

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉLUCIDATION DES MÉTABOLITES DE BISPHÉNOLS ET
D'ANTIOXYDANTS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE
À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE À HAUTE RÉOLUTION

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
ONS OUSJI

JANVIER 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse 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

Mes remerciements vont tout d'abord à ma directrice de recherche, professeure Lekha Sleno, pour le soutien continu de mes études et de mes recherches, pour sa patience, sa motivation et ses connaissances. Ses conseils m'ont aidé dans toutes les phases de recherche et de rédaction de cette thèse. Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, les professeurs Laurent Cappadocia, Steve Bourgault et Stéphane Bayen pour m'avoir consacré leur temps, pour leurs commentaires perspicaces et leurs encouragements.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire Sleno, notamment Leanne Ohlund, assistante de recherche, pour son aide indispensable, mais aussi les anciens membres, le Dr Maxime Sansoucy, le Dr Timon Geib, Amal Guesmi, Vivaldy Prinville et Kahina Chabi qui m'ont accueilli dans leur équipe à l'époque. Sans oublier les membres actuels, Maggy Lépine, Myriam Mireault, Oriana Zambito et Nathan Ghafari ainsi que mes anciens stagiaires et présents membres Ikram Benhadji-Serradj et Said Matar avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à discuter et travailler en laboratoire et à qui je dois de nombreux moments inoubliables. Je pars avec des amis, des souvenirs et des leçons apprises de chacun de vous. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'avez apporté pendant toutes ces années.

Un remerciement spécial à toute ma famille, pour son soutien moral à distance et ses attentions affectueuses pendant cette période. Je tiens également à remercier tous mes amis qui m'ont soutenu et m'ont incité à m'efforcer d'atteindre mon objectif. En particulier, je voudrais remercier mon mari Ali Fendri qui a toujours été à mes côtés et pour son amour et son soutien moral et affectif qui jamais ne m'a fait défaut.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xiii
Résumé.....	1
CHAPITRE I REVUE DE LA LITTÉRATURE	2
1.1 Les xénobiotiques.....	4
1.1.1 Les plastifiants	5
1.1.2 Les additifs alimentaires.....	12
1.2 Métabolisme et biotransformation des xénobiotiques.....	18
1.2.1 Réactions de phase I.....	19
1.2.2 Réactions de phase II.....	21
1.3 Métabolites réactifs	27
1.4 Métabolisme des xénobiotiques <i>in vitro</i>	29
1.4.1 Stratégies expérimentales pour détecter les métabolites <i>in vitro</i>	29
1.4.2 Les agents de piégeages	32
1.4.3 Alertes structurelles des xénobiotiques.....	32
1.5 Le rôle de l'analyse par spectrométrie de masse une étude de métabolisme.....	35
1.5.1 L'instrumentation des spectromètres de masse	35
1.5.2 Les techniques de séparation chromatographiques pour le profilage des métabolites	41
1.5.3 Stratégies d'identification des métabolites.....	42
1.5.4 Traitement des données et création de la base de données.....	49
1.6 Problématique, hypothèses et objectifs des études présentées.....	51
CHAPITRE II ARTICLE I « COMPREHENSIVE <i>IN VITRO</i> METABOLISM STUDY OF BISPHENOL A USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-HIGH RESOLUTION TANDEM MASS SPECTROMETRY ».....	53
2.1 Résumé.....	55
2.2 Abstract.....	56

2.3 Introduction.....	57
2.4 Materials and Methods	58
2.5 Results.....	61
2.6 Discussion	73
2.7 Conclusion	77
2.8 Supplemental information.....	78
CHAPITRE III_ARTICLE 2_« <i>IN VITRO</i> METABOLISM OF FIVE BISPHENOL A ANALOGS STUDIED BY LC-HRMS/MS ».....	81
3.1 Résumé.....	83
3.2 Abstract.....	84
3.3 Introduction.....	85
3.4 Methods	88
3.5 Results and discussion	90
3.6 Conclusion	110
3.7 Supplemental information.....	111
CHAPITRE IV_ARTICLE 3 « IDENTIFICATION OF <i>IN VITRO</i> METABOLITES OF SYNTHETIC PHENOLIC ANTIOXIDANTS BHT, BHA AND TBHQ BY LC-HRMS/MS ».....	127
4.1 Résumé.....	129
4.2 Abstract.....	130
4.3 Introduction.....	131
4.4 Results and Discussion	134
4.4.1. Metabolism of BHT	134
4.4.2 Metabolism of BHA and TBHQ.....	142
4.4.3 Metabolism of DBP and BHT acid.....	147
4.5 Methods	148
4.5.1 Chemicals	148
4.5.2 <i>In vitro</i> incubations	149
4.5.3 LC-HRMS/MS analysis and data processing	150
4.6 Conclusion	151
4.7 Supplemental information.....	152

CHAPITRE V ARTICLE 4 « STRUCTURAL ELUCIDATION OF NOVEL STABLE AND REACTIVE METABOLITES OF GREEN TEA CATECHINS AND ALKYL GALLATES BY LC-MS/MS »	155
5.1 Résumé.....	157
5.2 Abstract.....	158
5.3 Introduction.....	159
5.4 Materials and Methods	162
5.4.1 Chemicals	162
5.4.2. <i>In Vitro</i> Incubations.....	162
5.4.3 LC-HRMS/MS Analysis and Data Processing.....	163
5.5 Results.....	164
5.5.1 LC-MS Method Development and MS/MS Fragmentation of Catechins and Gallate Esters.....	164
5.5.2 Metabolite Identification	167
5.6 Discussion	175
5.6.1 Metabolism of Green Tea Catechins.....	175
5.6.2 Metabolism of Alkyl Gallates.....	177
5.7 Conclusions	178
5.8 Supplemental data	179
CHAPITRE VI	186
DISCUSSION GÉNÉRALE	186
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	214
BIBLIOGRAPHIE.....	217

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	L'exposome humain	3
1.2	Le marché mondial des plastifiants de 2014 à 2020	5
1.3	Structure chimique de bisphénol A (BPA)	6
1.4	Ressemblance structurelle entre le bisphénol A et l'œstradiol	7
1.5	Structures chimiques des analogues de bisphénol A.....	9
1.6	Les catégories des additifs alimentaires	13
1.7	Structures chimiques des antioxydants les plus utilisés en industrie	14
1.8	Processus de biotransformation des xénobiotiques	18
1.9	Principales voies de réaction d'oxydation catalysées par les CYP450.....	19
1.10	Principales voies de biotransformation du bupropion.....	20
1.11	La réaction d'hydrolyse de l'aspirine.....	21
1.12	Formation des conjugués glucuroniques	21
1.13	Formation des conjugués sulfatés catalysée par des sulfotransférases.....	22
1.14	Réactions d'acétylation catalysées par les N-acétyltransférases	23
1.15	Réactions de méthylation catalysées par les méthyltransférases	24
1.16	Structure chimique du glutathion	25
1.17	Réactions de conjugaison au GSH catalysées par les glutathion-S-transférases	25
1.18	Formation enzymatique d'acide mercapturique issu du métabolisme d'un composé glutathionylé.....	26

1.19	Rôle de la bioactivation dans la toxicité des xénobiotiques	27
1.20	Préparation de fractions microsomales, S9 et cytosoliques	30
1.21	Liste des groupes fonctionnels bioactivables les plus couramment rencontrés et de leurs métabolites réactifs correspondants	34
1.22	Composants d'un spectromètre de masse.....	36
1.23	Processus d'ionisation par électrospray (ESI)	38
1.24	Spectromètre de masse QqTOF	40
1.25	Fragmentation des conjugués GSH dans le mode positif et le mode négatif .	46
2.1	Chemical structure of bisphenol A and deuterated analogs used in this study; 1: BPA-2,2',6,6'-d ₄ , 2: BPA-3,3',5,5'-d ₄ , 3: BPA dimethyl-d ₆	61
2.2	Extracted ion chromatograms of BPA metabolites formed in (A) RLM with NADPH; (B) RLM with NADPH and GSH; (C) RLM with NADPH and UDPGA; (D) rat S9 fraction with NADPH and PAPS; dotted peak is parent BPA in control incubation (without cofactors)	62
2.3	High-resolution MS/MS spectra of BPA (A) and hydroxylated BPA (BPA+O) (B).....	64
2.4	Mirror plot of BPA dimers with proposed routes of fragmentation.....	67
2.5	High-resolution MS/MS spectra and fragmentation reactions of GSH adducts detected in rat and human liver microsomes; (A) BPA-2H+GSH, (B) BPA+O-2H+GSH, (C) ipr.phenol-2H+GSH; (D) phenol-2H+GSH and (E) BPA+O-4H+2GSH	69
2.6	Proposed biotransformation reactions of BPA, forming metabolites detected in this study	72
2.7	Extracted ion chromatograms of incubations with BPA containing (A) human liver microsomes (HLM) + NADPH, (B) HLM + NADPH + GSH, (C) CYP3A4 (Supersomes) + NADPH + GSH.....	78
2.8	Extracted ion chromatograms of BPA and metabolites detected in incubations with rat liver microsomes, NADPH and GSH, in positive ion mode.....	79

2.9	HR-MS/MS spectra for BPA glucuronide conjugates with proposed routes of fragmentation; (A) BPA+gluc and (B) BPA+O+gluc.....	79
2.10	HR-MS/MS spectra for sulfate conjugates of BPA with proposed routes of fragmentation; (A) BPA+SO ₃ ; (B) BPA+O+SO ₃ ; (C) BPA+2O+SO ₃	80
3.1	Chemical structures and overlaid negative ion mode LC-HRMS extracted ion chromatograms of BPA analogs from control microsomal incubations. Peaks with asterisk (*) were increased by 10x for clarity	87
3.2	High-resolution MS/MS spectra and proposed fragmentation pathways of deprotonated molecules of BPA (a), CUMY (b), BPAF (c), BPF (d), BPS (e) and TMBPF (f)	91
3.3	Extracted ion LC-MS chromatograms, in negative ion mode, of oxidative metabolites and GSH adducts of BPAF (a), BPF (b), BPS (c), CUMY (d) and TMBPF (e).....	96
3.4	Extracted ion LC-MS chromatograms of glucuronide and sulfate conjugates of BPAF (a), BPF (b), BPS (c), CUMY (d) and TMBPF (e). Peaks with asterisk (*) were increased by 5x.....	97
3.5	Mirror plot of BPF-2H+GSH isomers with proposed routes of fragmentation in negative mode (a) BPF-2H+GSH at 5.6 min and (b) BPF-2H+GSH at 7.5 min	100
3.6	High-resolution MS/MS spectra and proposed fragmentation pathways of BPF+O-2H+GSH (a), BPF+O-4H+2GSH (b) (All fragment ions were measured within 10 ppm accuracy of proposed ion formulae).....	103
3.7	LC-MS traces of deprotonated dimers from BPA analogs formed in HLM using a modified gradient on the F5 HPLC column	106
3.8	Proposed biotransformation pathways of BPA analogs for the formation of detected GSH adducts of (a) BPAF/BPS, (b) BPF/TMBPF and (c) CUMY. Shaded metabolites are specific for BPS (a) and BPF (b)	109
3.9	Extracted ion chromatograms of BPA analogs oxidative metabolites formed in RLM with NADPH only for BPAF (a), BPF (b), BPS (c), CUMY (d), TMBPF (e). *Peak for CUMY parent shown is from control incubations (without NADPH).....	111

- 3.10 MS/MS spectra and proposed fragmentation for BPAF metabolites: (a) BPAF+O, (b) BPAF+O-2H+GSH, (c) BPAF+gluc, (d) BPAF+O+gluc, (e) BPAF+2gluc, (f) BPAF+SO₃, (g) BPAF+O+SO₃..... 112
- 3.11 Mirror plot of BPAF dimers with proposed routes of fragmentation (CE 70 V), (a) C-O dimer and (b) C-C dimer..... 113
- 3.12 MS/MS spectra and proposed fragmentation for BPF metabolites (a) BPF+O, (b) BPF+2O, (c) phenol-2H+GSH, (d) methylphenol-2H+GSH, (e) BPF+2O-2H+GSH, (f) BPF+gluc, (g) BPF+O+gluc, (h) BPF+SO₃, (i) BPF+O+SO₃, (j) BPF+2O+SO₃..... 114
- 3.13 Mirror plot of BPF dimers with proposed routes of fragmentation (CE 30 V); (a) C-O dimer and (b) C-C dimer..... 116
- 3.14 MS/MS spectra and proposed fragmentation for BPS and its metabolites: (a) BPS in positive mode, (b) BPS+O, (c) BPS+2O, (d) BPS+O-2H+GSH, (e) BPS+gluc, (f) BPS+O+gluc, (g) BPS+SO₃, (h) BPS+O+SO₃..... 118
- 3.15 Mirror plot of BPS dimers with proposed routes of fragmentation (CE 50 V); (a) C-O dimer and (b) C-C dimer..... 119
- 3.16 MS/MS spectra and proposed fragmentation for CUMY metabolites (a) CUMY+O, (b) CUMY+2O, (c) CUMY+O-2H+GSH, (d) CUMY+2O-2H+GSH, (e) CUMY+O-4H+2GSH, (f) CUMY+gluc, (g) CUMY+O+gluc, (h) CUMY+SO₃, (i) CUMY+O+SO₃, (j) CUMY+2O+SO₃, (k) CUMY C-C dimer (CE 50)..... 120
- 3.17 MS/MS spectra and proposed fragmentation for TMBPF metabolites (a) TMBPF+O, (b) dimethylphenol-2H+GSH, (c) trimethylphenol-2H+GSH, (d) TMBPF+gluc, (e) TMBPF+SO₃, (f) TMBPF+O+SO₃..... 123
- 3.18 Mirror plot of TMBPF-2H+GSH isomers with proposed routes of fragmentation in negative mode (a) TMBPF-2H+GSH at 10.1 min and (b) TMBPF-2H+GSH at 8.5 min..... 124
- 3.19 Mirror plot of TMBPF-2H+GSH isomers with proposed routes of fragmentation in positive mode (a) TMBPF-2H+GSH at 10.1 min and (b) TMBPF-2H+GSH at 8.5 min..... 125
- 4.1 High-resolution MS/MS spectra for deprotonated BHT (a), BHA (b), and TBHQ (c) 135

