaque adduit formé a été élucidé suite à l'analyse des spectres MS/MS. Les résultats obtenus soulignent le rôle majeur du cycle thiophène dans la réactivité de AT, en effet, les trois agents bien que différents se sont tous liés au niveau du cycle thiophène de AT.

Conclusion : Cette étude a permis de démontrer que l'utilisation de différents agents peut permettre l'identification de différents métabolites réactifs. Le GSH et NAC de part leur similitude devraient être en mesure de piéger des métabolites similaires. Cependant, on constate que NAC se montre bien plus efficace en présence de MR plus polaires. NAL également semble capable de trapper des métabolites réactifs différents de part sa caractéristique de nucléophile dur. L'application de cette méthode à différents xénobiotiques pourrait nous apporter plus d'information quant à l'efficacité de ces différents agents de piégeage.

### 3.2 Abstract

Rationales : Drugs undergo biotransformation during metabolism to facilitate excretion, however, the metabolites formed can also be a source of toxicity. Unstable and reactive metabolites are capable of covalent binding to proteins, which has been associated with liver damage and other adverse side effects. Tienilic acid (TA) is a uricosuric diuretic used for the treatment of hypertension. This drug was quickly withdrawn from the market because it was found to cause severe liver damage. The hepatotoxicity of TA has been linked to its biotransformation in the liver, leading to the formation of reactive metabolites that bind to proteins. Therefore, it is important to develop efficient analytical methods to identify these reactive metabolites.

Method: Various techniques are available to evaluate the formation of reactive metabolites, the most common employing the scavenging of metabolites formed *in vitro* by glutathione and the characterization of the resulting adducts by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The *in vitro*

metabolism of TA was studied in this work using three different scavengers, namely glutathione (GSH), N-acetylcysteine (NAC) and N-acetyl-lysine (NAL), combined with untargeted analysis by LC-HRMS/MS to comprehensively identify reactive metabolites.

Results: All agents tested were capable of forming adducts. The following criteria were used to validate the list of identified metabolites: 1) peak metabolite absent from zero time controls and those incubated without trapping agents, 2) mass accuracy less than 5 ppm. In total, one GSH adduct, three NAC adducts, and two NAL adducts were confirmed. The structure of each adduct formed was elucidated following analysis of the MS/MS spectra.

Conclusion: This study demonstrated that the use of different agents can allow the identification of different reactive metabolites. GSH and NAC, due to their similarity, should be able to trap similar metabolites. However, NAC is much more efficient in the presence of more polar MR. NAL also seems to be able to trap different reactive metabolites due to its hard nucleophile characteristic. The application of this method to different xenobiotics could give us more information about the efficiency of these different trapping agents.

### 3.3 Introduction

Hepatotoxicity is a major problem for the pharmaceutical industry, with many drugs being withdrawn from the market each year because of hepatotoxicity, such as benoxaprofen, tienilic acid, troglitazone and zomepirac (Koen *et al.*, 2012). Tienilic acid (TA) is a uricosuric diuretic used in the treatment of hypertension. Marketed in the US in 1979, it was rapidly withdrawn in 1980 due to the occurrence of severe liver damage in 1 in 1000 treated patients and was fatal in 10% of patients who developed jaundice (Koen *et al.*, 2012). The onset of overt toxicity usually occurred 1-6 months after the start of tienilic acid treatment, with fever, rash and eosinophilia reported.

Numerous studies were then conducted to elucidate the causes of this toxicity (Atkinson Jr et Markey, 2007). TA is oxidized by the CYP2C9 isoenzyme to 5-hydroxytienilic acid, which is the main metabolite found in human urine. This highly electrophilic metabolite can bind to various cellular proteins as well as to CYP2C9. Beaune *et al.* found antibodies to CYP2C9 in the serum of patients with TA-induced hepatitis, suggesting that TA induces an immunological response (Beaune *et al.*, 1987). The immune response leads to the appearance of anti-hepatic and renal endoplasmic reticulum antibodies. Mansuy *et al.* demonstrated that the oxidation of tienilic acid leads to the formation of an electrophilic intermediate capable of highly alkylating cytochrome P450, causing its inactivation and inducing an immune response (Mansuy *et al.*, 1991). Metabolomic studies have shown that TA toxicity is induced by the formation of highly electrophilic species such as thiophene sulfoxide and thiophene epoxide, and their subsequent binding to proteins (Atkinson Jr et Markey, 2012). Thiophene is a five-membered, sulphur-containing heteroaromatic ring used in many drugs. When metabolised by cytochrome P450 enzymes, thiophene can form thiophene S-oxides and thiophene epoxides which are metabolites of highly reactive electrophilic species that can cause drug-induced toxicity (Gramec *et al.*, 2014). Studies have established that thiophene S-oxides have a high reactivity for nucleophiles, particularly thiol nucleophiles, and bind covalently to rat liver and human liver microsomes and proteins (Koen *et al.*, 2012).

Mass spectrometry, coupled with liquid or gas chromatography, is the most commonly used method for the identification of endogenous and exogenous metabolites in complex biological samples (Gouveia *et al.*, 2013). LC-MS with electrospray ionisation (LC-ESI-MS) has become a method of choice for metabolite analysis (Zhang et Tang, 2018). As reactive metabolites are highly unstable, it is useful to trap them with small nucleophilic reagents to form stable adducts for analysis (Denver *et al.*, 2019; Inoue *et al.*, 2015). Glutathione (GSH) is commonly used as a trapping reagent for

reactive metabolites. GSH acts as an endogenous scavenger by covalently binding to reactive metabolites *in vivo*, neutralizing their deleterious effects and leading to their removal (Iverson *et al.*, 1996; Ramanathan *et al.*, 1998). Studies have shown that TA metabolites interact with GSH and can lead to its depletion, and thus induce toxicity (Atkinson Jr et Markey, 2012; Nishiya *et al.*, 2008). Other similar scavengers have also been used to study reactive metabolites, such as N-acetylcysteine (NAC) and cysteine (Cys) (Inoue *et al.*, 2015). In this study, the oxidative metabolism of TA was assessed using incubations of human and rat liver microsomes using a combination of three scavengers, GSH, N-acetyl cysteine (NAC) and N-acetyl lysine (NAL), to investigate the formation of reactive metabolites. Liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry (LC-HRMS/MS) analysis was performed on resulting incubations to detect formed adducts, using accurate mass measurements and collision induced dissociation (CID) fragmentation data.

### 3.4 Materials and Methods

#### 3.4.1 Materials

Tienilic acid was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Human liver microsomes (HLM) were purchased from Bioreclamation IVT (Westbury, NY, USA). Rat liver microsomes (RLM) were purchased from Corning (Corning, NY, USA). Three trapping agents: glutathione (GSH), N-acetyl-L-cysteine (NAC) and N $\alpha$ -Acetyl-L-lysine (NAL) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), as well as HPLC-grade acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), LC-MS-grade formic acid. Ultrapure water was from a Millipore Synergy UV system (Billerica, MA, USA).

#### 3.4.2 *In vitro* Incubation

Tienilic acid was incubated at 20  $\mu$ M, in the presence of human or rat liver microsomes with one of the trapping agents under investigation: GSH, NAC and NAL (2.5 mM), in

a phosphate buffer at pH 7.4 (100 mM) containing NADPH-regenerating system (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM glucose-6-phosphate and 2 units/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase). After 1 h at 37°C, an equal volume of cold acetonitrile quenched the reaction, samples were centrifugated for 8 min at 14,000 rpm, at 4°C. The supernatants were dried under vacuum and reconstituted with 10% acetonitrile prior to LC-MS/MS analysis. Control samples were prepared without trapping agent, as well as incubations quenched before adding the NADPH-regeneration system.

### 3.4.3 LC-HRMS/MS Analysis and Data Processing

Samples were analyzed using a Nexera UHPLC (Shimadzu) coupled to a quadrupole–time-of-flight (TripleTOF<sup>®</sup> 5600, Sciex) mass spectrometer (Concord, ON, Canada). Water and acetonitrile, both containing 0.1% formic acid, were used for gradient elution on an Aeris<sup>™</sup> PEPTIDE XB-C18 column (100 x 2.1 mm, 1.7µm) preceded by a Security-Guard<sup>™</sup> ULTRA Cartridges UHPLC C18 (2.1 x 2 mm) (Phenomenex<sup>®</sup>, Torrance, CA, USA), at 0.3 mL/min and a column temperature of 40°C. The injection volume was 20 µL. The HPLC gradient started at 5% B and was held for 1 min, increased linearly to 85% for 18 min, to 95% for 0.90 min, followed by a 7 min column reequilibration time at starting conditions.

TOF-MS acquisition was performed with 300 ms accumulation time, followed by collision-induced dissociation (CID) MS/MS (in high sensitivity mode) using data-dependent acquisition (top 5 ions, with dynamic background subtraction) (150 ms each) used in positive electrospray mode to acquire high-resolution MS/MS. Nitrogen was used as collision gas and collision energy was 30 ± 10 V. Metabolite Pilot<sup>™</sup> (Sciex) software was used to establish a list of potential metabolites, using a set of known biotransformations (oxidative reactions and GSH, NAC and NAL conjugates). Peakview/Masterview<sup>™</sup> (Sciex) software was then used for processing LC-MS/MS data, to validate the presence of all these metabolites.



### 3.5 Results and Discussion

The metabolism of tienilic acid (TA) (Figure 3.1a) was studied by LC-HRMS/MS to investigate the formation of oxidative metabolites *in vitro*. Two soft nucleophilic analogues, GSH and NAC, and a hard nucleophilic NAL were used to trap unstable electrophilic species forming the corresponding stable adducts. High resolution LC-TOF-MS profiles for each type of incubation were compared to control samples to confirm the formation of metabolites and adducts. As these incubations can result in complex biological matrices, we rely on the study of the high-resolution MS data for each observed metabolite to confirm the elemental formulae of TA metabolites and adducts, as well as search for a characteristic isotopic pattern, since TA contains two chlorine atoms, allowing us to limit false positives (Figure 3.1b). Ionization of TA in positive electrospray mode revealed a peak at  $m/z$  330.9593 ( $C_{13}H_9Cl_2O_4S^+$ , 0.8 ppm) with a retention time of 11.5 min, fragmentation spectra from collision-induced dissociation (Figure 3.2) indicating a preferential cleavage of the thiophene ring as well as neutral losses of either formic acid ( $CO_2H_2$ ) or acetic acid ( $C_2O_2H_4$ ) moiety, producing characteristic fragments of  $m/z$  110, 188, 200, 246, 272 and 284 (Table 3.1).

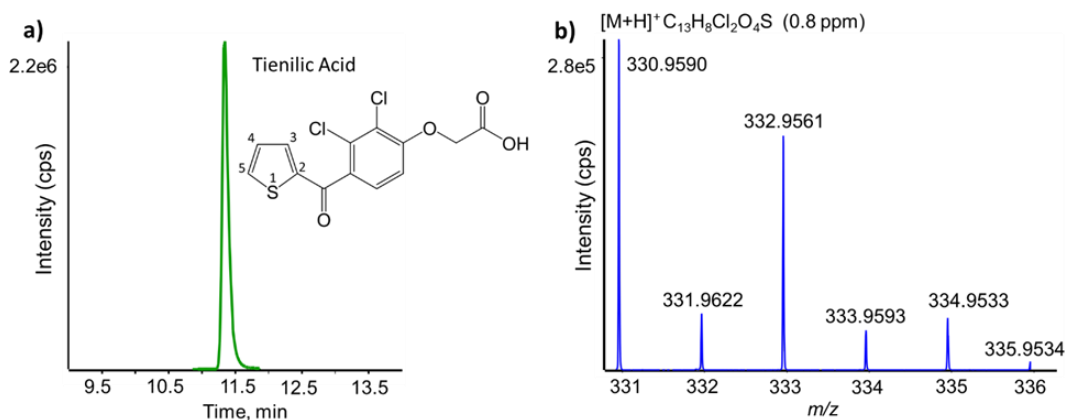


Figure 3.1 Extracted ion chromatogram of protonated TA (1a) and TOF-MS of precursor isotopic pattern (ppm shown in parentheses) (1b).

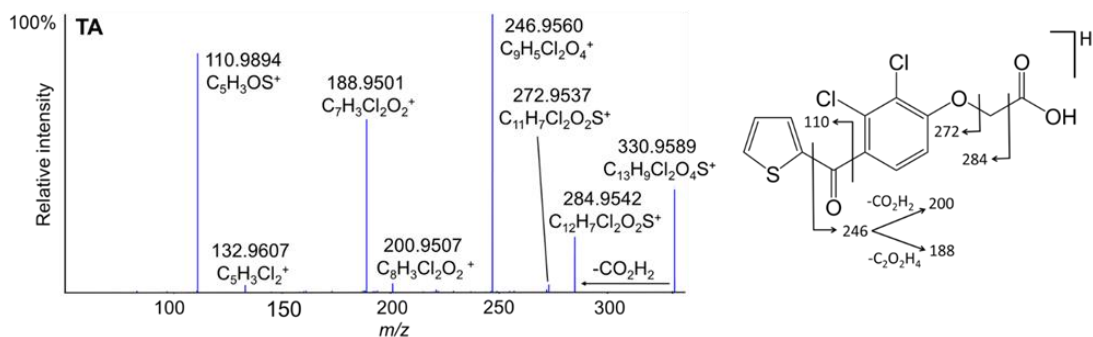


Figure 3.2 HR-MS/MS spectrum and proposed fragmentation of TA (all fragment ions were within 5 ppm of corresponding ion formula).

### 3.5.1 Oxidative Metabolism

When incubated in the presence of NADPH and human or rat microsomes, TA is oxidised at the thiophene ring. Ionization in positive electrospray mode revealed a peak corresponding to TA+O at  $m/z$  346.9545 (C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sup>+</sup>, 0.6 ppm) at a retention time of at 9.4 min (Figure 3.3a). The MS/MS spectrum of this metabolite shows identical fragmentation behavior as the parent molecule (Figure 3.3b). The fragment at  $m/z$  110.9894 in the parent spectrum is now displaced to  $m/z$  126.9843 (Table 3.1), indicating that the oxidation occurs on the thiophene ring of TA. Numerous studies validate this result and confirm that the thiophene ring is the main site of oxidation during TA metabolism. Human CYP2C9 is believed to be the enzyme responsible for this biotransformation, forming 5-hydroxytienilic acid (5-OH-TA), which is the predominant metabolite found in human urine (Tay *et al.*, 2014). The formation of 5-OH-TA can result via the formation of two different types of reactive intermediates, a thiophene epoxide and an S-oxide (Nishiya *et al.*, 2008). A mechanism for the formation of this metabolite is proposed in Figure 3.7. The less common thiophene S-

oxide would be produced by a chain reaction, some studies suggest that the thiophene ring would be oxidized to form a thiophene S-oxide, which would be a potent electrophile capable of binding free thiol groups on proteins and other cellular macromolecules inducing an autoimmune reaction (Valadon, 1992). Incubation of benzothiophene in the presence of rat liver microsomes caused the formation of thiophene S-oxide (Gramec *et al.*, 2014). Experiments conducted by Treiber *et al.* validate this result (Gramec *et al.*, 2014). O'Donnell *et al.* incubated suprofen in the presence of microsomal fractions containing CYP2C9, NADPH and analysed the results by LC-MS/MS. 5-OH-suprofen was the first metabolite detected (Treiber *et al.*, 1997).

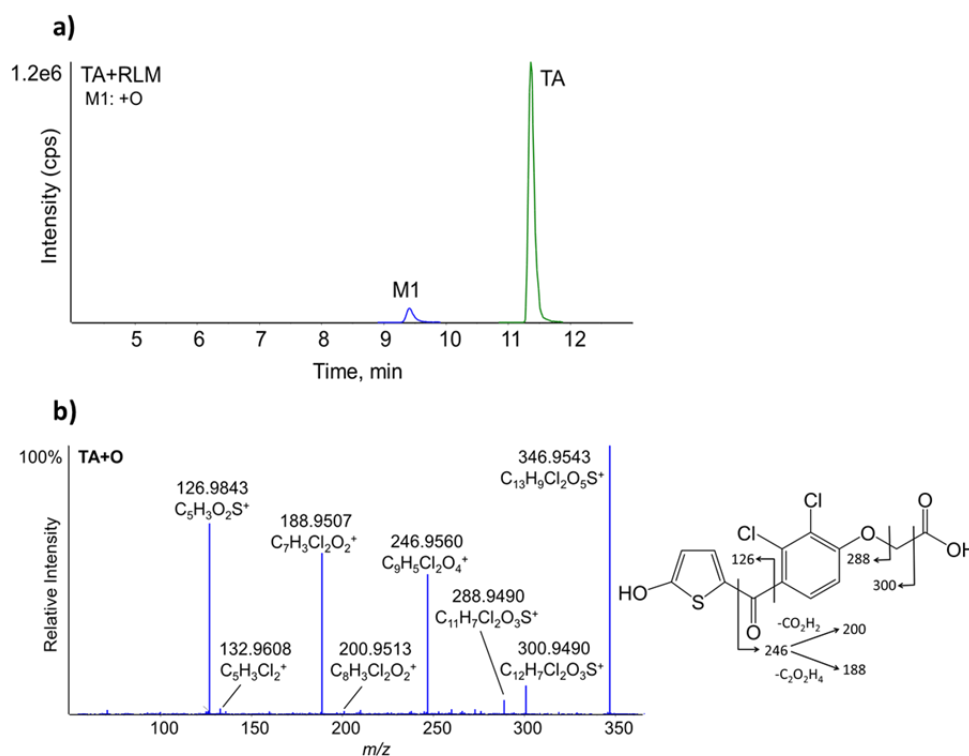


Figure 3.3 High-resolution extraction ion chromatogram of stable oxidative metabolite (TA+O) formed in rat liver microsomal incubations with TA and NADPH (3a) and HR-MS/MS spectrum and proposed fragmentation of TA+O (all fragment ions were within 5 ppm of corresponding ion formula) (3b).

### 3.5.2 Reactive metabolites

Xenobiotics are metabolized into oxidized metabolites to facilitate their elimination from the body. If not properly eliminated, they can form reactive metabolites, which are electrophiles capable of binding cysteine and lysine residues of proteins as well as DNA, inducing significant or even lethal toxicity (Macherey et Dansette, 2008). This is how drugs exert their toxicity. Being highly unstable and having a very short life, it is difficult to characterise these reactive metabolites. The study of their structure requires a capture step by nucleophiles adapted to the types of electrophiles produced by biotransformation. Indeed, reactive metabolites are divided into two categories: soft electrophiles that are easily polarised, such as quinones, imine quinones, epoxides that react with the thiol group of cysteine or glutathione, and hard electrophiles such as aldehydes that react preferentially with the amine groups of lysine, arginine and nucleic acids. A commonly used approach to assess the formation of reactive metabolites is to trap them with a nucleophilic compound, resulting in stable adducts, which are then characterised (Yan *et al.*, 2007).