4.2	Extracted ion chromatograms of BHT metabolites formed in incubations with (A) HLM and NADPH; (B) HLM, NADPH and GSH; (C) HLM, NADPH and UDPGA; (D) Human S9 fraction, NADPH and PAPS; Peaks with asterisk (*) were increased by 10x	138
4.3	Proposed biotransformation reactions of BHT	141
4.4	Proposed biotransformation reactions of BHA and TBHQ	147
4.5	Extracted ion chromatograms of oxidative metabolites formed when BHT-acid (A) and DBP (B) were incubated with HLM and NADPH; Peaks with asterisk (*) were increased by 5x. (C) Proposed biotransformation reactions of DBP and BHT-acid; dotted arrows refer to non-enzymatic reactions (peaks found in control without incubation time, quenched at 0 min).....	152
4.6	Extracted ion chromatograms of BHA metabolites formed in HLM incubations with added (A) NADPH, (B) NADPH and GSH, (C) NADPH and UDPGA, and human S9 incubation with (D) NADPH and PAPS. Peaks with asterisk (*) were increased by 10x	153
4.7	Extracted ion chromatograms of TBHQ metabolites formed in (A) HLM with NADPH; (B) HLM with NADPH and GSH; (C) HLM with NADPH and UDPGA; (D) Human S9 fraction with NADPH and PAPS; Peaks with asterisk (*) were increased by 10x	154
5.1	Chemical structures of studied natural and synthetic antioxidants	164
5.2	Overlaid LC-TOF-MS extracted ion chromatograms of deprotonated molecules from natural (a) and synthetic (b) antioxidants from control HLM incubations. GA peak (*) was increased by 3× for clarity	165
5.3	High-resolution MS/MS spectra for deprotonated EGCG/GCG (a), ECG/CG (b), EC/C (c), EGC/GC (d), GA (e), and EG (f).....	166
5.4	Overlaid extracted ion chromatograms of EGCG (a–c) and PG (d–f) metabolites formed in HLM incubations. Peaks with asterisk (*) were increased by 10× for clarity.....	170
5.5	Mirror plot of MS/MS spectra for two MeEGCG isomers with proposed structures supported by diagnostic fragment ions	171
5.6	Mirror plot of MS/MS spectra for two EGCG-2H+GSH adducts with proposed fragmentation pathways for distinguishing structures.....	172

5.7	Proposed biotransformation pathways of catechins forming GSH adducts and methylated metabolites of (a) C/EC, (b) GC/EGC, and (c) CG/ECG and GCG/EGCG	173
5.8	Proposed biotransformation pathways for the formation of metabolites and GSH adducts from octyl gallate	174
5.9	Overlaid extracted ion chromatograms of OG metabolites formed in HLM incubations. Peaks with asterisk (*) were increased by 10× for clarity	180
6.1	Les défis à relever dans le flux de travail	188
6.2	Système de régénération du NADPH utilisant le glucose 6-phosphate et le NADP ⁺ dans l'oxydation médiée par le CYP.....	191
6.3	Aperçu schématique des méthodes d'acquisition DDA-MS (a), DIA-MS (b) et MS/MS ciblé (c).....	199
6.4	Application du marquage au deutérium pour l'élucidation structurale de l'adduit BPA-2H+GSH.....	203
6.5	Formation des adduits GSH des produits de clivage homolytique de BPA .	204

LISTE DES TABLEAUX

		Page
	Tableau.....	
1.1	Application et effets des analogues de BPA les plus répandus.....	11
1.2	Susceptibilité à l'hydrolyse de différents électrophiles.....	20
1.3	Les modèles de criblage des métabolites <i>in vitro</i>	31
1.4	Liste des éléments communs et leurs masses exactes	44
1.5	Les biotransformations communes avec leurs compositions élémentaires et défauts de masse exacts correspondants	45
2.1	LC-HRMS/MS data for BPA and detected metabolites	63
2.2	Summary of HRMS data for oxidative metabolites and GSH adducts of deuterated BPA analogs using isotope-labeled BPA analogs.....	65
3.1	Summary of MS/MS data for BPA analogs metabolites in negative ion mode	92
3.2	Summary of LC-MS/MS data for BPA analogs GSH adducts (in positive ion mode).....	126
4.1	Summary of MS/MS data for BHT and metabolites in negative ion mode..	137
4.2	High-resolution mass spectrometry data using isotope-labeled BHT analogs	139
4.3	Summary of MS/MS data for BHA metabolites in negative ion mode.....	144
5.1	Summary of detected metabolites from studied natural antioxidants	167

5.2	Summary of detected metabolites from gallic acid and gallate ester analogs	168
5.3	Summary of LC-HRMS/MS data of detected metabolites from studied natural antioxidants	183
5.4	Summary of LC-HRMS/MS data of ester gallates analogs metabolites	185

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
AO	Aldéhyde oxydase
BG	Butyle gallate
BHA	Hydroxyanisole butylé (<i>Butylated hydroxyanisole</i>)
BHT	Hydroxytoluène butylé (<i>Butylated hydroxytoluene</i>)
BPA	Bisphénol A
BPAF	Bisphénol AF
BPAP	Bisphénol AP
BPAQ	Bisphénol A quinone
BPB	Bisphénol B
BPF	Bisphénol F
BPS	Bisphénol S
C	Catéchine
CG	Catéchine gallate
COMT	Catéchol- <i>O</i> -méthyltransférase
CUMY	Cumylphénol

CYP	Cytochrome P450
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
DDA	Acquisition dépendante des données (<i>Data-dependent acquisition</i>)
DIA	Acquisition indépendante des données (<i>Data-independent acquisition</i>)
DJA	Dose journalière admissible
DP	Dipeptidases
EC	Épicatéchine
ECG	Épicatéchine gallate
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments (<i>European Food Safety Authority</i>)
EG	Éthyle gallate
EGC	Épigallocatechine
EGCG	Épigallocatechine gallate
EQ	Éthoxyquine
ESI	Ionisation par électroébulisisation (<i>Electrospray ionization</i>)
FDA	Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (<i>Food and Drug Administration</i>)
G6P	Glucose-6-phosphate
G6PDH	Glucose-6-phosphate déhydrogénase
GA	Acide gallique (<i>Gallic acid</i>)
GC	Gallocatechine

GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>)
GCG	Gallocatéchine gallate
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transférase
γ -GT	Glutamyltranspeptidase
HLM	Microsomes de foie humain (<i>Human liver microsomes</i>)
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution (<i>High resolution mass spectrometry</i>)
IDA	Acquisition dépendante de l'information (<i>Information-Dependent Acquisition</i>)
LC- HRMS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem à haute résolution (<i>Liquid chromatography coupled to high-resolution tandem mass spectrometry</i>)
LG	Lauryl gallate
MAO	Monoamine oxydase
MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass spectrometry</i>)
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem (<i>Tandem mass spectrometry</i>)
NAC	<i>N</i> -acétyl- <i>L</i> -cystéine
NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAT	<i>N</i> -acétyltransférase
NL	Perte neutre (<i>Neutral loss</i>)
NRS	Système de régénération du NADPH (<i>NADPH regeneration system</i>)
OG	Octyl gallate

PAPS	3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate
PG	Propyl gallate
QqQ	Triple quadripôle
QqTOF	Quadripôle-temps de vol (<i>Quadrupole time of flight</i>)
R	Résolution
RLM	Microsomes de foie de rat (<i>Rat liver microsomes</i>)
RP	Phase inverse (<i>Reverse phase</i>)
SAM	S-adénosylméthionine
SPE	Extraction en phase solide (<i>Solid phase extraction</i>)
SULT	Sulfotransférase
TBBPA	Tétrabromobisphénol A
TMBPF	Tetraméthylbisphénol F
TOF	Temps de vol (<i>Time of flight</i>)
UDPGA	Uridine 5'-diphosphate acide glucuronique
UE	Union européenne (<i>European Union</i>)
UGT	UDP-glucuronosyl transférase
UPLC	Chromatographie liquide ultra-performante (<i>High performance liquid chromatography</i>)
XO	Xanthine oxydase

Résumé

Le thème central de ce projet est le développement de méthodes bioanalytiques pour l'étude de métabolisme des xénobiotiques présents dans l'environnement en utilisant la spectrométrie de masse. Les xénobiotiques sont des molécules étrangères à l'organisme qui exercent divers effets sur les systèmes biologiques selon leurs caractéristiques physicochimiques. Dans certains cas, à la suite de leur biotransformation, ces molécules deviennent réactives. Par conséquent, elles se transforment en métabolites réactifs qui auront le potentiel de se lier aux macromolécules telles que les protéines ou l'ADN, engendrant par la suite des effets néfastes.

Les xénobiotiques étudiés dans cette thèse appartiennent aux familles des bisphénols et des antioxydants. Ce projet vise le développement d'une approche analytique novatrice conçue pour l'étude de métabolisme *in vitro* de bisphénol A (BPA) et ses analogues, de l'hydroxytoluène butylé (BHT) et ses analogues, des esters gallates et des catéchines de thé vert. Des fractions hépatiques de l'humain et du rat ont été utilisées pour l'étude de leurs métabolites réactifs (après leur conjugaison au glutathion), ainsi que leurs métabolites oxydatifs, méthylés et conjugués glucuroniques et sulfatés.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem à haute résolution est utilisée pour la détection et la caractérisation des métabolites formés. Des analogues marqués au deutérium ont été aussi utilisés pour une élucidation complète des structures des métabolites de certains des xénobiotiques étudiés. Afin d'obtenir de meilleurs résultats, la préparation des échantillons, l'acquisition et l'analyse des données ont été optimisées.

Les stratégies d'analyses développées permettent non seulement de faire progresser les connaissances sur les voies métaboliques impliquées dans les biotransformations de ces xénobiotiques, mais elles peuvent également être appliquées au développement de techniques analytiques pour l'identification des biomarqueurs permettant de comprendre et prédire les mécanismes de toxicité et de mesurer l'exposition chez l'humain à d'autres xénobiotiques.

Mots clés : Développement de méthodes, métabolisme, métabolites réactifs, spectrométrie de masse, xénobiotiques

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Il y a plus de 15 ans, Dr Christopher Wild a introduit le concept d'exposome au sein de la communauté scientifique, exprimant sa vision d'un domaine qui fournirait le complément environnemental du génome (Wild, 2005). L'exposome a été défini comme étant l'ensemble des expositions environnementales au cours de la vie (y compris les facteurs liés au mode de vie) à partir de la période prénatale (Figure 1.1) (Miller, 2021; Wild, 2005). Dynamique par nature, l'exposome a été divisé en trois domaines qui se chevauchent et qui se réfèrent à différents facteurs d'exposition à mesurer : 1) un environnement externe général comprenant des facteurs tels que l'environnement urbain et rural, le facteur climatique, etc. 2) un environnement externe spécifique comprenant l'alimentation, l'activité physique, le tabac, les infections, etc. 3) un environnement interne comprenant les facteurs biologiques internes, tels que le métabolisme, le microbiome, l'inflammation, le stress oxydatif ou le vieillissement. Par conséquent, cet environnement interne comprend les manifestations biologiques et toxicologiques des expositions dans le corps (Vrijheid, 2014).

De nouveaux outils et de nouvelles technologies ont été développés pour relever les défis de l'exposome. Ils comprennent les technologies de détection des biomarqueurs d'exposition, les applications pour smartphones et les capteurs d'exposition personnels, ainsi que les techniques moléculaires "omiques" à haut débit comme l'exposomique (Siroux *et al.*, 2016). Du point de vue de la santé publique, une meilleure compréhension des facteurs de risque environnementaux devrait ouvrir la voie à de meilleures stratégies de prévention.