#### 3.5.2.1 GSH and NAC adducts

Glutathione (GSH) is commonly used as a scavenger molecule in microsomal incubations to trap soft reactive electrophilic metabolites, in the same way that it scavenges reactive oxygen species in the body as a defence mechanism against oxidative stress. N-acetylcysteine is also used as a scavenger of soft reactive metabolites, with the same free thiol group as GSH.

Incubations of TA with NADPH and GSH in the presence of human or rat microsomes indicate the formation of an easily characterised and well known GSH adduct. The adduct at  $m/z$  636.0275 corresponding to TA-2H+GSH ( $C_{23}H_{23}Cl_2N_3O_{11}S_2^+$ , -0.6 ppm) appears at 7.7 min (Figure 3.4). Although the fragmentation spectrum of the adduct

(Figure 3.5) is dominated by glutathione fragmentation mainly due to the neutral loss of glycine (75 Da) and pyroglutamate (129 Da), it is possible to state that the adduction occurred at the thiophene ring. Indeed, the fragment ion of  $m/z$  246.9560 corresponding to  $C_9H_5Cl_2O_4^+$  in TA is found unchanged in the fragmentation spectrum of the adduct at  $m/z$  246.9556. Tay *et al.* speculate that the GSH adduct can be formed via the two pathways proposed (Figure 3.7). The first involving the formation of an epoxide followed by loss of water and the second requiring the formation of a S-oxide although the S-oxide formation route is more difficult to characterise. The results obtained by Gramerc *et al.* support this hypothesis indicating that two pathways would lead to the formation of this adduct (Tay *et al.*, 2014).

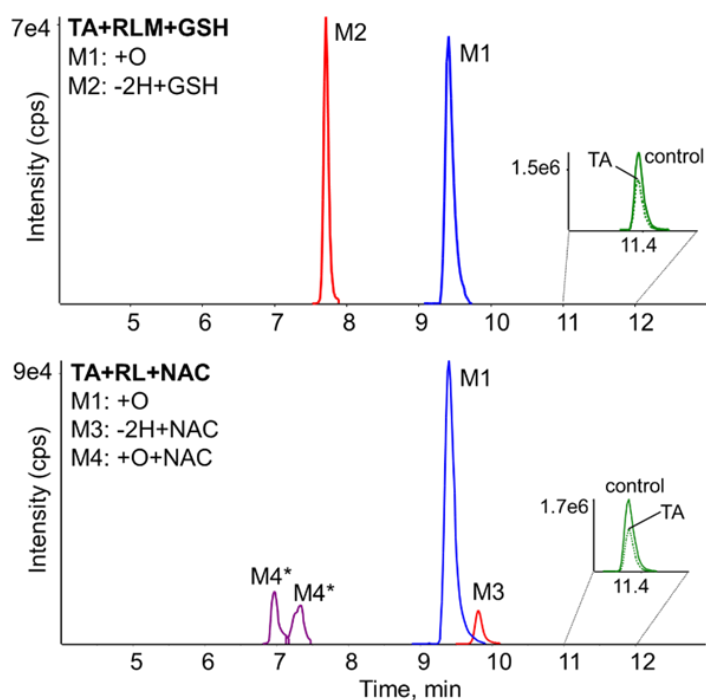


Figure 3.4 Extracted ion chromatograms of TA metabolites formed in presence of RLM and trapped by GSH or NAC. Peaks with asterisk (\*) were increased by  $5\times$  for clarity.

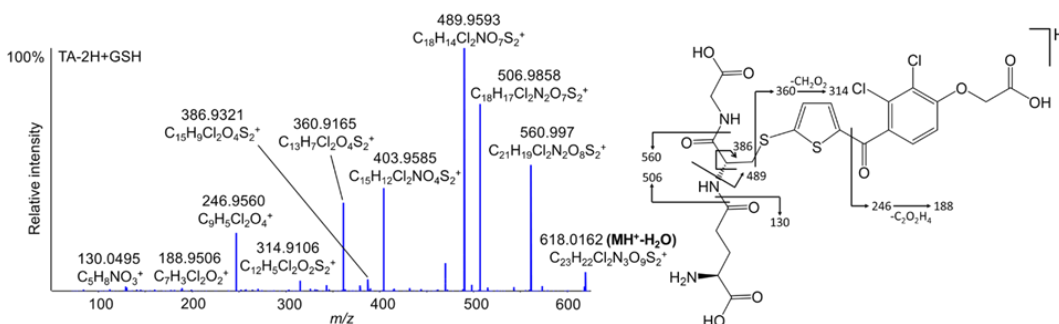


Figure 3.5 HR-MS/MS spectrum of TA-2H+GSH adduct at 7.7 min.

When TA is incubated with NAC, the same kind of reactive metabolites should be observed. Indeed, a peak corresponding to TA-2H+NAC at  $m/z$  491.9739 is observed at 9.8 min (Figure 3.5). Once again, the fragmentation spectrum of this metabolite is dominated by the fragmentation of the scavenger, however, as with GSH, the fragment ion at  $m/z$  246.9560 corresponding to  $C_9H_5Cl_2O_4^+$  in TA is found unchanged in the spectrum of TA-2H+NAC at  $m/z$  246.9556 which allows us to state that the site of biotransformation is located on the thiophene ring. The use of NAC revealed two new adducts not trapped by glutathione corresponding to TA+O+NAC  $C_{18}H_{18}Cl_2NO_8S_2^+$  at 7 and 7.3 min (Figure 3.4). The MS spectrum analysis of these two isomers confirms that they are adducts formed from TA. The NAC adducts have a longer retention time than those obtained with GSH on the chromatographic column, so it can be assumed that this is the reason why these two isomers are observed, and NAC could allow the detection of more polar adducts than GSH. This highlights the importance of using different trapping agents when studying reactive metabolites.

Analysis of the fragment spectra of these isomers indicates that both adducts are located at the thiophene ring and once again we find the fragment ion from the fragmentation of the parent ( $m/z$  246.9560) mentioned above. However, in the fragmentation spectra of each isomer, a fragment ion corresponding to  $C_{13}H_9Cl_2O_5S_2^+$  is found at  $m/z$

378.9280 and 378.9274 (Table 3.1), indicating that the hydroxylation occurred at the thiophene ring in position 4 or 5. Gramec *et al.* present in their study the possibility that TA bioactivated by CYP2C9 can bind to the cellular nucleophile following the formation of an epoxide forming TA+O+Nucleophile metabolites, oxidation could then occur at position 4 or 5 of the thiophene ring the nucleophile would then be positioned at position 5 or 4 respectively, these data seem to corroborate the results obtained (Figure 3.7) (Gramec *et al.*, 2014).

### 3.5.2.2 NAL adducts

Reactive metabolites such as aldehydes, which are hard electrophiles, are trapped by hard nucleophiles such as the amines lysine, histidine or arginine. NAL is currently not widely used as a scavenger, and has never been used in TA *in vitro* studies, but it was interesting to evaluate its ability to scavenge reactive metabolites. NAL was able to trap two types of reactive metabolites. The first at 6.2 min corresponds to TA+O+NAL  $C_{21}H_{24}Cl_2N_2O_8S^+$  (Figure 3.6)  $m/z$  535.0706 is an analogue of TA+O+NAC. Indeed, analysis of the fragmentation spectrum of this metabolite (Table 3.1) indicates that the thiophene ring is involved in this biotransformation, through the formation of an epoxide as explained above. The second metabolite trapped at 5.1 min corresponding to TA-2H+O+NAL at  $m/z$  535.0706 ( $C_{21}H_{22}Cl_2N_2O_8S^+$ , -1 ppm) (Figure 3.6). Analysis of the fragmentation spectrum of this metabolite (Table 3.1) again reveals that the thiophene ring is involved, and, once again the parent fragment is found unchanged at  $m/z$  246.9564. However, the fragment at  $m/z$  361.9644 reveals that hydroxylation has taken place at the thiophene ring. The data obtained do not allow us to characterise the precise mechanism leading to the formation of this adduct, but we have hypothesised that it would involve the formation of a S-oxide in the first instance allowing the adduction of the NAL followed by hydroxylation of the final product. The mechanism is proposed in figure 3.7. Studies have shown that the toxic

metabolism of TA involves action on the serine or thiol groups of cysteines (Methogo *et al.*, 2007), but our results suggest that this molecule effectively binds lysines despite them being hard nucleophiles.