L'exposome offre donc un nouveau paradigme passionnant qui permet d'avoir une meilleure compréhension du rôle des facteurs de risque environnementaux dans les maladies et les pathologies chroniques, mais également à avoir de meilleures stratégies de prévention primaire. En revanche, les populations humaines sont rarement exposées à un seul agent dans le temps, il peut y avoir un délai important entre l'exposition et l'apparition de la maladie, et il est souvent impossible d'identifier tous les composés toxiques auxquels une population a pu être exposée (Pollard *et al.*, 2018). Pour cela, il faut considérer avec attention les molécules biologiquement actives dans « l'environnement chimique interne » telles que les xénobiotiques et leurs métabolites. Le profilage des xénobiotiques dans les matrices humaines, en mode non ciblé, suscite un intérêt croissant pour l'étude de l'exposome humain.

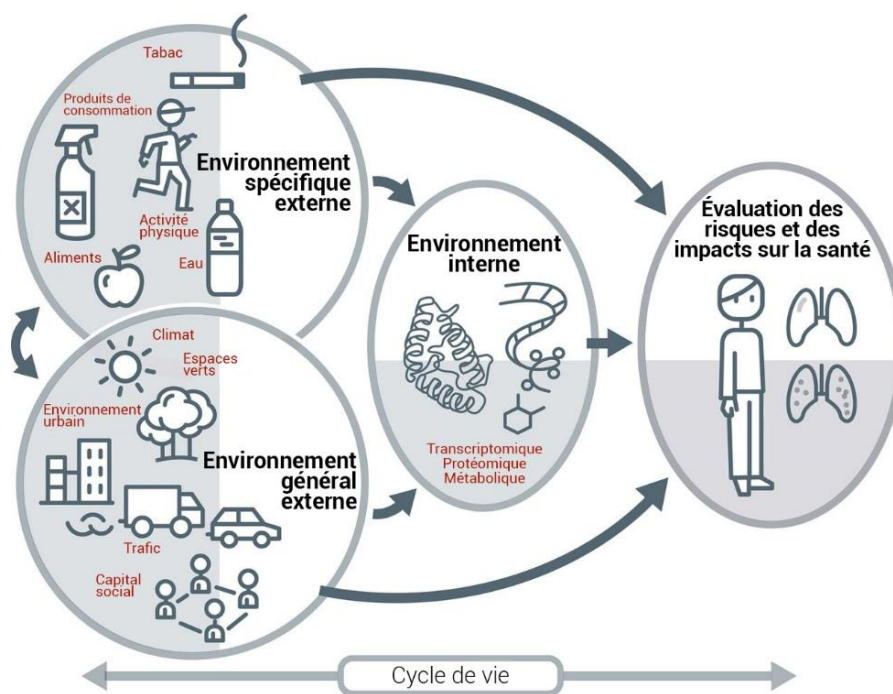


Figure 1.1 L'exposome humain adapté de (Vrijheid, 2014)

1.1 Les xénobiotiques

Les xénobiotiques ont été définis comme étant des produits chimiques auxquels un organisme est exposé et qui sont extrinsèques au métabolisme normal de cet organisme (Croom, 2012). Ils peuvent être des substances d'origine humaine comprenant les médicaments, les pesticides, les produits de soins personnels et différents contaminants environnementaux, tels que les plastifiants et les antioxydants synthétiques. Ils peuvent aussi être des métabolites secondaires de plantes, tels que les polyphénols, les alcaloïdes et les acides aminés non protéiques (Croom, 2012; Pollard *et al.*, 2018).

Les xénobiotiques peuvent pénétrer dans l'environnement par le biais de l'élimination des déchets provenant des usines, des hôpitaux et des ménages, ainsi que par l'excrétion humaine et animale (Matich *et al.*, 2019). L'utilisation massive de ces composés par l'homme, associée à leur élimination inefficace par les stations d'épuration et à leur dégradation lente dans l'environnement, entraîne l'afflux d'une infinité de contaminants. Une fois libérés dans l'environnement, ils peuvent subir divers processus de transformation, une dégradation biotique et abiotique, ou persister en tant que composé parent dans l'environnement (Byrns, 2001).

L'exposition aux xénobiotiques peut se produire par inhalation (poumons), ingestion (tube digestif), adsorption (peau, muqueuse) et même par injection (muscle/circulation) (Pollard *et al.*, 2018). En raison de la variété des xénobiotiques que l'on trouve dans l'environnement, il est impératif de comprendre leurs effets potentiels sur les humains, les organismes aquatiques, animaux et plantes.

Dans ce travail, le métabolisme de trois familles de xénobiotiques a été étudié : les plastifiants (chapitres II et III), les antioxydants synthétiques (chapitres IV et V) et les métabolites secondaires de plante (chapitre V).

1.1.1 Les plastifiants

Les contaminants émergents, tels que les plastifiants, sont devenus des produits chimiques préoccupants en raison de leur utilisation accrue et de leurs effets indésirables potentiels dans les systèmes biologiques, même à de faibles concentrations. Ils sont définis comme des substances incorporées dans un matériau pour en augmenter la flexibilité ou la maniabilité. Ils peuvent également être utilisés pour réduire la viscosité, abaisser la température de la transition du second ordre ou diminuer le module d'élasticité du produit (Cadogan et Howick, 2000).

La liste des plastifiants disponibles commerciaux, impliqués dans la fabrication des polymères, est très longue (140 000 nouveaux produits chimiques inventés depuis 1950) (Eales *et al.*, 2022). La production de plastifiants est en augmentation et devrait atteindre environ 10 millions de tonnes en 2024 (Figure 1.2) (Muobom *et al.*, 2020).

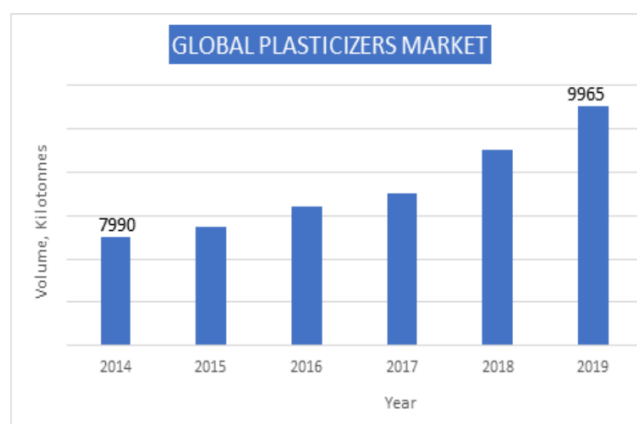


Figure 1.2 Le marché mondial des plastifiants de 2014 à 2020 (Muobom *et al.*, 2020)

Le bisphénol (BPA) (Figure 1.3) est un plastifiant très présent dans l'environnement. Sa production mondiale est estimée à 10 millions de tonnes avec une croissance annuelle moyenne est de 4,8 %. (Matuszczak *et al.*, 2019). Le BPA est utilisé comme monomère dans la production des plastiques polycarbonates et des résines époxydes

ainsi que dans de nombreux produits de consommation, notamment les emballages alimentaires, le revêtement des boîtes de conserve, les conduites d'eau, les mastics dentaires, les lunettes, les jouets, les équipements médicaux et l'électronique (Rocheater, 2013; Vandenberg *et al.*, 2007). En tant qu'additif, l'une de ses principales utilisations est le papier thermique où il est utilisé comme "révélateur", déclenchant l'apparition de couleurs dans le papier des tickets de caisse lorsqu'il est exposé à la chaleur (Castro *et al.*, 2019).

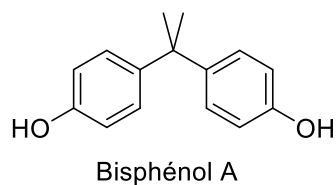


Figure 1.3 Structure chimique de bisphénol A (BPA)

Le BPA a été synthétisé pour la première fois en 1891 (Crump *et al.*, 2021). Dans les années 1930, le BPA était utilisé comme un contraceptif œstrogénique dont l'efficacité a été démontrée en 1936 (Figure 1.4) (Dodds et Lawson, 1936). En 1940, les effets néfastes du BPA sur la santé ont commencé à être étudiés. À ce même moment, l'industrie chimique a commencé à utiliser le BPA dans la fabrication d'un plastique dur (polycarbonate), ainsi que des résines époxy durables. Ainsi, il s'est répandu dans divers produits de plastique de tous les jours, comme les bouteilles d'eau et la vaisselle. Il s'est également introduit dans les emballages alimentaires, le revêtement intérieur des boîtes de conserve ainsi que dans certains mastics dentaires (Timms *et al.*, 2005).

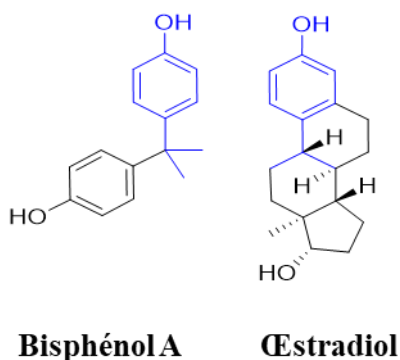


Figure 1.4 Ressemblance structurale entre le bisphénol A et l'œstradiol (en bleu les parties similaires entre les deux molécules)

Suite à l'augmentation de son utilisation et de son exposition par ingestion directe, inhalation et voie cutanée, le BPA peut induire des effets néfastes sur la santé humaine. Celui-ci est un polluant environnemental omniprésent dont l'existence dans diverses matrices environnementales a été confirmée (Chen *et al.*, 2016). L'enquête effectuée en 2012 et 2013 par santé Canada a montré que 90 % des Canadiens ont une dose détectable de BPA dans leur urine d'une moyenne de 1.1µg/l. Il a été prouvé que le BPA est un perturbateur endocrinien et un xœstrogène (Vandenberg *et al.*, 2007). Il affecte non seulement le système œstrogénique, mais aussi androgène de la prolactine, de l'insuline et des hormones thyroïdiennes (Michałowicz, 2014). En effet, il a été montré que le BPA peut traverser le placenta et présente un risque pour le développement du fœtus (Nachman *et al.*, 2014). Il peut également réduire la sécrétion basale de la testostérone et entraîner une puberté précoce (Matuszczak *et al.*, 2019). Récemment, de nombreuses recherches ont montré que le BPA affecte l'équilibre endocrinien et peut contribuer au développement de l'obésité et du diabète (Michałowicz, 2014; Vandenberg *et al.*, 2007). Une autre étude, menée par (Li *et al.*, 2013a) a mis en évidence une relation dose-réponse entre l'augmentation du taux de BPA urinaires chez les filles âgées de 9 à 12 ans et l'augmentation de leur poids corporel. Ils ont conclu que le BPA peut être proposé comme un nouvel obésogène

environnemental, contribuant à l'épidémie mondiale d'obésité (Li *et al.*, 2013a). Il peut également perturber le fonctionnement du système cardiovasculaire. Une association entre les concentrations urinaires de BPA et le développement des maladies artérielles périphériques et l'hypertension a été observée (Michałowicz, 2014). *In vitro*, le BPA cause un stress oxydatif entraînant des dommages aux hépatocytes (Hassan *et al.*, 2012) et il peut être toxique pour les cellules du système nerveux (Lee *et al.*, 2008).

Compte tenu de l'exposition récurrente et des nombreuses utilisations du BPA, celui-ci a commencé à susciter l'inquiétude des scientifiques, des agences gouvernementales, des groupes environnementaux et des médias. Les dangers associés à l'exposition humaine au BPA ont conduit à des réglementations sur sa production et son utilisation en Amérique du Nord et dans l'Union européenne (UE). La première législation visant à réglementer le BPA n'est apparue qu'en 2008, lorsque le Canada est devenu le premier pays au monde à interdire l'utilisation du BPA dans les biberons, suivi par l'UE et les États-Unis en 2011 et 2013 respectivement (Kubwabo *et al.*, 2009; National Institute of Environmental Health Sciences, 2010). La France est le seul pays au monde à demander spécifiquement l'interdiction du BPA dans les revêtements des boîtes de conserve (European Commission, 2011).

À ce jour, il n'existe pas de lois strictes pour réglementer toutes les utilisations du BPA et sa production dans le monde. Il n'existe que des projets de lois ou de réglementation tels que l'obligation pour les fabricants de déclarer les emballages alimentaires contenant du BPA dans une base de données accessible au public. De plus, les taxes sur les emballages en plastique sont entrées en vigueur le 1^{er} avril 2022 en Grande-Bretagne (Zhang, 2022). Récemment, le 15 décembre 2021, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a publié son projet d'avis scientifique sur le bisphénol A après une récente réévaluation. Elle a proposé d'abaisser considérablement la dose journalière tolérable, actuellement de 4 µg/kg/jour, à 0,04 ng/kg/jour (Zhang, 2022).

Les mesures réglementaires concernant le BPA, ainsi que l'évolution des consommateurs et du marché vers des produits "sans BPA", ont entraîné une

augmentation de l'utilisation des substitués du BPA. Plus de 343 analogues du BPA et des alternatives fonctionnelles ont déjà été synthétisés, dont 73 étaient très structurellement similaires au BPA (Rogers, 2021). Les analogues du BPA partagent la structure de base du bisphénol, à savoir deux cycles benzéniques séparés par une courte chaîne carbonée ou autre chaîne chimique. La Figure 1.5 présente des analogues de BPA qui sont les plus répandus. Le tableau 1.1 montre les applications dans lesquelles ces analogues commencent à remplacer le BPA ainsi que leurs effets étudiés *in vitro* et *in vivo*.

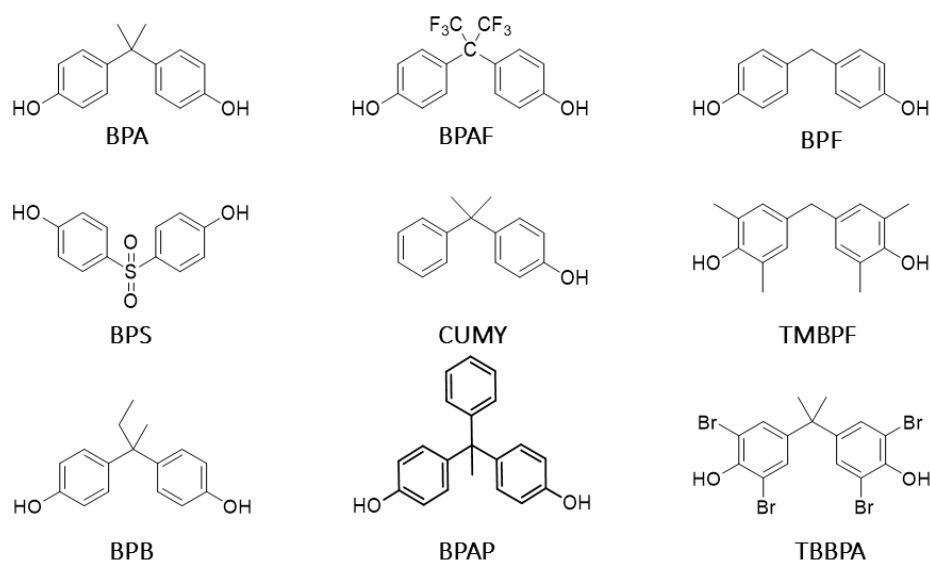


Figure 1.5 Structures chimiques de plusieurs analogues de bisphénol A (BPA) : bisphénol AF (BPAF), bisphénol F (BPF), bisphénol S (BPS), cumylphénol (CUMY), tétraméthylbisphénol F (TMBPF), bisphénol B (BPB), bisphénol AP (BPAP) et tétrabromobisphénol A (TBBPA)

Les données disponibles à ce jour sur les niveaux d'exposition humaine aux analogues de BPA, bien qu'elles soient cohérentes avec celles du BPA, sont beaucoup plus limitées, ce qui rend la comparaison des données sur les dangers et l'exposition très compliquée. Plusieurs études ont comparé le BPA à ses analogues et ont montré

qu'ils ont une activité similaire ou supérieure à celle du BPA (Crump *et al.*, 2021; Serra *et al.*, 2019). Cependant, il n'existe actuellement aucune exigence pour évaluer les propriétés endocriniennes des produits chimiques industriels tels que le BPA et ses analogues. Il y a de plus en plus d'études qui sont menées pour déterminer les effets toxicologiques d'un nombre limité d'alternatives au BPA. Ceci est particulièrement important pour éviter que l'industrie n'investisse dans des substituts dangereux et permettra de prévenir les conséquences sur la santé humaine et environnementale.

L'exposition aux différents bisphénols est particulièrement préoccupante compte tenu des "effets cocktails" additifs potentiels. Ceci soulève d'importantes questions politiques et réglementaires sur l'identification, le contrôle et l'impact des plastiques sur la santé. Elle souligne la nécessité d'approfondir les recherches sur les substances préoccupantes qui entrent dans les productions du plastique (Eales *et al.*, 2022).

Tableau 1.1 Application et effets des analogues de BPA les plus répandus

Analogue	Application	Effet <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	Références
BPF	<ul style="list-style-type: none"> • Laques • Sols industriels • Revêtements des routes et ponts • Plastiques adhésifs • Canalisations d'eau • Mastics dentaires • Prothèses buccales • Emballages alimentaires 	<ul style="list-style-type: none"> • Ruptures des brins d'ADN • Stress oxydatif (système immunitaire) • Diminue le système de défense antioxydant dans le foie des souris nouveau-nées • Perturbe le métabolisme des lipides, du glucose et des acides aminés 	(Cabaton <i>et al.</i> , 2008; Chen <i>et al.</i> , 2016; Rochester et Bolden, 2015)
BPAF	<ul style="list-style-type: none"> • Matière de liaison au caoutchouc • Fluoroélastomères • Monomère (production polycarbonates, polyamides et polyesters) 	<ul style="list-style-type: none"> • Cytotoxique (hépatocytes) • Induit des dommages à l'ADN • Liaison aux récepteurs de l'œstrogène • Perturbe l'équilibre des hormones 	(Crump <i>et al.</i> , 2021; Meng <i>et al.</i> , 2019; Mokra <i>et al.</i> , 2018; Shi <i>et al.</i> , 2015)
BPS	<ul style="list-style-type: none"> • Papier thermique • Colles époxy • Revêtements de boîtes de conserve • Produits de nettoyage 	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbateur endocrinien • Obésogène • Altérations structurelles de l'appareil reproducteur masculin • Diabète 	(Rochester et Bolden, 2015; Skledar <i>et al.</i> , 2016) (Thoene <i>et al.</i> , 2020)
BPB	<ul style="list-style-type: none"> • Emballages alimentaires • Revêtements résineux 	<ul style="list-style-type: none"> • Xénoœstrogène • Altération de la spermatogenèse • Diminue la production de testostérone 	(Serra <i>et al.</i> , 2019)
BPAP	<ul style="list-style-type: none"> • Industrie chimique fine et industrie médicale • Retardateur de flamme • Synthèse des plastiques, des caoutchoucs 	<ul style="list-style-type: none"> • Forte anti-œstrogénicité • Perturbe l'homéostasie du glucose sanguin • Affecte le développement sexuel 	(Zhang <i>et al.</i> , 2013) (Xiao <i>et al.</i> , 2018)
CUMY	<ul style="list-style-type: none"> • Tensioactifs • Antioxydants • Fongicides • Encres d'imprimerie • Résines phénoliques 	<ul style="list-style-type: none"> • Néphrotoxique • Xénoœstrogène 	(Chaudhuri et Sharma, 1991; Hasegawa <i>et al.</i> , 2016; Terasaki <i>et al.</i> , 2005)
TMBPF	<ul style="list-style-type: none"> • Retardateur de flamme • Antioxydant (composés de caoutchouc) • Revêtement des conteneurs métalliques <p>Polycarbonates, esters de phosphate et esters cyaniques</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Antagoniste des récepteurs d'androgènes • Xénoœstrogène 	(ANSES, 2017; Soto <i>et al.</i> , 2017; Vinggaard <i>et al.</i> , 2008)
TBBPA	<ul style="list-style-type: none"> • Retardateur de flamme • Composant réactif des polymères • Résines époxy • Cartes de circuits imprimés 	<ul style="list-style-type: none"> • Peut interférer avec les œstrogènes et les androgènes • Imité l'hormone thyroïdienne • Supprime les réponses immunitaires 	(McCormick <i>et al.</i> , 2010; Pullen <i>et al.</i> , 2003; Shaw, 2010)

1.1.2 Les additifs alimentaires

Un additif alimentaire est défini comme une substance ou un mélange de substances autres que l'aliment de base qui est présent dans une denrée alimentaire afin de conserver certaines propriétés organoleptiques ou de prolonger la durée de conservation. Il peut être ajouté lors de la fabrication, de la transformation, de la préparation, du traitement, du conditionnement et du transport (Carocho *et al.*, 2014). La consommation globale d'additifs alimentaires est de 139 livres/an/personne (Güngörmüş et Kılıç, 2012). Les additifs alimentaires peuvent être divisés en six catégories : les conservateurs, les additifs aromatiques, les agents colorants, les additifs nutritionnels, les agents texturisant et les additifs divers (Figure 1.6) (Carocho et Ferreira, 2013; Güngörmüş et Kılıç, 2012).

Les antioxydants sont un sous-groupe des agents conservateurs qui attire de plus en plus l'attention vu leur utilisation répandue. Ils sont utilisés pour prolonger la durée de conservation et empêcher la décomposition, sans ajouter de goût ou d'odeur aux aliments ni en modifier l'apparence (Viana da Silva *et al.*, 2021). La peroxydation des lipides et la rancidification sont les types d'oxydation les plus courants qui se produisent dans les denrées alimentaires pendant leur stockage (Carocho et Ferreira, 2013).

Les antioxydants chimiques les plus couramment ajoutés aux aliments pour inhiber la peroxydation des lipides et le rancissement sont l'hydroxytoluène butylé (BHT, E321 ; dose journalière admissible) DJA 0.05 mg/kg), l'hydroxyanisole butylé (BHA, E320 ; DJA 0,5 mg/kg), propylgallate (PG, E310 ; DJA 1,4 mg/kg), l'éthoxyquine (EQ, E324 ; DJA 0,005 mg/kg) et la tert-butylhydroquinone (TBHQ, E319 ; DJA 0,7 mg/kg de poids corporel) (Figure 1.7) (Carocho *et al.*, 2014).

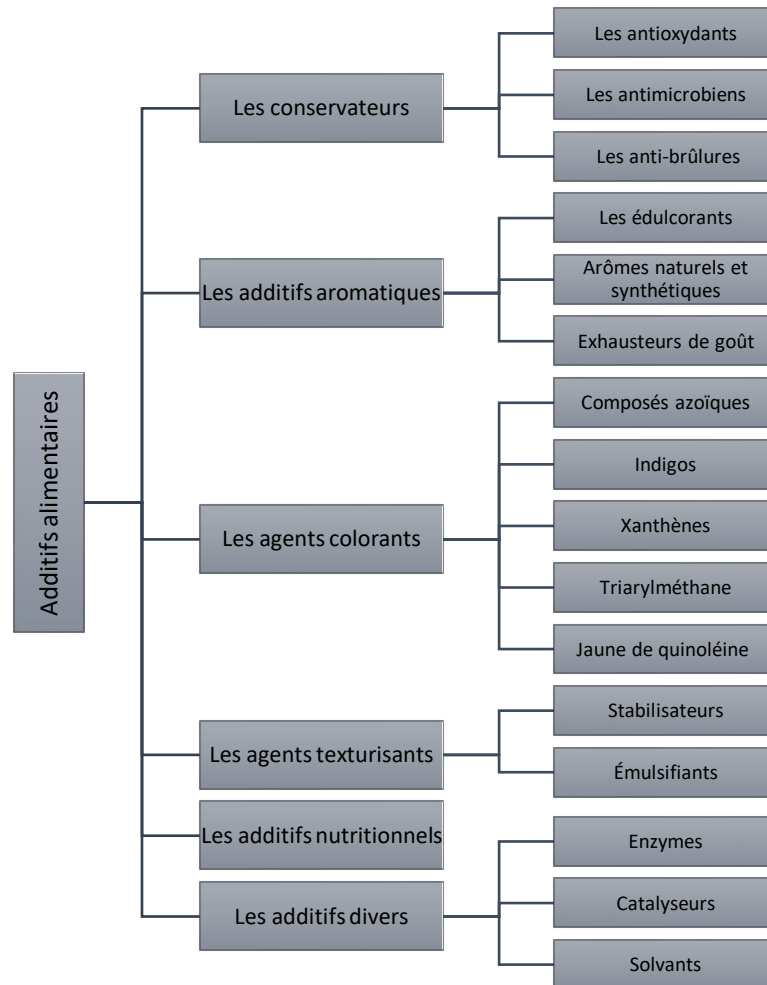


Figure 1.6 Les catégories des additifs alimentaires (Carocho et Ferreira, 2013)

1.1.2.1 Les antioxydants synthétiques

Le BHT est l'antioxydant phénolique synthétique le plus fréquemment utilisé dans le monde. Il est ajouté non seulement aux aliments, mais aussi aux produits pharmaceutiques et cosmétiques. Il est notamment utilisé comme additif dans le caoutchouc, les plastiques, les huiles minérales et les encres d'imprimerie (Lanigan et Yamarik, 2002).

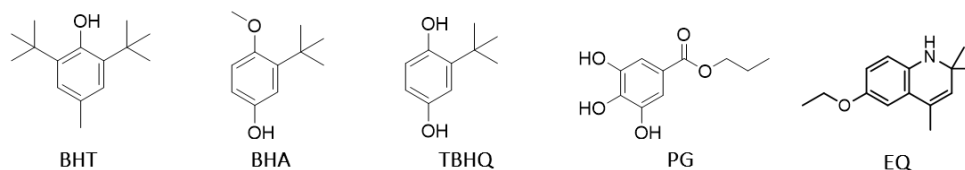


Figure 1.7 Structures chimiques des antioxydants les plus utilisés en industrie

Tous les antioxydants ont une fonction similaire, qui consiste à prévenir les dommages causés par les radicaux libres. Le BHT et le BHA sont des phénols encombrés dont le noyau phénolique contient des groupes t-butyle, qui sont extrêmement efficaces comme antioxydants primaires (Figure 1.7). Ces antioxydants donnent de l'hydrogène aux radicaux libres formés pendant l'oxydation et deviennent eux-mêmes des radicaux.