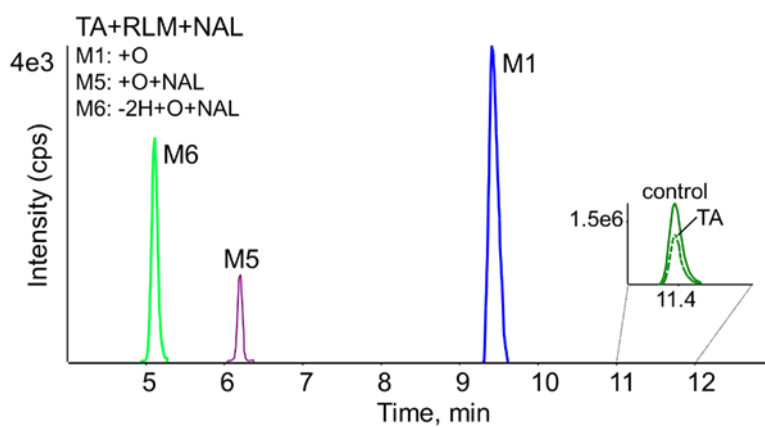


Figure 3.6 Extracted ion chromatograms of TA metabolites formed in presence of RLM and trapped by NAL.



Table 3.1 TA metabolites and adducts detected in RLM and HLM incubations.

Metabolite	Formula	RT (min)	<i>m/z</i> [M+H] <sup>+</sup> (ppm)	MS/MS Fragments <sup>a</sup>
Tienilic Acid (TA)	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	11.3	330.9596 (0.8)	284.9542, 272.9537, 246.9560, 200.9507, 188.9501, 132.9607, 110.9894
TA+O	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	9.4	346.9545 (0.6)	300.9490, 288.9490, 246.9560, 200.9513, 188.9507, 132.9608, 126.9843
TA-2H+GSH	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S	7.7	636.0271 (-0.6)	618.0162, 560.9971, 506.9858, 489.9593, 403.9585, 386.9321, 360.9165, 314.9106, 246.956, 188.9506, 130.0495
TA+O+NAC	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	7	509.9841 (-0.9)	491.9740, 449.9619, 431.9524, 403.9590, 378.9280 362.9304, 246.9552, 164.0368, 146.0269
		7.3	509.9843 (-0.4)	449.9634, 378.9274 ,362.9303, 246.9556, 164.0261
TA-2H+NAC	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	9.8	491.9739 (-0.3)	449.9629, 403.9594, 386.9319, 360.9169, 246.9556, 188.9497, 164.0265
TA+O+NAL	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S	6.2	535.0706 (0.6)	517.0600, 499.0513, 475.0501, 346.9543, 246.9555, 271.1121, 189.1233, 84.0804
TA-2H+O+NAL	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S	5.1	533.0542 (-1)	361.9644, 246.9564, 172.0964,130.0863, 84.0808

<sup>a</sup> Trapping agent specific ions are in bold.

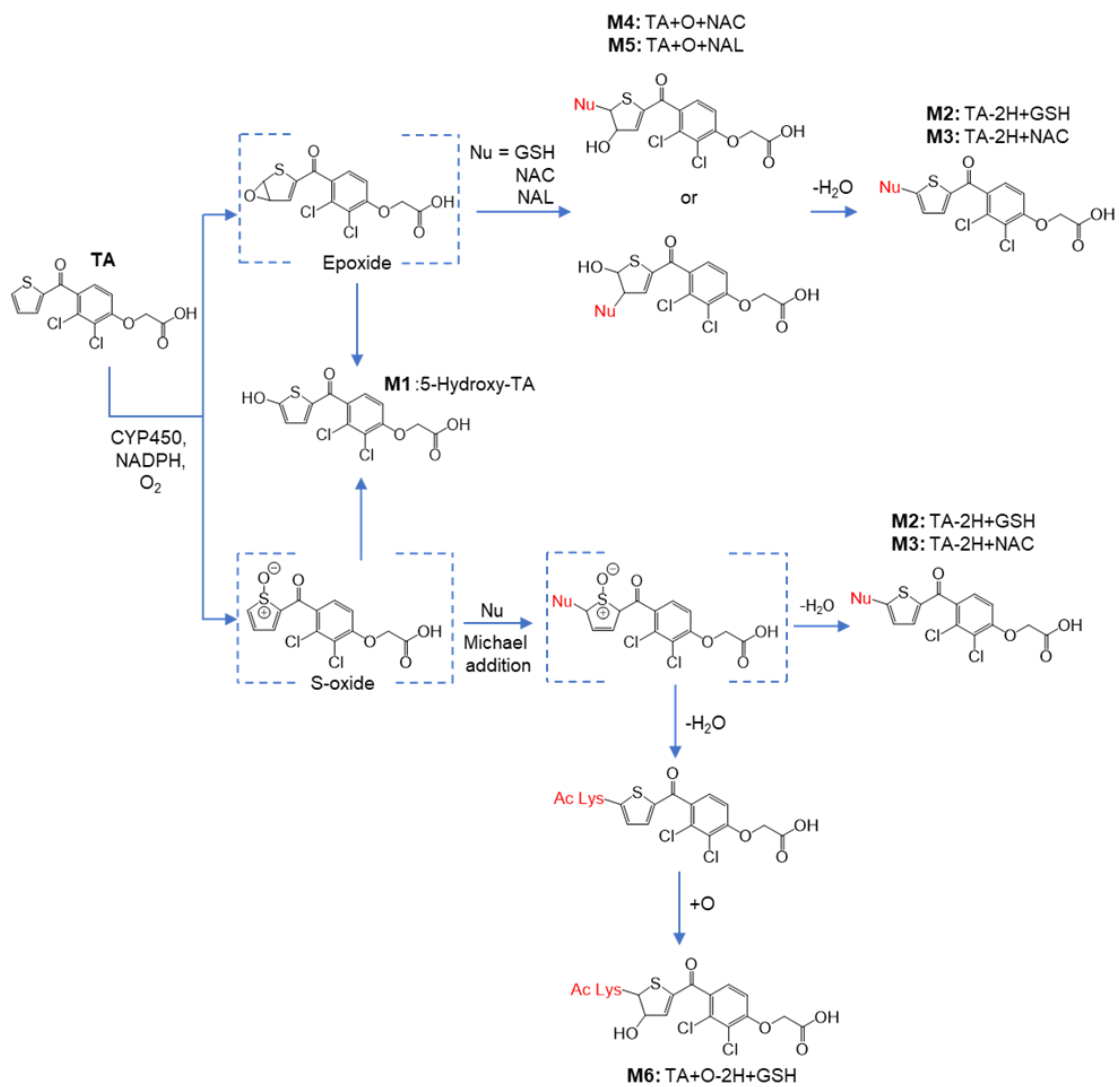


Figure 3.7 Proposed biotransformation reactions of TA detected from human and rat microsomal incubations.

### 3.6 Conclusions

In our study, liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry was used to detect and characterize the oxidative metabolites of tienilic acid. Three different trapping agents were used to trap the soft and hard electrophiles formed after oxidation of the parent compounds. Detailed MS/MS fragmentation routes were used to elucidate the structure of the metabolites. The results obtained in our study reveal that the thiophene ring is always involved in the reactivity of TA.

Indeed, whatever the trapping agent used, the adduction was always located at the thiophene ring, which confirms that this structure, commonly seen in drug structures presents a real danger because of its reactivity. Although we used both soft and hard nucleophiles, we find that they mostly trapped the same reactive metabolites. NAC seems to be more efficient than GSH when it comes to trapping more polar metabolites. However, NAL was the only one to capture metabolites of the TA-2H+O+NAL form, this may be due to its hard nucleophile characteristic.

More and more studies are focusing on the reactivity of thiophenes and their danger. Furthermore, the metabolism of thiophenes involves two metabolic pathways involving the formation of an epoxide and an S-oxide. These results could be used to support future studies to identify the metabolites of other similar xenobiotics. The biological relevance of the formation of these metabolites would require further *in vivo* studies.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

Le métabolisme peut être à l'origine de la toxicité induite par les xénobiotiques, alors il est important d'établir le profil métabolique des différents composés auxquels nous sommes exposés. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est un outil puissant pour l'identification des métabolites réactifs formés, potentiellement toxiques. Les résultats présentés dans le chapitre 2 nous ont permis de mettre en évidence l'importance du marquage isotopique lors de la caractérisation des adduits formés après métabolisme de trois analogues d'estrogènes (estradiol, estrone et éthinyl-estradiol). En parallèle, nous avons évalué trois molécules de piégeage, le glutathion, l'acetyl cysteine et l'acetyl lysine (GSH, NAC et NAL), lors de leur incubation en présence d'acide tienilique (chapitre 3). Nous avons employé une méthode d'analyse non ciblée par LC-HRMS/MS, afin de détecter et caractériser un maximum de métabolites réactifs. Les structures des adduits formés ont été examinées par l'analyse de leur spectres MS/MS à haute résolution, en utilisant les voies de fragmentation des molécules parents et de piégeage, grâce aux mesures de masse exactes nous confirmant les formules moléculaires des ions formés dans le spectromètre de masse.

#### 4.1 Le métabolisme de l'estradiol, estrone et ethinyl-estradiol étudié par LC-HRMS/MS en utilisant le marquage isotopique.

Le chapitre 2 présente le métabolisme de trois analogues d'estrogènes (E2, E1, EE2) et leurs versions deutérées (Figure 2.1) étudiés par LC-HRMS/MS afin d'observer la formation de métabolites oxydatifs *in vitro*. Le GSH et NAC (ayant des thiols libres) ont été utilisés comme agents de piégeage pour détecter les espèces électrophiles instables, formant les adduits correspondants (Yan *et al.*, 2007). Les profils LC-MS à

haute résolution pour chaque type d'incubation ont été comparés aux échantillons de contrôle pour confirmer la formation de métabolites et d'adduits.