Il existe près de six mille publications traitant exclusivement des propriétés antioxydantes du BHT et de ses dérivés. Les effets de BHT sur les animaux ont été largement étudiés, mais restent controversés. D'une part, des études ont montré que de fortes doses de BHT produisent une nécrose centrolobulaire et des hémorragies dans le foie et qu'il est un hépatocarcinogène chez le rat ou la souris (Conning et Phillips, 1986; Powell *et al.*, 1986). D'autre part, des effets bénéfiques de BHT ont été décrits dans la littérature tels que son effet inhibiteur de la carcinogénèse chimique dans divers organes lorsqu'il est administré avant ou en même temps qu'un agent cancérigène chez

les rats F344 ou les souris B6C3F1 (Fujisawa *et al.*, 2004); ou son effet inactivateur puissant de virus à enveloppe lipidique (Thompson *et al.*, 1987).

Malgré le grand nombre d'études décrivant les effets controversés du BHT et de ses analogues sur des modèles animaux *in vitro* et *in vivo*, seules quelques-unes ont décrit les effets de ces antioxydants synthétiques chez l'homme. Le BHT et le BHA sont interdits au Japon depuis 1958 et font l'objet de restrictions d'utilisation dans les préparations pour nourrissons au Royaume-Uni (Suh *et al.*, 2005). Cependant, le BHT, le BHA et le TBHQ sont actuellement autorisés au Canada, aux États-Unis, en Corée et dans certains pays de l'Union européenne (Nieva-Echevarría *et al.*, 2015; Suh *et al.*, 2005). Ils sont considérés comme "généralement reconnus comme sûrs" par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis et comme sûrs dans les cosmétiques par le groupe d'experts du Cosmetic Ingredient Review (CIR) (Lanigan et Yamarik, 2002; Nieva-Echevarría *et al.*, 2015; Tortosa *et al.*, 2020), tandis que le Centre international de recherche sur le cancer classe le BHT comme non cancérigène (sur la base de preuves limitées), le BHA comme raisonnablement susceptible d'être cancérigène pour l'homme et le TBHQ comme non cancérigène (Ito *et al.*, 1985; Suh *et al.*, 2005). En raison de l'ampleur de la consommation, il est nécessaire d'évaluer les implications pour la santé des consommateurs de la présence d'additifs alimentaires et notamment les antioxydants nouvellement synthétisés avant de commencer la production, conformément aux directives acceptées par la FDA, l'Environmental Protection Agency (EPA) des États-Unis et l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) (Vaistij *et al.*, 2009).

1.1.2.2 Les antioxydants naturels

De nos jours, les consommateurs privilégient la sécurité alimentaire à la qualité des aliments. Cette prise de conscience des consommateurs à l'égard de la sécurité alimentaire a maintenant incité les industries à remplacer les antioxydants chimiques par des antioxydants naturels dans les produits alimentaires transformés (Khan et Ahmad, 2020). Ces antioxydants naturels sont principalement des polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanines et lignanes), des caroténoïdes (xanthophylles et carotènes) et des vitamines (vitamines E et C) (Xu *et al.*, 2017). En général, ces antioxydants naturels, en particulier les polyphénols et les caroténoïdes, présentent un large éventail d'effets biologiques, tels que des effets anti-inflammatoires, antibactériens, antiviraux, anti-âge et anticancéreux (Khan et Ahmad, 2020; Khanam et Prakash, 2021; Mitterer-daltoé, 2021). Ils peuvent être un substitut durable aux conservateurs chimiques dans une variété de produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques afin de réduire les risques chimiques sur la santé humaine.

De plus, de nombreux produits cosmétiques commercialisés de nos jours contiennent souvent des antioxydants comme ingrédients actifs. Les formulations cosmétiques contiennent généralement diverses combinaisons de nombreux extraits de plantes, par exemple, le thé vert, le romarin, les pépins de raisin, le basilic, la myrtille et la tomate (Kusumawati et Indrayanto, 2013). L'activité antioxydante des extraits de plantes riches en composés phénoliques a été démontrée. Cette activité a été attribuée à la structure chimique de ces composés, qui leur confère la capacité d'interférer dans différentes phases du mécanisme d'oxydation (de Lima Cherubim *et al.*, 2020). Par exemple, la consommation de thé vert présente de nombreux avantages pour la santé. Ils sont principalement attribués à ces principaux composés bioactifs de type flavone-3-ol (des polyphénols tels que épigallocatechine gallate (EGCG) et ses analogues) (Sugimoto *et al.*, 2021). Les catéchines du thé vert sont des antioxydants naturels,

connus pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé, et sont également utilisées comme additifs alimentaires ou dans des produits de soins personnels (Negri *et al.*, 2018). Ces polyphénols ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leurs nombreux effets bénéfiques (effets antioxydants, antimicrobiens, antiviraux et antifongiques, ainsi que des effets anticancers) (Park *et al.*, 2021; Velayutham *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Les relations structure-activité des polyphénols du thé sur la chimioprévention du cancer ont été étudiées (Du *et al.*, 2012), indiquant que la partie galloyle est une caractéristique structurale spécifique pour les propriétés chimiopréventives (Sicard *et al.*, 2021). Malgré tous ces avantages, l'utilisation des catéchines en tant qu'antioxydants naturels et agents thérapeutiques fait face à plusieurs défis, dont une faible biodisponibilité et une dégradation rapide (Secretan *et al.*, 2021). Les polyphénols consommés dans l'alimentation ou dans les produits de soins personnels peuvent présenter des problèmes de stabilité et une activité antioxydante plus faible, et doivent donc être ajoutés en plus grandes quantités. Cependant, les effets délétères qui pourraient être liés à leur consommation à des concentrations très élevées sont encore mal connus.

Les données disponibles sur la biotransformation des catéchines du thé sont limitées et les études se sont principalement concentrées sur l'EGCG ou certains de ses analogues (Lambert *et al.*, 2007). Malgré les nombreux effets bénéfiques des catéchines de thé vert (Crespy *et al.*, 2004; Maeda-Yamamoto *et al.*, 2011) le mécanisme moléculaire d'action de ces molécules n'a pas été étudié de manière approfondie. Dans le chapitre V, le métabolisme *in vitro* de l'épigallocatechine gallate et sept de ses analogues sera étudié en détail.

1.2 Métabolisme et biotransformation des xénobiotiques

Sans le métabolisme, de nombreux xénobiotiques atteindraient des concentrations élevées, augmentant ainsi le risque de toxicité. La plupart des activités métaboliques à l'intérieur de la cellule nécessitent de l'énergie, des cofacteurs et des enzymes. Les enzymes qui métabolisent les xénobiotiques peuvent être divisées en enzymes de phase I, II et de transport (Figure 1.8). Les xénobiotiques sont souvent métabolisés par les enzymes de phase I, qui ont pour fonction de rendre les xénobiotiques plus polaires et de fournir des sites pour les réactions de conjugaison. Les enzymes de phase II sont des enzymes de conjugaison et peuvent interagir directement avec les xénobiotiques, mais elles interagissent plus souvent avec les métabolites produits par les enzymes de phase I. Ces métabolites dont la polarité a été augmentée en général sont éliminés par transport passif et actif (Croom, 2012).

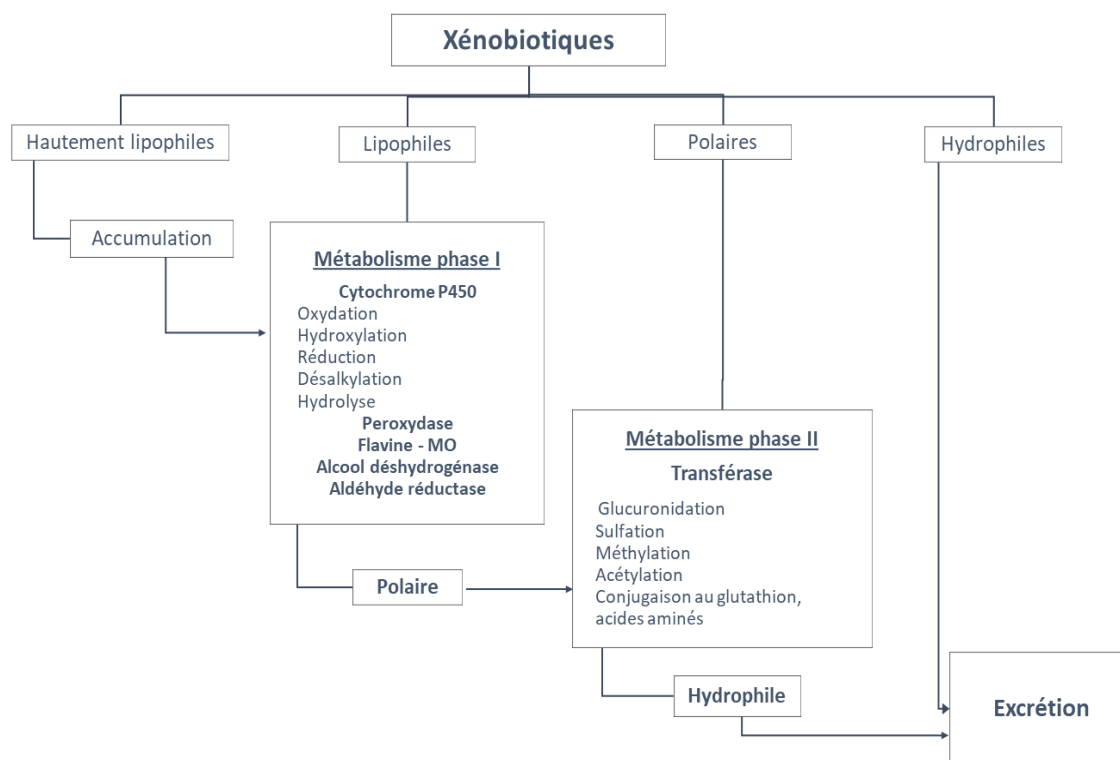


Figure 1.8 Processus de biotransformation des xénobiotiques (Croom, 2012)

1.2.1 Réactions de phase I

1.2.1.1 Réactions d'oxydation

L'oxydation est la réaction de biotransformation la plus courante qui se produit avec la plupart des xénobiotiques. Il existe plusieurs classes d'enzymes qui réalisent cette réaction : les cytochromes P450 (CYP450), les flavines monooxygénases, les monoamines oxydases, la xanthine oxydase, les aldéhydes oxydases, les aldéhydes déshydrogénases et les peroxydases (Testa et Krämer, 2008). Les réactions typiques d'oxydation de CYP450 et des sous-structures de substrat pour chacune de ces classes d'enzymes sont décrites dans la Figure 1.9.

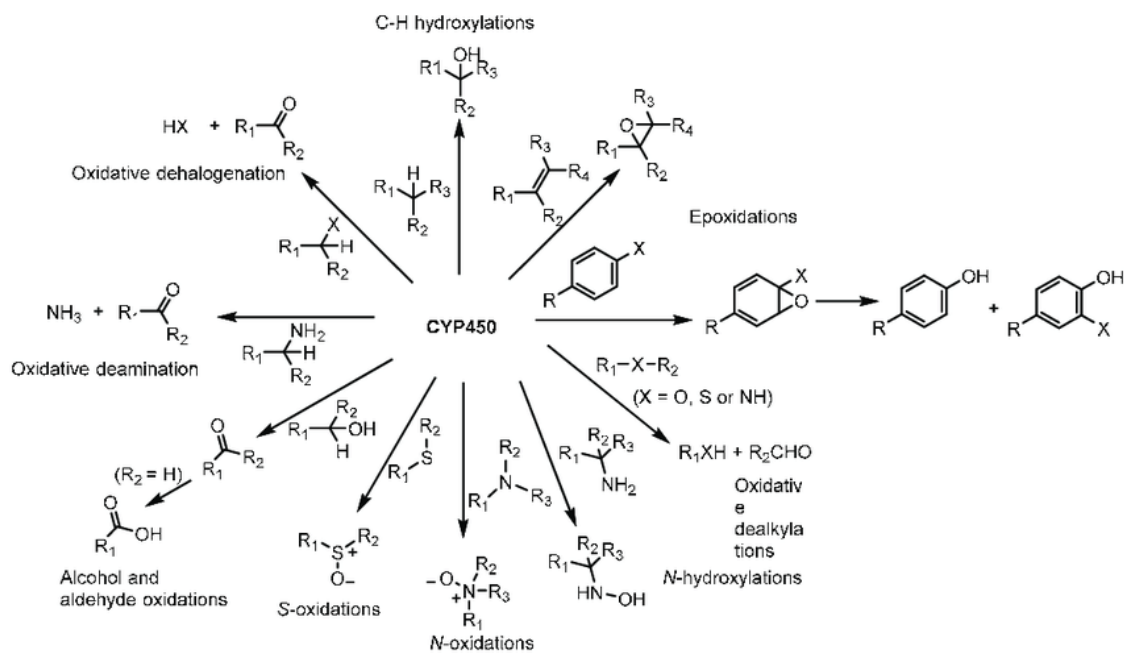


Figure 1.9 Principales voies de réaction d'oxydation catalysées par les enzymes CYP450 (Zucca *et al.*, 2016)

1.2.1.2 Réactions de réduction

La biotransformation réductrice des xénobiotiques (un exemple est présenté à la figure 1.10) est l'une des réactions les moins étudiées. Certaines des enzymes qui catalysent les réactions réductrices sont les cytochromes P450, les molybdènes réductases, les alcools déshydrogénases, les carbonyles réductases, la NADPH-cytochrome P450

réductase, les NADPH - quinone oxydoréductases et les enzymes de la microflore intestinale (Rosemond *et al.*, 2004).