Les estrogènes sont impliqués dans divers processus de développement et de maturation sexuelle chez l'homme et les animaux, l'estradiol et l'estrone étant les deux principaux estrogènes présents chez l'homme (Denver *et al.*, 2019). En 1943 la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) a accepté la mise en marché de l'éthinyl-estradiol (analogue synthétique de l'estradiol) dans le cadre de thérapie hormonale (Food et Administration, 2009). Bien qu'ils apportent des bénéfices certains à l'organisme (réduction du risque d'ostéoporose et de maladie cardiaque), les estrogènes présentent une toxicité importante pour l'homme et son environnement (Goldzieher, 1993). Il a été prouvé à de nombreuses reprises que ces hormones sont à l'origine de divers cancers chez l'homme et l'animal (cancer du sein, de l'endomètre, de l'utérus, du foie et du rein) (Cavalieri et Rogan, 2017; Guengerich, 1988). Lorsqu'ils sont rejetés dans l'environnement, on peut citer en exemple l'excrétion urinaire de EE2 par les femmes prenant des contraceptifs hormonaux, ils nuisent au développement et au comportement de nombreuses espèces aquatiques (Avar *et al.*, 2016). Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que ces différentes hormones subissent un métabolisme oxydatif important dans le foie chez l'humain et le rat (Iverson *et al.*, 1996). Ce phénomène induit par les CYP conduit à la formation de catéchols facilement oxydés pour former des orthoquinones réactives. Zhu *et al.* ont mis au point une méthode GC-MS pour identifier plusieurs métabolites réactifs formés lors du métabolisme oxydatif dépendant du NADPH de E1 et E2, en présence de fractions microsomales de foie et de placenta humains (Zhu et Lee, 2005). De nombreux métabolites ont été détectés, tels que le 4-OH-E2, le 15 $\alpha$ -OH-E2, le 16 $\alpha$ -OH-E1 (ou 16 $\beta$ ), le 17 $\alpha$ -OH-E2 et le 2-méthoxy-E2, y compris dans des échantillons d'urine de femmes enceintes et non enceintes, en plus d'autres métabolites bien connus comme le 2-OH-E1/E2, le 2-méthoxy-E1 et le 16 $\alpha$ -OH-E2 (Zhu et Lee, 2005). Bien qu'il existe peu d'informations

sur le métabolisme oxydatif de l'EE2, il a été signalé que cette hormone est fortement oxydée par les cytochromes P450 humains, formant principalement du 2-OH-EE2 (Wang *et al.*, 2004).

Les métabolites des estrogènes ont été liés à l'augmentation des concentrations d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui, en se liant à l'ADN, altèrent les fonctions immunitaires conduisant à des maladies auto-immunes (Ali Khan et Khan, 2016). Chez le hamster, la souris et le rat, il a été montré que les catéchols formés à partir de E1 et E2 sont responsables de la formation d'adduits à l'ADN en se liant à l'adénine ou à la guanine (Yager, 2015). Le 16 $\alpha$ -OH-E1 a été lié à de multiples maladies et est capable de se lier aux protéines en causant de graves dommages aux tissus. Grâce à une approche protéomique utilisant la spectrométrie de masse LC-ESI-HRMS/MS de nombreux sites d'adduction de 16 $\alpha$ -OH-E1 à l'albumine ont été identifiés (Charneira *et al.*, 2020). La majorité des adduits se sont formés au niveau des résidus lysine suite à la stabilisation de la base de Schiff formée avec 16 $\alpha$ -OH-E1 par réduction ou par réarrangement de Heyns, donnant les adduits stables  $\alpha$ -hydroxyamine et cétoamine (Charneira *et al.*, 2020). La LC-MS avec ionisation par électrobulbation (LC-ESI-MS) est la méthode de choix pour l'analyse des métabolites, avec l'avantage par rapport à la GC-MS que la préparation et l'analyse des échantillons sont généralement plus simples et plus universellement applicables aux échantillons biologiques. Le développement de ces techniques a fourni de nouveaux outils pour l'étude des stéroïdes sexuels, apportant de nouvelles informations sur la synthèse des hormones stéroïdes et leurs voies métaboliques (Gouveia *et al.*, 2013). Butterworth *et al.* ont identifié *in vitro* des conjugués du glutathion impliqué dans la néphrotoxicité de l'estradiol, à savoir le 2-hydroxy-1-glutathion-S-yl-17 $\beta$ -estradiol, le 2-hydroxy-4-glutathion-S-yl-17 $\beta$ -estradiol et le 2-hydroxy-1,4-bis-glutathion-S-yl-17 $\beta$ -estradiol (Butterworth *et al.*, 1998). Dans les études de métabolisme, la présence d'interférences provenant de la matrice biologique peut rendre complexe l'identification des métabolites réactifs, ce qui

rend difficile l'identification précise des métabolites dans un ensemble de données vaste et complexe. L'utilisation du marquage isotopique est donc un bon moyen de résoudre ces différents problèmes. Chokkathukalamal *et al.* ont passé en revue les difficultés rencontrées lors de l'étude des métabolites réactifs et l'importance du marquage isotopique pour valider et caractériser les nouveaux métabolites en facilitant l'interprétation des spectres de fragmentation MS/MS (Chokkathukalam *et al.*, 2014).

Les adduits NAC de ces composés n'ont pas été étudiés auparavant, et la comparaison des résultats obtenus avec le GSH et NAC permet de confirmer les adduits formés. L'utilisation d'analogues deutérés permet de distinguer les métabolites réels de la matrice biologique de fond qui présente de nombreuses interférences potentielles, en particulier pour les molécules hormonales ou stéroïdiennes, et aide à l'élucidation structurelle des métabolites et des produits d'intérêt détectés.

Les spectres de masse de E2 et EE2 (Figure 2.2) indiquent que ces deux hormones endogènes perdent facilement une molécule d'eau au niveau du carbone C-17 durant l'ionisation en mode positif. La molécule protonée déshydratée résultante devient l'ion prédominant. Cependant, cette fragmentation ne semble pas affecter E1, en raison de la présence d'un groupement carbonyle en C-17 qui empêche la perte d'eau. Les spectres de fragmentation issus de la dissociation induite par collision indiquent que les trois hormones subissent des schémas de fragmentation similaires. En effet, les cycles B, C et D se clivent formant les ions fragments caractéristiques à  $m/z$  133, 145, 159, 173 et 185 (figure 2.3). Suchar *et al.* ont démontré que l'incubation d'E2 radiomarqué en présence de microsomes hépatiques de rat et de souris produisait 15 métabolites (Suchar *et al.*, 1992). Lee *et al.* ont utilisé la HPLC-UV et la radioactivité pour caractériser le profil du métabolisme NADPH-dépendant de l'E2 et de l'E1 dans les microsomes hépatiques humains, et ont identifié de nombreux métabolites hydroxylés ou cétoniques (Lee *et al.*, 2003). L'estradiol est rapidement converti dans l'organisme en estrone par les enzymes  $17\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type

1 et 2, catalysant la réduction de l'hydroxyle trouvé en position 17 (Hilborn *et al.*, 2017). Le principal métabolite formé par ces deux hormones est le 2-hydroxyœstrogène (2-OHE) suivi du 4-hydroxyœstrogène (4-OHE), formant des catécholestrogènes correspondant aux métabolites oxydatifs détectés pour chaque analogue (Figure 2.4). Cependant, il a été montré que le 4-OH-E2 et le 16-OH-E1 présentent une génotoxicité élevée (Samavat et Kurzer, 2015), et le 4-OH-E2 est considéré comme le principal métabolite impliqué dans les cancers œstrogéno-dépendants. Le 17 $\alpha$ -éthynylestradiol est aussi associé à un risque accru de développer un cancer du sein, de l'utérus et du foie. Wan *et al.* ont montré que les mécanismes moléculaires des dommages au foie impliquent l'oxydation de l'EE2. L'EE2 subit le même métabolisme induit par les cytochromes P450 que ses analogues (Tableau 2.1). Il a été montré que le 2-OH-EE2 est le principal métabolite oxydatif. Cependant, dans notre étude, nous avons pu identifier un nouveau site d'oxydation pour l'EE2, dans le groupe éthynyle. Il est suggéré que l'EE2, contrairement à l'E2 et l'E1, est moins susceptible de subir une oxydation à la position C16 en raison de l'encombrement stérique, et l'expérience de marquage isotopique le confirme. L'oxydation se produit plutôt à la position C20, qui est plus accessible.