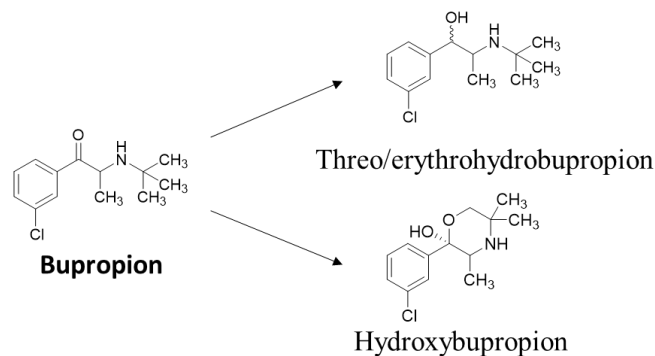


Figure 1.10 Principales voies de biotransformation du bupropion : réduction carbonylée en érythrohydrobupropion et en thréohydrobupropion et hydroxylation en hydroxybupropion. Adaptée de (Skarydova *et al.*, 2013).

1.2.1.3 Réactions d'hydrolyse

L'hydrolyse des époxydes, des esters, des amides et des structures apparentées est une importante réaction de biotransformation dépendamment de leur susceptibilité à l'hydrolyse (Tableau 1.2) (Jakoby, 2012). Les époxydes hydrolases et les estérases sont des membres de la famille des enzymes α/β hydrolases (Morisseau et Hammock, 2005 ; Satoh et Hosokawa, 2006). Par exemple, le groupe acétyle de l'aspirine est rapidement hydrolysé par des estérases après l'ingestion orale pour former de l'acide salicylique dans l'organisme (Figure 1.11) (Bojić *et al.*, 2015). Dans quelques cas, les réactions hydrolytiques peuvent générer une structure toxique.

Tableau 1.2 Susceptibilité à l'hydrolyse de différents électrophiles (Lee et Zhu, 2011)

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_2-\text{C}-\text{R}_1 \end{array}$	R ₁	R ₂	Nom	Susceptibilité à l'hydrolyse
	C	O	Ester	Forte ↓ Faible
C	S	Thioester		
O	O	Carbonate		
C	N	Amide		
O	N	Carbamate		
N	N	Ureide		

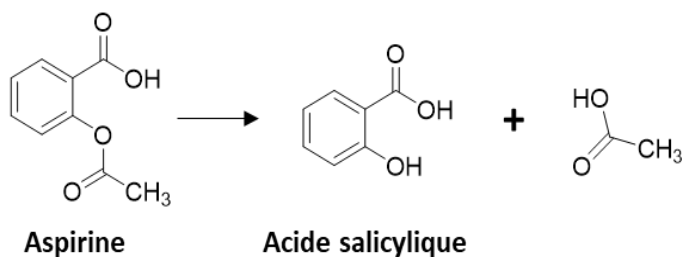


Figure 1.11 La réaction d'hydrolyse de l'aspirine

1.2.2 Réactions de phase II

1.2.2.1 Réactions de glucuronidation

La glucuronidation est la principale réaction de conjugaison des xénobiotiques chez l'humain et la plupart des autres espèces de mammifères. Les réactions sont catalysées par une grande famille d'Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférases (UDP-glucuronosyl transférases, UGT) microsomales qui sont liées à la membrane nucléaire. Elles utilisent l'uridine 5'-diphosphate acide glucuronique (UDPGA) comme cofacteur permettant un déplacement du carbone anomérique de l'acide glucuronique par des groupes nucléophiles sur les structures des xénobiotiques (Figure 1.12) (Jančová et Šiller, 2012). Il peut se lier à un O, N, S et parfois des atomes de carbone pour donner des β -glucuronides (Guillemette, 2003 ; Wells *et al.*, 2004).

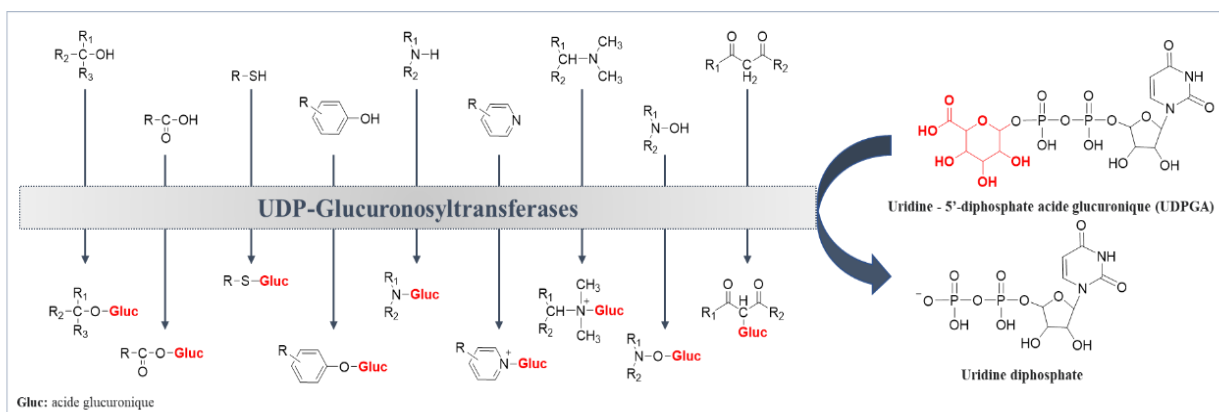


Figure 1.12 Formation des conjuguées glucuroniques

1.2.2.2 Réactions de sulfatation

La sulfatation est la deuxième biotransformation de conjugation la plus courante pour les xénobiotiques chez l'homme. Les réactions sont catalysées par une famille de sulfotransférases (SULT), dont certaines sont liées à la membrane et d'autres sont cytosoliques (Gamage *et al.*, 2006). Les réactions impliquent une réaction de substitution nucléaire des groupes nucléophiles du substrat avec le groupement sulfate anhydride réactif du cofacteur 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) (Figure 1.13). Les substrats pour les enzymes membranaires sont les groupes hydroxyles ou des groupes amines sur les protéines (par exemple, le groupe phénolique de la tyrosine), des glycoprotéines et des glycolipides. En revanche, la plupart des xénobiotiques sont sulfatés par les formes cytosoliques de la SULT. Les sous-structures de substrat pour ces SULT cytosoliques sont les groupements hydroxyles sur les alcools et sur les hydroxylamines et les hydroxyamides, ainsi que les azotes des amines et de certains amides (Jančová et Šiller, 2012). Au pH physiologique, les sulfates formés sont essentiellement ionisés.

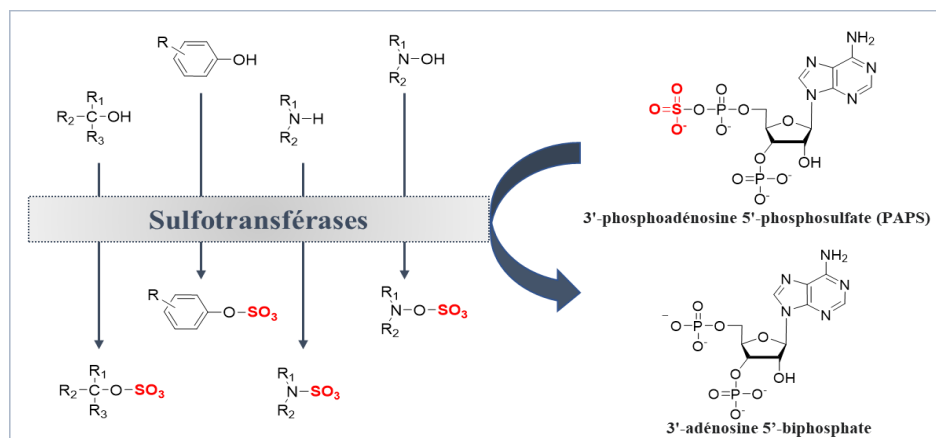


Figure 1.13 La formation des conjugués sulfatés catalysée par des sulfotransférases

1.2.2.3 Réaction d'acétylation

Les amines primaires et les hydrazines sont acétylées par des *N*-acétyltransférases (NAT) cytosoliques polymorphes qui utilisent l'acétyl-Coenzyme A comme cofacteur (Sim *et al.*, 2008). Certains xénobiotiques à base d'acide carboxylique acyilent les acides aminés par la formation d'intermédiaires d'adénosine 5'-monophosphate (AMP) qui forment ensuite des intermédiaires d'acyl CoA qui réagissent avec les *N*-acyltransférases des acides aminés pour donner des amides (Testa et Krämer, 2008). Les réactions d'acétylation des arylamines, des arylhydrazines et des acides *N*-hydroxamique sont présentées dans la Figure 1.14.

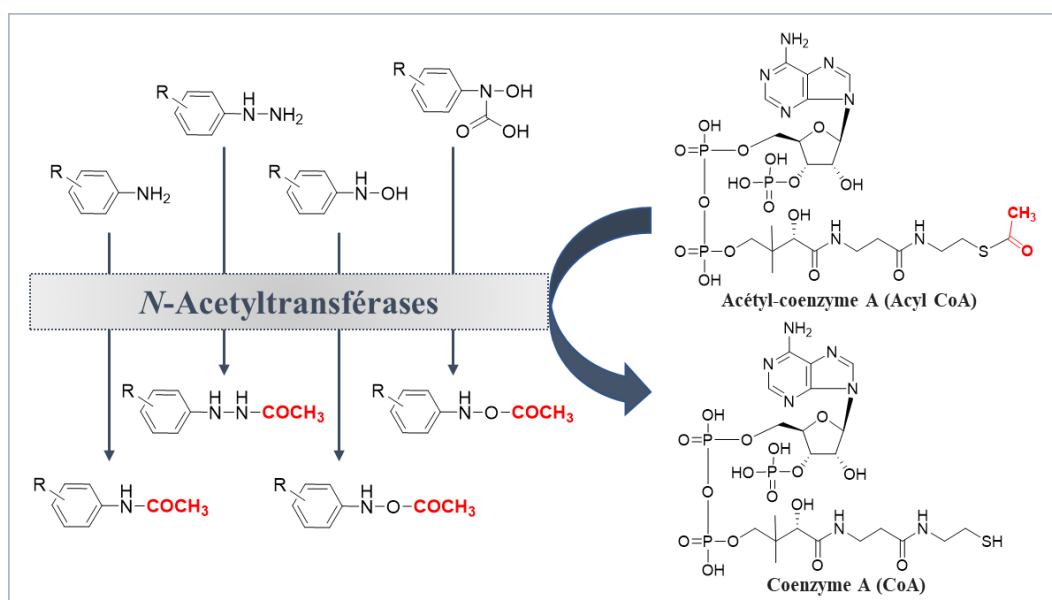


Figure 1.14 Réactions d'acétylation catalysées par les *N*-acétyltransférases

1.2.2.4 Réactions de méthylation

Les réactions de méthylation sont importantes en raison des polymorphismes génétiques des enzymes qui les catalysent. Toutes les enzymes méthyltransférases utilisent la *S*-adénylméthionine (SAM) comme cofacteur donneur de méthyle. Un groupe nucléophile (O, S, N) sur le substrat effectue un déplacement nucléophile sur le

groupe méthylsulfonium de la SAM (Figure 1.15) (Jančová et Šiller, 2012). Les xénobiotiques qui contiennent des catéchols sont méthylés par une catéchol-*O*-méthyltransférase (COMT) cytosolique dont l'activité nécessite du magnésium (Weinshilboum et Wang, 2006). Les xénobiotiques qui contiennent des fragments thiol sont méthylés soit par la thiol méthyltransférase (TMT), localisée dans le réticulum endoplasmique, soit par la thiopurine méthyltransférase (TPMT), une enzyme cytosolique (Testa et Krämer, 2008). Seuls quelques xénobiotiques sont *N*-méthylés par les enzymes cytosoliques *N*-méthyltransférases.