Nous avons pu constater que des métabolites réactifs similaires étaient piégés par le GSH et la NAC, en présence d'HLM et de RLM. Des études antérieures ont montré que l'oxydation des œstrogènes par les CYPs entraîne la formation d'œstrogènes catécholiques, qui peuvent ensuite générer des orthoquinones réactives et être piégées par le GSH. L'orthoquinone 2-OHE1/E2/EE2 est considérée comme plus réactive que la 4-OHE1/E2/EE2 et plus susceptible de se lier au GSH et au NAC, formant des espèces piégées +O-2H+GSH (Figure 2.6) et +O-2H+NAC (Figure 2.9). Des données indiquent que les quinones formées par l'oxydation du catéchol œstrogénique subissent un cycle d'oxydoréduction, leur permettant de réagir avec des nucléophiles cellulaires, tels que l'ADN, les protéines et le glutathion endogène (Lu *et al.*, 2007). La liaison du



GSH aux quinones permet leur élimination, agissant ainsi comme un mécanisme de protection. Cependant, la liaison des quinones au GSH hépatique semble conduire à la formation de thioéthers de quinone dont la structure est similaire à celle du M4 (+O-2H+GSH), et qui ont de puissantes propriétés néphrotoxiques. Butterworth *et al.* ont démontré que les œstrogènes E2 catecholate provoquent une néphrotoxicité aiguë chez le hamster en inhibant la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (une enzyme impliquée dans le métabolisme des acides aminés), le substrat des quinone-thioéthers (Butterworth *et al.*, 1998). En présence de RLM, deux adduits supplémentaires ont été détectés, avec une double hydroxylation et une double adduction. Dans une étude précédente, Iverson *et al.* ont étudié les facteurs influençant la vitesse de formation catalysée par le P450 des *o*-quinones à partir de 2-OH-E1 et de 4-OH-E1 et d'estrone dans des microsomes de foie de rat (Iverson *et al.*, 1996). Le GSH a été utilisé pour piéger les quinones et celles-ci ont été séparées et caractérisées par HPLC-MS. Comme l'indiquent nos résultats, on a observé la formation de monoconjugués GSH à partir de la correspondance 2-OH-E1-*o*-quinone. La 2-OH-E1-*o*-quinone semble également former un conjugué di-GSH correspondant à E1+O-4H+2GSH. Les *o*-quinones sont également responsables de l'induction de dommages oxydatifs à l'ADN par les œstrogènes catéchol ; en alkylant l'ADN et en induisant ainsi des dommages irréversibles, la 4-OH-E1-*o*-quinone modifie l'adénine en position C8 sur le cycle purique dans des conditions réductrices (Lippert *et al.*, 2003). Chez le hamster, la 4-OH-E2 s'est avérée être responsable du développement de tumeurs du rein, en réagissant avec l'ADN pour former un adduit dépuratif (laissant des sites apuriques sur l'ADN) (Todorovic, 2001). Ainsi, nous pouvons conclure que la méthode analytique mise au point a permis la caractérisation de nombreux nouveaux métabolites et adduits, y compris ceux impliquant une dihydroxylation, ainsi que des adduits de NAC. La pertinence biologique de la formation de ces métabolites nécessiterait des études *in vivo* supplémentaires.

#### 4.2 Le métabolisme de l'acide tienilique étudié par LC-MS/MS en utilisant différents agents de piégeage.

La formation de métabolites réactifs issus d'incubations *in vitro* de l'acide tienilique (Figure 3.1a) a été étudiée par LC-HRMS/MS. Deux nucléophiles faibles, le GSH et la NAC, et un nucléophile fort, la NAL, ont été utilisés pour piéger les espèces électrophiles instables. Les profils LC-TOF-MS à haute résolution pour chaque type d'incubation ont été comparés à des échantillons de contrôle pour confirmer la formation de métabolites et d'adduits.

L'hépatotoxicité induite par les médicaments est l'un des problèmes majeurs pour l'industrie pharmaceutique, de nombreux médicaments étant retirés du marché chaque année en raison de leur hépatotoxicité, comme le benoxaprofène, l'acide tienilique, la troglitazone et le zomepirac (Koen *et al.*, 2012). L'acide tienilique (AT) commercialisé en 1979, a été rapidement retiré du marché en 1980 en raison d'une atteinte hépatique sévère chez 1 patient traité sur 1000 et ayant conduit à la mort chez 10% des patients ayant développé un ictère (Koen *et al.*, 2012). L'apparition d'une toxicité manifeste survenait généralement 1 à 6 mois après le début du traitement par l'AT, avec fièvre, éruption cutanée et éosinophilie. De nombreuses études ont alors été menées pour élucider les causes de cette toxicité (Atkinson Jr et Markey, 2007). L'AT est oxydé par l'isoenzyme CYP2C9 en acide 5-hydroxytienilique, qui est le principal métabolite oxydatif retrouvé dans les urines humaines. Ce métabolite hautement électrophile peut se lier à diverses protéines cellulaires ainsi qu'au CYP2C9. Beaune *et al.* ont trouvé des anticorps contre le CYP2C9 dans le sérum de patients atteints d'hépatite induite par l'AT, ce qui suggère l'induction d'une réponse immunologique (Beaune *et al.*, 1987). La réponse immunitaire conduit à l'apparition de protéines anti-réticulum endoplasmique hépatique et rénal. Mansuy *et al.* ont démontré que l'oxydation de l'acide tienilique conduit à la formation d'un intermédiaire électrophile capable d'alkyler le CYP2C9, provoquant son inactivation et induisant une réponse

immunitaire (Mansuy *et al.*, 1991). Des études métabolomiques ont montré que la toxicité de l'AT est induite par la formation d'espèces hautement électrophiles telles que le thiophène sulfoxyde et le thiophène époxyde, et leur liaison ultérieure aux protéines (Atkinson Jr et Markey, 2012). Le thiophène étant un pentacycle, contenant du soufre, cette structure est employée dans la synthèse de nombreux médicaments. Lorsqu'il est métabolisé par les enzymes des cytochromes P450, le thiophène peut former des *S*-oxydes de thiophène et des époxydes de thiophène qui sont des métabolites d'espèces électrophiles hautement réactives pouvant provoquer une toxicité induite par les médicaments (Gramec *et al.*, 2014). Des études ont établi que les *S*-oxydes de thiophène présentent une forte réactivité pour les nucléophiles, notamment les nucléophiles thiols, et se lient de manière covalente aux microsomes et aux protéines du foie de rat et humain (Koen *et al.*, 2012).

L'étude du spectre MS/MS provenant de la dissociation induite par collision de l'AT (Figure 3.2) indique un clivage préférentiel du cycle thiophène ainsi que des pertes neutres (de l'acide formique (CO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) ou l'acide acétique (C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)), produisant des fragments caractéristiques aux *m/z* 110, 188, 200, 246, 272 et 284 (Tableau 3.1). L'incubation de l'AT en présence de NADPH et de microsomes humains ou de rat indique la formation d'un métabolite oxydatif détectable (Figure 3.3a). L'étude de son spectre de fragmentation situe l'oxydation au niveau du cycle thiophène (Figure 3.3b). De nombreuses études valident ce résultat et confirment que le cycle thiophène est le principal site d'oxydation au cours du métabolisme de l'AT. Le CYP2C9 humain est l'enzyme majoritairement responsable de cette biotransformation, formant l'acide 5-hydroxytienilique (5-OH-TA), qui est le métabolite prédominant retrouvé dans l'urine humaine (Tay *et al.*, 2014). Le *S*-oxyde de thiophène, moins courant, serait produit par une réaction en chaîne. Certaines études suggèrent que le cycle thiophène serait oxydé pour former un *S*-oxyde de thiophène. Ce dernier serait un puissant électrophile capable de se lier aux groupes thiol libres des protéines et autres macromolécules cellulaires

induisant une réaction auto-immune (Valadon *et al.*, 1996). L'incubation de benzothiophène en présence de microsomes de foie de rat a provoqué la formation de *S*-oxyde de thiophène (Gramec *et al.*, 2014). Les expériences menées par Treiber *et al.* valident ce résultat (Treiber *et al.*, 1997) (Gramec *et al.*, 2014). O'Donnell *et al.* ont incubé du suprofène en présence des fractions microsomales contenant du CYP2C9 et du NADPH et ont analysé les métabolites formés par LC-MS/MS. Le 5-OH-suprofène a été le premier métabolite détecté (O'Donnell *et al.*, 2003). Les incubations de l'AT avec NADPH et GSH en présence de microsomes humains ou de rats indiquent la formation d'un adduit GSH facilement caractérisé et bien connu correspondant à AT-2H+GSH (Figure 3.4), et son homologue piégé par NAC a également été caractérisé. Tay *et al.* spéculent que l'adduit GSH peut être formé via deux voies, comme proposé dans la Figure 3.7. La première impliquant la formation d'un époxyde suivi d'une perte d'une molécule d'eau et la seconde nécessitant la formation d'un *S*-oxyde, bien que le mécanisme de formation du *S*-oxyde soit plus difficile à caractériser. Les résultats obtenus par Gramec *et al.* soutiennent cette hypothèse en indiquant que les deux voies conduiraient à la formation de cet adduit (Gramec *et al.*, 2014). Lorsque l'AT est incubée avec NAC, les mêmes types d'adduits que le GSH devrait être observé. Cependant, l'utilisation du NAC a révélé deux nouveaux adduits (isomères) correspondant à AT+O+NAC (Figure 3.4). L'analyse des spectres MS/MS de ces deux isomères confirme qu'ils sont des adduits formés à partir de l'AT.

Comme constaté dans l'étude portant sur les analogues des estrogènes, les adduits NAC ont un temps de rétention plus long que les adduits GSH sur la colonne chromatographique C18, c'est probablement la raison pour laquelle ces deux isomères sont seulement observés avec NAC. L'utilisation de différents agents de piégeage sert à confirmer la formation de métabolites réactifs avec des adduits analogues. Et dans certains cas, des résultats complémentaires montrent la possibilité de détecter certains

adduits uniques. L'analyse des spectres de fragmentation de ces isomères indique que les deux adduits sont localisés au niveau du cycle thiophène. Gramec *et al.* présentent dans leur étude la possibilité que l'AT bioactivé par le CYP2C9 humain puisse se lier au nucléophile cellulaire suite à la formation d'un époxyde formant des métabolites AT+O+nucléophile, l'oxydation pourrait alors se produire en position 4 ou 5 du cycle thiophène. Le nucléophile serait alors installé en position 5 ou 4 respectivement. Ces données semblent corroborer les résultats obtenus (Figure 3.7) (Gramec *et al.*, 2014). Par la suite, la capacité d'un nucléophile fort à piéger les métabolites réactifs formés lors de l'incubation de l'AT a été évaluée. Dans un premier temps, il a été montré que le NAL tout comme NAC forme un adduit de type AT+O+NAL. Cependant, un second adduit ne possédant pas d'homologue avec GSH et NAC est détecté à 5,1 min (Figure 3.6). L'analyse du spectre de fragmentation de ce métabolite (Tableau 3.1) révèle à nouveau que le cycle thiophène est impliqué. Bien que les données obtenues ne nous permettent pas de caractériser le mécanisme précis conduisant à la formation de cet adduit. La formation d'un *S*-oxyde dans un premier temps permet l'adduction du NAL suivi d'une hydroxylation. Le mécanisme suggéré est présenté dans la figure 3.7. Des études ont montré que le métabolisme toxique de l'AT implique une action sur les groupes sérine ou thiol des cystéines (Methogo *et al.*, 2007), mais nos résultats suggèrent que cette molécule se lie efficacement à l'analogue de la lysines malgré son caractère nucléophile fort. Ainsi les résultats obtenus dans notre étude révèlent que le cycle thiophène est toujours impliqué dans la réactivité de l'AT, et pourrait se lier aux lysines des protéines. En effet, quel que soit l'agent de piégeage utilisé, l'adduction était toujours localisée au niveau du cycle thiophène, ce qui confirme que cette structure, couramment rencontrée dans les structures médicamenteuses, présente un réel danger du fait de sa réactivité. Bien que nous ayons utilisé des nucléophiles faibles et forts, nous avons constaté qu'ils piégeaient principalement les mêmes métabolites réactifs. NAC semble être plus efficace que le GSH lorsqu'il s'agit de piéger les métabolites les plus polaires. Cependant, NAL a été le seul à capturer les métabolites de la forme AT-

2H+O+NAL, cela peut être dû à sa caractéristique de nucléophile fort. Ces résultats pourraient être utilisés pour soutenir de futures études visant à identifier les métabolites d'autres xénobiotiques.

## CONCLUSION

Évidemment, le métabolisme joue un rôle important dans la toxicité induite par les xénobiotiques. Il existe un lien certain entre la formation de métabolite réactif et l'apparition d'une hépatotoxicité médicamenteuse. De ce fait, il est important de concentrer nos efforts dans le développement de méthodes analytiques visant à caractériser les métabolites réactifs. Le potentiel qu'un composé chimique a pour former des espèces réactifs doit donc être évaluée afin de limiter ce type d'exposition. Notre objectif était de développer une approche analytique par LC-MS/MS visant à identifier les métabolites réactifs formés lors du métabolisme *in vitro* de trois analogues d'estrogènes et de l'acide tienilique. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser différents agents de piégeages. De plus, nous souhaitons présenter l'importance du marquage isotopique dans l'analyse structurale des adduits formés. La LC-MS/MS permet de fournir un profil des métabolites réactifs et présente donc un outil de choix pour répondre à nos besoins. Dans le cadre de notre première étude portant sur le métabolisme des analogues des estrogènes, le marquage isotopique s'est montré indispensable à l'identification structurale des adduits formés. En effet, le marquage à des sites précis des molécules étudiées nous a mieux permis d'élucider les structures des métabolites détectés. Notre second objectif était d'évaluer la capacité de piégeage de différents agents, incluant le GSH, NAC et NAL. Nous avons pu constater que le GSH et le NAC, deux nucléophiles mous avec un thiol libre, ont pu piéger les mêmes métabolites réactifs. Cependant, il est important de souligner que le NAC permet une meilleure détection car ces adduits sont souvent plus retenus sur la colonne chromatographique en phase inverse, et alors dans certains cas, le pic de l'adduit GSH élué trop rapidement pour être bien détecté. Les adduits NAC offrent également, dans certains cas, une meilleure résolution que les adduits GSH. Ces conclusions sont

corroborées par les résultats obtenus dans notre seconde étude portant sur le métabolisme de l'acide tiénilique. L'utilisation du NAL a permis de caractériser un nouveau métabolite réactif, non piégé par le GSH ni le NAC. NAL étant un nucléophile dur, son mécanisme de piégeage peut être différent. L'acide tiénilique bien qu'ayant été retiré du marché très tôt après sa commercialisation présente une structure ayant des similarités à d'autres médicaments. Nous avons pu constater que la présence du cycle thiophène est au cœur de la formation des métabolites réactifs. Ces résultats pourraient être utilisés à l'appui de futures études visant à identifier les métabolites d'autres, xénobiotiques. D'ailleurs, nous avons souhaité élargir cette méthode à un plus grand nombre de molécules. Nous avons pour cela incubé en présence de microsomes d'humain et de rat deux autres médicaments le tamoxifène et l'acétaminophène ainsi que deux colorants, le bleu de méthylène et le vert de malachite ayant un pouvoir antiseptique et antiparasitaire puissant. Cette fois-ci, quatre agents de piégeages ont été étudiés, incluant les trois mentionnés précédemment, ajoutant le N $\alpha$ -Boc-L-histidine, un second nucléophile dur. Les résultats préliminaires obtenus sont en accord avec les données présentées dans le cadre de ce projet de maîtrise. Ces études donc se poursuivent.



## BIBLIOGRAPHIE

- Ali Khan, Wahid et Khan, Wajid Ali. (2016). Cytochrome P450-mediated estrogen metabolites and autoimmunity: relationship and link to free radicals. *Current drug metabolism*, 17(1), 65-74.
- Atkinson Jr, AJ et Markey, SP. (2012). Biochemical mechanisms of drug toxicity. Chapter 16. Dans *Principles of Clinical Pharmacology*. Academic Press.
- Atkinson Jr, Arthur J et Markey, Sanford P. (2007). Biochemical mechanisms of drug toxicity. Dans *Principles of Clinical Pharmacology* (p. 249-271). Elsevier.
- Avar, Péter, Zrínyi, Zita, Maász, Gábor, Takátsy, Anikó, Lovas, Sándor, László, G et Pirger, Zsolt. (2016).  $\beta$ -Estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11630-11638.
- Beaune, PH, Dansette, PM, Mansuy, D, Kiffel, L, Finck, M, Amar, C, Leroux, JP et Homberg, JC. (1987). Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(2), 551-555.
- Bolton, Judy L. et Shen, Li. (1996). p-Quinone methides are the major decomposition products of catechol estrogen o-quinones. *Carcinogenesis*, 17(5), 925-929. <https://doi.org/10.1093/carcin/17.5.925>
- Butterworth, Michael, Lau, Serrine S et Monks, Terrence J. (1998). 2-Hydroxy-4-glutathion-S-yl-17 $\beta$ -estradiol and 2-hydroxy-1-glutathion-S-yl-17 $\beta$ -estradiol produce oxidative stress and renal toxicity in an animal model of 17 $\beta$ -estradiol-mediated nephrocarcinogenicity. *Carcinogenesis*, 19(1), 133-139.
- Cavalieri, Ercole L et Rogan, Eleanor G. (2017). Etiology and prevention of prevalent types of cancer. *Journal of rare diseases research & treatment*, 2(3), 22.

- Charneira, Catarina, Nunes, João et Antunes, Alexandra MM. (2020).  $16\alpha$ -Hydroxyestrone: mass spectrometry-based methodologies for the identification of covalent adducts formed with blood proteins. *Chemical research in toxicology*, 33(8), 2147-2156.
- Chokkathukalam, Achuthanunni, Kim, Dong-Hyun, Barrett, Michael P., Breitling, Rainer et Creek, Darren J. (2014). Stable isotope-labeling studies in metabolomics: new insights into structure and dynamics of metabolic networks. *Bioanalysis*, 6(4), 511-524. <https://doi.org/10.4155/bio.13.348>
- Denver, Nina, Khan, Shazia, Homer, Natalie ZM, MacLean, Margaret R et Andrew, Ruth. (2019). Current strategies for quantification of estrogens in clinical research. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 192, 105373.
- Food, US et Administration, Drug. (2009). *Drugs@FDA: FDA-approved drugs*.
- G. Marshall, Alan, T. Blakney, Greg, Chen, Tong, K. Kaiser, Nathan, M. McKenna, Amy, P. Rodgers, Ryan, M. Ruddy, Brian et Xian, Feng. (2013). Mass Resolution and Mass Accuracy: How Much Is Enough? *Mass Spectrometry*, 2(Special\_Issue), S0009-S0009. <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.s0009>
- Goldzieher, Joseph W. (1993). The history of steroidal contraceptive development: the estrogens. *Perspectives in biology and medicine*, 36(3), 363-368.
- Gouveia, Maria João, Brindley, Paul J., Santos, Lúcio Lara, Correia Da Costa, José Manuel, Gomes, Paula et Vale, Nuno. (2013). Mass spectrometry techniques in the survey of steroid metabolites as potential disease biomarkers: A review. *Metabolism*, 62(9), 1206-1217. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.04.003>
- Gramec, Darja, Peterlin Mašič, Lucija et Sollner Dolenc, Marija. (2014). Bioactivation Potential of Thiophene-Containing Drugs. *Chemical research in toxicology*, 27(8), 1344-1358. <https://doi.org/10.1021/tx500134g>
- Guengerich, F PETER. (1988). Oxidation of 17 alpha-ethynylestradiol by human liver cytochrome P-450. *Molecular Pharmacology*, 33(5), 500-508.