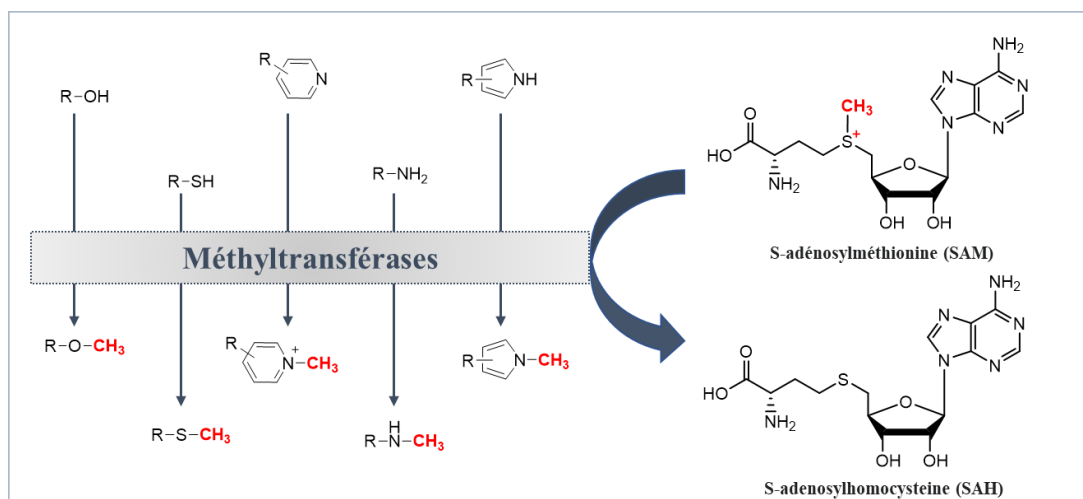


Figure 1.15 Réactions de méthylation catalysées par les méthyltransférases

1.2.2.5 Réaction de conjugaisons avec le glutathion

Le glutathion (GSH) (Figure 1.16) est un tripeptide inhabituel, γ -glutamyl-cystéinyl-glycine, qui n'est pas hydrolysé par les peptidases normales en raison de sa liaison γ -glutamyl. Son groupe cystéinylthiol nucléophile est impliqué dans un certain nombre de réactions avec des électrophiles.

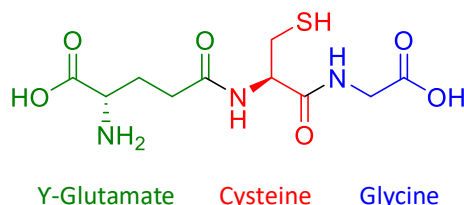


Figure 1.16 Structure chimique du glutathion

Le GSH est présent à des concentrations élevées dans la plupart des cellules, et il peut réagir de manière non enzymatique avec des électrophiles très réactifs. Toutefois, la réactivité de son groupement thiol est considérablement accrue par les glutathion-S-transférases (GST) qui catalysent la plupart des réactions du GSH avec des sous-structures électrophiles de xénobiotiques et/ou de métabolites (Hayes *et al.*, 2005; Testa et Krämer, 2008). Les sous-structures des substrats comprennent les époxydes, les énones/énals et les systèmes conjugués au niveau des atomes de carbone saturés et insaturés qui ont de forts groupes attracteurs d'électrons attachés, et au niveau des hétéroatomes qui ont des groupements partants attachés aux xénobiotiques (Figure 1.17).

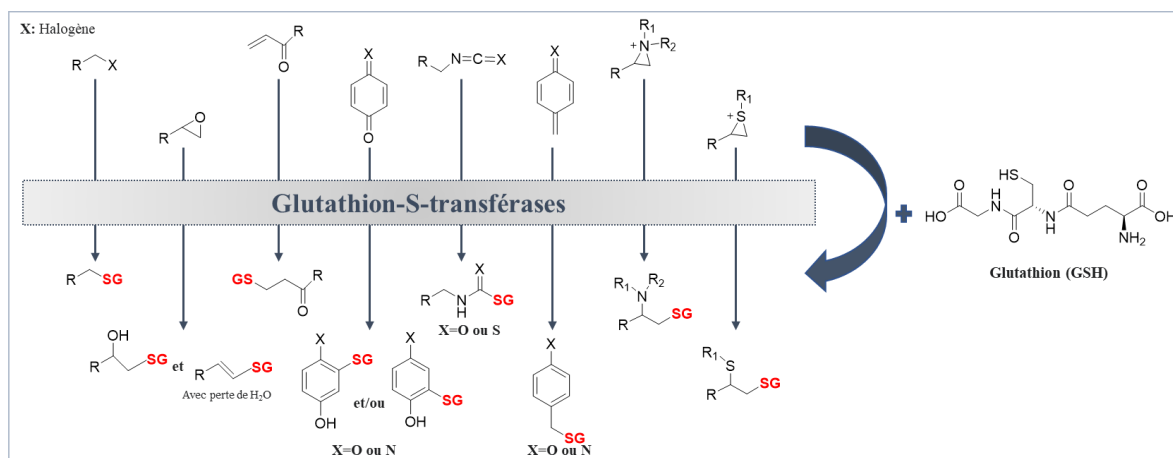


Figure 1.17 Réactions de conjugaison au GSH catalysées par les glutathion-S-transférases

Les thioéthers de glutathion, formés dans l'organisme, ne sont pas directement excrétés. Ils peuvent aussi être transformés en acides mercapturiques excrétables. Ces derniers sont des thioéthers dérivés de la *N*-acétyl-*L*-cystéine dont la formation est initiée par la conjugaison du xénobiotique ou d'un métabolite électrophile avec le glutathion (Figure 1.18). Le transfert du glutamate est ensuite effectué par la γ -glutamyl transpeptidase, une enzyme reconnaissant spécifiquement les peptides γ -glutamyl et qui se trouve en forte concentration dans le rein et d'autres organes excréteurs (Jančová et Šiller, 2012; Vrbanac et Slauter, 2017). Les dipeptidases catalysent la perte de glycine du S-conjugué intermédiaire de cystéinylglycine pour donner le S-conjugué de cystéine. Lors de l'étape finale de la formation de l'acide mercapturique, celui-ci est *N*-acétylé par une *N*-acétyltransférase spécifique au conjugué de la cystéine et en utilisant l'acétyl coenzyme A comme cofacteur. Les acides mercapturiques formés sont facilement excrétés dans l'urine par des mécanismes de transports actifs dans le rein (Hanna et Anders, 2019).

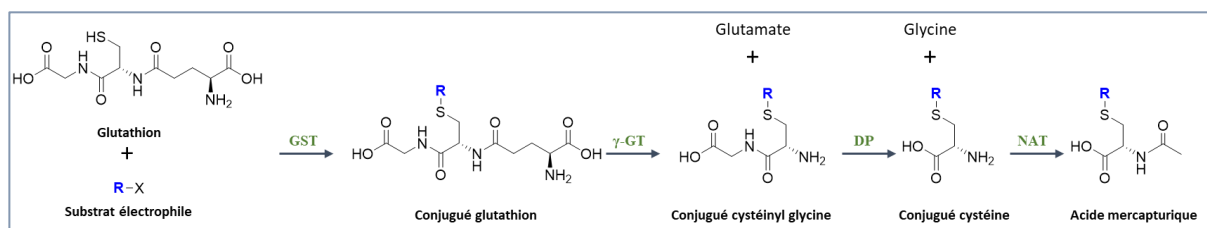


Figure 1.18 Formation enzymatique d'acide mercapturique issu du métabolisme d'un composé glutathionylé. La glutathion S-transférase (GST) catalyse la conjugaison entre le glutathion et divers composés électrophiles endogènes ou xénobiotiques. Ensuite, le conjugué glutathion résultant est décomposé en un conjugué de cystéine par la glutamyltranspeptidase (γ -GT) et les dipeptidases (DP). Enfin, la *N*-acétyltransférase (NAT) catalyse la formation de l'acide mercapturique à partir du conjugué de cystéine.

1.3 Métabolites réactifs

Le métabolisme des xénobiotiques est généralement considéré comme étant un processus de détoxification. Cependant, dans certains cas, la biotransformation des xénobiotiques peut entraîner la formation d'intermédiaires réactifs qui peuvent causer des effets néfastes. Ces effets toxiques sont déclenchés par la liaison covalente aux macromolécules dans les organismes par biotransformation enzymatique. Ce processus est appelé bioactivation (Figure 1.19) (Kalgutkar et Soglia, 2005). Dans le cas de nombreux produits chimiques, les métabolites réactifs formés au cours de la bioactivation peuvent être détoxifiés efficacement. Ainsi, les effets toxiques ne se produisent que lorsque l'équilibre entre la production des métabolites réactifs et leur détoxification est rompu (Dekant, 2009). La plupart des métabolites réactifs sont de nature électrophile, instables et difficiles à isoler ou même à détecter (Rousu *et al.*, 2009).

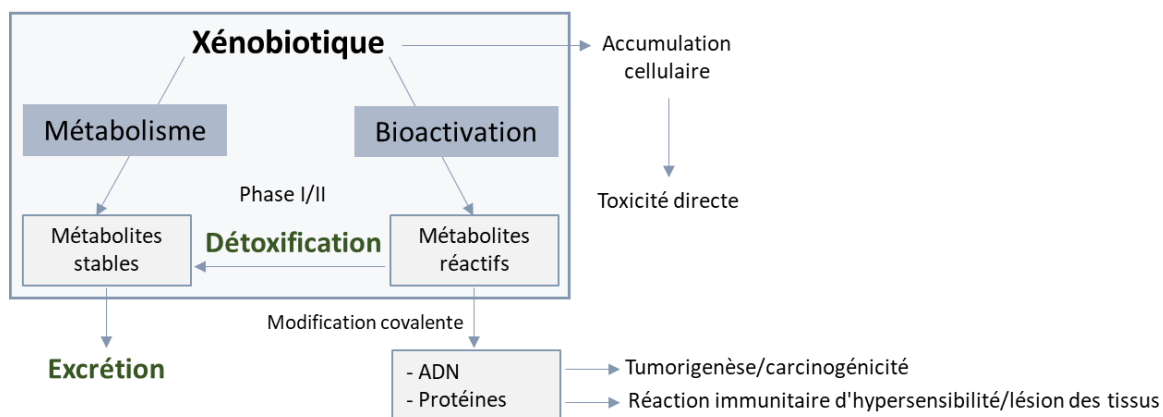


Figure 1.19 Rôle de la bioactivation dans la toxicité des xénobiotiques

Les métabolites électrophiles peuvent réagir avec différents sites nucléophiles dans les cellules qui sont les thiols et les groupements amines des protéines ainsi que les atomes d'oxygène et d'azote présents dans les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN (Jakoby, 2012). Les atomes d'azote provenant de la lysine, l'histidine et la valine ainsi que l'atome de soufre de la cystéine, sont des cibles fréquentes pour les métabolites

électrophiles. Les conséquences de ces modifications peuvent être l'inactivation des enzymes impliquées dans la fonction cellulaire, des changements dans la structure tertiaire des protéines ou des modifications de l'expression génétique (Hinson et Roberts, 1992). Par exemple, l'alkylation des enzymes sulfhydryl-dépendantes de la respiration mitochondriale joue un rôle important dans le déclenchement du dysfonctionnement mitochondrial et des dommages cellulaires. De plus, de nombreuses réactions d'hypersensibilité liées aux médicaments et aux produits chimiques observées en médecine clinique sont basées sur la formation d'adduits protéiques covalents et leur reconnaissance comme "étrangers" par le système immunitaire (Dekant, 2009; Jakoby, 2012).

La réaction des métabolites réactifs avec les constituants de l'ADN entraîne la formation de bases puriques et pyrimidiques altérées ou d'autres lésions de l'ADN telles que des cassures de brins d'ADN ou la perte de bases simples de la double hélice. S'ils surviennent au niveau du gène, ces lésions peuvent se traduire par des mutations (Nagai *et al.*, 1993). Les mutations dans certains gènes sont considérées comme la base de l'évolution des cellules néoplasiques et du cancer et jouant un rôle majeur dans la cancérogenèse chimique. D'autres types de lésions de l'ADN peuvent entraîner l'activation de gènes importants pour la différenciation cellulaire ou d'autres fonctions de régulation. Les radicaux formés comme intermédiaires réactifs peuvent également causer des dommages à l'ADN. Outre les ruptures de brins d'ADN, qui ont été fréquemment observées, la réaction des radicaux dérivés de l'oxygène peut également entraîner l'oxydation des nucléotides puriques et pyrimidiques (Dekant, 2009).

Une question importante en toxicologie est la pertinence des données obtenues avec les animaux de laboratoire pour l'évaluation des risques chez l'homme. Cependant, les données obtenues dans les études animales peuvent être mieux extrapolées au patient en utilisant des études de transition avec des modèles *in vitro* du métabolisme.