- Hayes, Carrie L, Spink, David C, Spink, Barbara C, Cao, Joan Q, Walker, Nigel J et Sutter, Thomas R. (1996). 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9776-9781.
- Hilborn, Erik, Stål, Olle et Jansson, Agneta. (2017). Estrogen and androgen-converting enzymes 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and their involvement in cancer: with a special focus on 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 2, and breast cancer. *Oncotarget*, 8(18), 30552-30562. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15547>
- Inoue, Kazuko, Fukuda, Katsuyuki, Yoshimura, Tsutomu et Kusano, Kazutomi. (2015). Comparison of the Reactivity of Trapping Reagents toward Electrophiles: Cysteine Derivatives Can Be Bifunctional Trapping Reagents. *Chemical research in toxicology*, 28(8), 1546-1555. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00129>
- Iverson, Suzanne L, Shen, Li, Anlar, Nilgun et Bolton, Judy L. (1996). Bioactivation of estrone and its catechol metabolites to quinoid- glutathione conjugates in rat liver microsomes. *Chemical research in toxicology*, 9(2), 492-499.
- Kalgutkar, Amit S. (2017). Liabilities Associated with the Formation of “Hard” Electrophiles in Reactive Metabolite Trapping Screens. *Chemical research in toxicology*, 30(1), 220-238. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00332>
- Kawase, Atsushi, Hashimoto, Ryota, Shibata, Mai, Shimada, Hiroaki et Iwaki, Masahiro. (2017). Involvement of reactive metabolites of diclofenac in cytotoxicity in sandwich-cultured rat hepatocytes. *International journal of toxicology*, 36(3), 260-267.
- Klopčič, Ivana et Dolenc, Marija Sollner. (2019). Chemicals and Drugs Forming Reactive Quinone and Quinone Imine Metabolites. *Chemical research in toxicology*, 32(1), 1-34. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00213>
- Koen, Yakov M, Sarma, Diganta, Williams, Todd D, Galeva, Nadezhda A, Obach, R Scott et Hanzlik, Robert P. (2012). Identification of protein targets of reactive metabolites of tienilic acid in human hepatocytes. *Chemical research in toxicology*, 25(5), 1145-1154.

- Lee, Anthony J, Cai, May Xiaoxin, Thomas, Paul E, Conney, Allan H et Zhu, Bao Ting. (2003). Characterization of the oxidative metabolites of 17 $\beta$ -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome P450 isoforms. *Endocrinology*, 144(8), 3382-3398.
- Lippert, C, Seeger, H et Mueck, AO. (2003). The effect of endogenous estradiol metabolites on the proliferation of human breast cancer cells. *Life sciences*, 72(8), 877-883.
- Liu, Xiaomei, Lv, Hong, Guo, Yaqing, Teka, Tekleab, Wang, Xiaoming, Huang, Yuhong, Han, Lifeng et Pan, Guixiang. (2020). Structure-Based Reactivity Profiles of Reactive Metabolites with Glutathione. *Chemical research in toxicology*, 33(7), 1579-1593. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00081>
- Lu, Fang, Zahid, Muhammad, Saeed, Muhammad, Cavalieri, Ercole L et Rogan, Eleanor G. (2007). Estrogen metabolism and formation of estrogen-DNA adducts in estradiol-treated MCF-10F cells: The effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction and catechol-O-methyltransferase inhibition. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 105(1-5), 150-158.
- Macherey, Anne-Christine et Dansette, Patrick M. (2008). Biotransformations leading to toxic metabolites: chemical aspect. Dans *The practice of medicinal chemistry* (p. 674-696). Elsevier.
- Mansuy, Daniel, Valadon, Philippe, Erdelmeier, Irene, Lopez-Garcia, Pilar, Amar, Claudine, Girault, Jean Pierre et Dansette, Patrick M. (1991). Thiophene S-oxides as new reactive metabolites: formation by cytochrome P-450 dependent oxidation and reaction with nucleophiles. *Journal of the American Chemical Society*, 113(20), 7825-7826. <https://doi.org/10.1021/ja00020a089>
- Methogo, Ruth Menque, Dansette, Patrick M et Klarskov, Klaus. (2007). Identification of liver protein targets modified by tienilic acid metabolites using a two-dimensional Western blot-mass spectrometry approach. *International Journal of Mass Spectrometry*, 268(2-3), 284-295.
- Nishiya, Takayoshi, Kato, Michiyuki, Suzuki, Takami, Maru, Chikako, Kataoka, Hiroko, Hattori, Chiharu, Mori, Kazuhiko, Jindo, Toshimasa, Tanaka, Yori-hisa et Manabe, Sunao. (2008). Involvement of cytochrome P450-mediated metabolism in tienilic acid hepatotoxicity in rats. *Toxicology letters*, 183(1-3), 81-89.

- Ousji, Ons, Ohlund, Leanne et Sleno, Lekha. (2020). Comprehensive in vitro metabolism study of bisphenol a using liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry. *Chemical research in toxicology*, 33(6), 1468-1477.
- Samavat, Hamed et Kurzer, Mindy S. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Letters*, 356(2), 231-243. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.018>
- Sleno, L., Staack, R. F., Varesio, E. et Hopfgartner, G. (2007). Investigating the in vitro metabolism of fipexide: characterization of reactive metabolites using liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21(14), 2301-2311. <https://doi.org/10.1002/rcm.3092>
- Suchar, Lisa A, Chang, Richard L et Conney, Allan H. (1992). High-Performance Liquid Chromatography Method for the Separation of Potential Metabolites of Estradiol. Dans *Hormonal Carcinogenesis* (p. 323-325). Springer.
- Tay, Suzanne, Le, Hoa, Ford, Kevin A, Nelson, Sid D, Khojasteh, S Cyrus et Rademacher, Peter M. (2014). Mechanistic studies of the cationic binding pocket of CYP2C9 in vitro and in silico: metabolism of nonionizable analogs of tienilic acid. *Drug metabolism and disposition*, 42(11), 1955-1963.
- Thompson, Richard A, Isin, Emre M, Li, Yan, Weaver, Richard, Weidolf, Lars, Wilson, Ian, Claesson, Alf, Page, Ken, Dolgos, Hugues et Kenna, J Gerry. (2011). Risk assessment and mitigation strategies for reactive metabolites in drug discovery and development. *Chemico-biological interactions*, 192(1-2), 65-71.
- Todorovic, R. (2001). Analysis of potential biomarkers of estrogen-initiated cancer in the urine of Syrian golden hamsters treated with 4-hydroxyestradiol. *Carcinogenesis*, 22(6), 905-911. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.6.905>
- Treiber, Alexander, Dansette, Patrick M., El Amri, Hamid, Girault, Jean-Pierre, Ginderow, Daria, Mornon, Jean-Paul et Mansuy, Daniel. (1997). Chemical and Biological Oxidation of Thiophene: Preparation and Complete Characterization of Thiophene *S*-Oxide Dimers and Evidence for Thiophene *S*-Oxide as an Intermediate in Thiophene Metabolism *in Vivo* and *in Vitro*. *Journal of the American Chemical Society*, 119(7), 1565-1571. <https://doi.org/10.1021/ja962466g>
- Valadon, Philippe. (1992). *Cytochromes P-450 et Activation Metabolique du Noyau Thiophene: exemple de l'acide tienilique et de ses dérivés* Université Pierre et Marie Curie-Paris VI].

- Wan, Luke et O'Brien, Peter. (2014). Molecular mechanism of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 92(1), 21-26.
- Wang, Bonnie, Sanchez, Rosa I, Franklin, Ronald B, Evans, David C et Huskey, Su-Er W. (2004). The involvement of CYP3A4 and CYP2C9 in the metabolism of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Drug metabolism and disposition*, 32(11), 1209-1212.
- Xian, Feng, Hendrickson, Christopher L. et Marshall, Alan G. (2012). High Resolution Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, 84(2), 708-719. <https://doi.org/10.1021/ac203191t>
- Xie, Cen, Zhong, Dafang et Chen, Xiaoyan. (2013). A fragmentation-based method for the differentiation of glutathione conjugates by high-resolution mass spectrometry with electrospray ionization. *Analytica chimica acta*, 788, 89-98.
- Yager, James D. (2015). Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention—A review. *Steroids*, 99, 56-60.
- Yan, Zhengyin, Maher, Nouredine, Torres, Rhoda et Huebert, Norman. (2007). Use of a trapping agent for simultaneous capturing and high-throughput screening of both “soft” and “hard” reactive metabolites. *Analytical chemistry*, 79(11), 4206-4214.
- Zhang, Zhoupeng et Tang, Wei. (2018). Drug metabolism in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(5), 721-732. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.04.003>
- Zhu, Bao Ting et Lee, Anthony J. (2005). NADPH-dependent metabolism of 17 $\beta$ -estradiol and estrone to polar and nonpolar metabolites by human tissues and cytochrome P450 isoforms. *Steroids*, 70(4), 225-244.