1.4 Métabolisme des xénobiotiques *in vitro*

1.4.1 Stratégies expérimentales pour détecter les métabolites *in vitro*

Plusieurs modèles de criblage *in vitro* sont généralement utilisés pour examiner le potentiel de bioactivation des xénobiotiques, comme les hépatocytes primaires ou les fractions du foie, telles que les microsomes, le cytosol ou la fraction S9 (Lee et Zhu, 2011). Habituellement, le tissu hépatique est broyé dans 3-4 volumes de tampon sur glace, puis homogénéisé (Figure 1.20). Une centrifugation de 20 minutes à 1000 g est appliquée à l'homogénat pour éliminer les mitochondries, les noyaux, les lipides et les protéines membranaires. Le surnageant résultant (fraction S9) contient la plupart des enzymes hépatiques solubles, à l'exception de la monoamine-oxydase (MAO), qui réside dans la membrane mitochondriale. La fraction S9 peut ensuite être centrifugée à 105 000 g pendant deux heures pour éliminer les microsomes, qui contiennent les principales enzymes du métabolisme, telles que les CYP, les UGT, certaines GST et les FMO. Ce sont des fractions subcellulaires dérivées du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques et sont préparées par homogénéisation du foie suivie d'une centrifugation différentielle (Asha et Vidyavathi, 2010). Le surnageant de la centrifugation, appelé cytosol, contient les enzymes solubles, dont la SULT, la NAT, certaines GST, l'aldéhyde oxydase (AO) et la xanthine oxydase (XO) (Vrbanac et Slauter, 2017). Les modèles de criblage peuvent être préparés à partir de différentes espèces (humaine, rat, chien, singe, souris, lapin, etc.) et de différents organes (foie, reins, intestin, poumon, etc.). De récentes directives réglementaires du Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) recommande l'utilisation de microsomes hépatiques humains ou d'hépatocytes primaires, car ils sont plus proches des conditions humaines *in vivo*, pour l'évaluation du potentiel d'interaction entre les xénobiotiques (Food and Drug Administration, 2006 ; Grimm et al., 2009). Le tableau 1.3 présente les avantages et les inconvénients de différents modèles de criblage *in vitro* les plus utilisés (Asha et Vidyavathi, 2010; Lee et Zhu, 2011; Vrbanac et Slauter, 2017; Wrighton *et al.*, 1995).

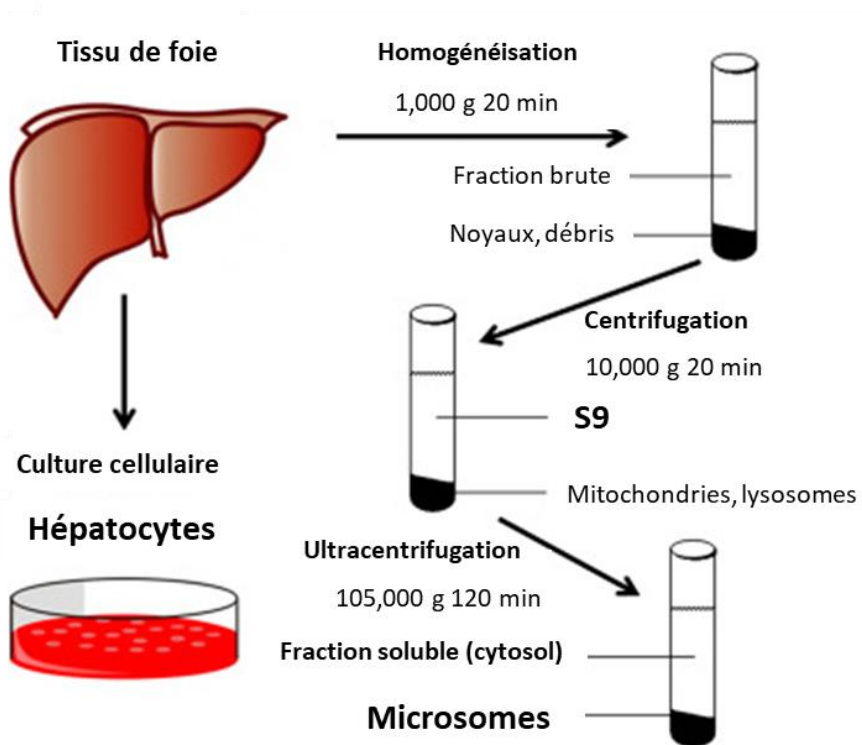


Figure 1.20 Préparation des fractions microsomales, S9 et cytosoliques. Adaptée de (Vrbanac et Slauter, 2017)

L'utilisation des microsomes de foie humain (HLM) avec les cofacteurs nécessaires et parmi les méthodes les plus adéquates pour l'analyse des xénobiotiques *in vitro*. Le choix de cofacteurs déterminera le type de réaction à étudier et personnalisera les expériences (voir les différents cofacteurs utilisés pour tous les types de réactions de biotransformation des xénobiotiques dans la section I.2). Les études *in vitro* peuvent identifier les métabolites, les voies métaboliques spécifiques à l'espèce et le modèle animal expérimental qui reflète le mieux l'exposition potentielle de l'homme au xénobiotique et à ses métabolites. Ces informations peuvent également être utiles à la conception des études cliniques en identifiant les métabolites potentiels formés chez l'humain, les enzymes responsables de la clairance métabolique du xénobiotique, les effets de la génétique et d'autres facteurs de l'hôte sur le métabolisme du xénobiotique ainsi que sur les interactions potentielles.

Tableau 1.3 Les modèles de criblage des métabolites *in vitro*

Modèles <i>in vitro</i>		Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
Hépatocytes		<ul style="list-style-type: none"> Cellules isolées du foie de différents organismes Contiennent des enzymes de phase I et II 	<ul style="list-style-type: none"> Fonctionne d'une façon similaire au foie Des méthodes standardisées d'isolation Disponible commercialement 	<ul style="list-style-type: none"> Activité enzymatique diminue au cours de vie des cellules et des cultures Difficile à obtenir Nécessite des techniques et des procédures laborieuses Variabilité phénotypique élevée
Fractions hépatiques	Microsome de foie	<ul style="list-style-type: none"> Vésicules de 20 à 200 nm de diamètre provenant du réticulum endoplasmique obtenu par centrifugation de cellules homogénéisées 	<ul style="list-style-type: none"> Peu coûteux et faciles à manipuler Pas de culture cellulaire Couvrent les principales enzymes du métabolisme Contiennent des enzymes CYP concentrées Stockage facile Spécifiques à une espèce Utilisés pour étudier les différences entre les espèces 	<ul style="list-style-type: none"> Addition nécessaire des cofacteurs Représentation incomplète de la situation <i>in vivo</i> due à l'absence des enzymes telles que les SULT Modèle délicat
	Cytosol	<ul style="list-style-type: none"> Contient des enzymes cytosoliques solubles, telles que la SULT, NAT, FMO, certaines GST, l'aldéhyde oxydase (AO) et la xanthine oxydase (XO) 	<ul style="list-style-type: none"> Identifie si des enzymes autres que le CYP et UGT sont impliquées dans certaines voies métaboliques Complète les études microsomaux 	<ul style="list-style-type: none"> Addition nécessaire des cofacteurs Représentation incomplète de la situation <i>in vivo</i> (absence de certaines enzymes importantes telles que les CYP et les UGT)
	Fraction S9	<ul style="list-style-type: none"> Utilisée depuis les années 1970 Combinaison de fractions microsomaux et cytosoliques. 	<ul style="list-style-type: none"> Étudie d'autres réactions non médiées par les CYP telles que la sulfatation et l'acétylation. Moins chère et plus facile à manipuler que les hépatocytes primaires 	<ul style="list-style-type: none"> Moins concentrées que les microsomes Grande quantité de S9 (5 fois plus) est utilisée par rapport aux microsomes pour obtenir une activité similaire, ce qui peut entraîner une liaison protéique plus élevée du composé à tester.
Les enzymes exprimées		<ul style="list-style-type: none"> Introduites à la fin des années 1980 Des enzymes purifiées ne contiennent qu'une seule isozyme L'ensemble des isozymes CYP clonées ou exprimées Disponibles commercialement, sous le nom « Supersomess » de BD Gentest (Woburn, MA). 	<ul style="list-style-type: none"> Pourraient partager un ensemble de substrats communs contrairement aux tests d'inhibition du CYP dans les microsomes Surveillent l'effet inhibiteur d'un xénobiotique sur une isozyme spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> Coûteuses Surprédiction et variation entre les différentes enzymes exprimées Liaison à des protéines différente de l'incubation microsomale Un métabolite généré par une CYP peut être un inhibiteur d'une autre CYP Toutes les coenzymes, telles que la P450 NADPH oxydoréductase (OR) et le cytochrome b5, ne sont pas exprimées dans chacune des enzymes exprimées

1.4.2 Les agents de piégeages

La formation des adduits covalents entre les métabolites réactifs et les petites molécules nucléophiles peut être utilisée pour obtenir des informations sur la formation et la nature des métabolites réactifs (Fiser *et al.*, 2013). En raison de leur réactivité et de leur instabilité intrinsèque, les métabolites réactifs peuvent être facilement piégés avec un nucléophile approprié pour former des adduits stables. Le glutathion (GSH) (Figure 1.16) est l'agent de piégeage chimique *in vitro* le plus utilisé pour la caractérisation et l'étude mécanistique des métabolites réactifs (Gan *et al.*, 2005). La formation d'adduits GSH *in vivo* est généralement considérée comme un mécanisme de détoxification et facilite leur excrétion. Cependant, en cas d'une exposition importante aux xénobiotiques, les réserves cellulaires de GSH sont épuisées, les macromolécules biologiques sont soumises à des liaisons covalentes avec des électrophiles réactifs, ce qui entraîne des problèmes de toxicité (Rousu *et al.*, 2009).

Les adduits du GSH subissent une série de biotransformations *in vivo* pour donner naissance à des adduits de la *N*-acétyl-*L*-cystéine (NAC) (adduits de l'acide mercapturique) (Figure 1.18). NAC peut être utilisée comme agent de piégeage *in vitro* pour le dépistage des métabolites réactifs. Les adduits résultants peuvent être utilisés comme standards pour les adduits NAC *in vivo*. Le principal avantage de l'utilisation de la NAC par rapport au GSH est que les adduits NAC peuvent avoir le potentiel de générer plus de fragments issus des clivages de la fraction du xénobiotique que ceux des adduits du GSH. Ils fournissent ainsi des informations essentielles sur les structures des métabolites réactifs (Lee et Zhu, 2011).

1.4.3 Alertes structurelles des xénobiotiques

Les enzymes métabolisant les xénobiotiques sont impliquées dans la biotransformation d'un large éventail de composés structurellement diversifiés. Ces enzymes ne peuvent toutefois pas faire la distinction entre les molécules qui sont converties en métabolites réactifs et celles qui ne le sont pas. En outre, la probabilité d'une bioactivation avec un

composé donné dépend de plusieurs facteurs tels que (1) la présence d'un ou de plusieurs groupements fonctionnels (appelés alertes structurelles ou toxicophores) et/ou d'une architecture chimique susceptible d'être bioactivée, (2) la présence d'autres points faibles métaboliques dans la molécule qui entrent en compétition avec la bioactivation, et (3) la détoxification du métabolite réactif et/ou de son précurseur par les enzymes de métabolisme (Lee et Zhu, 2011). Il existe de nombreux exemples de médicaments qui ont dû être retirés, en raison d'une toxicité inacceptable, au cours des essais cliniques et même après leur mise sur le marché. De tels échecs coûtent très cher, c'est pour cette raison que les industries pharmaceutiques ont introduit les tests de toxicité, ainsi que les études ADME (absorption, distribution, métabolisme, excrétion), plus tôt dans le processus de développement des médicaments (Stepan *et al.*, 2011). Stepan *et al.*, ont examiné 68 médicaments (rappelés ou associés à un avertissement de toxicité) et 200 médicaments (prescription et ventes) les plus utilisés aux États-Unis en 2009 pour étudier leurs caractéristiques physicochimiques, leurs doses quotidiennes, la présence d'alertes structurelles, les preuves de la formation de métabolites réactifs ainsi que leur(s) mécanisme(s) de toxicité potentielle. Collectivement, leur analyse a révélé qu'une proportion significative (~78-86%) de ces médicaments associés à la toxicité contenait des alertes structurelles. De plus, ils ont montré que la formation de métabolites réactifs issue de 62-69% de ces molécules causait la toxicité. La Figure 1.21 présente une liste des groupements fonctionnels bioactivables les plus couramment rencontrés et leurs métabolites réactifs correspondants.

La présence d'alertes structurelles dans un composé peut être examinée par une inspection visuelle de la structure chimique ou par l'utilisation d'un logiciel tel que TOPKAT, CASE, DEREK, HazardExpert, OncoLogic ou COMPACT (Dearden, 2003). Les prédictions sont largement basées sur les occurrences de toxicophores dans les xénobiotiques associés à une toxicité et pour lesquels la formation de métabolites réactifs a été observée dans des systèmes *in vitro* et *in vivo*.

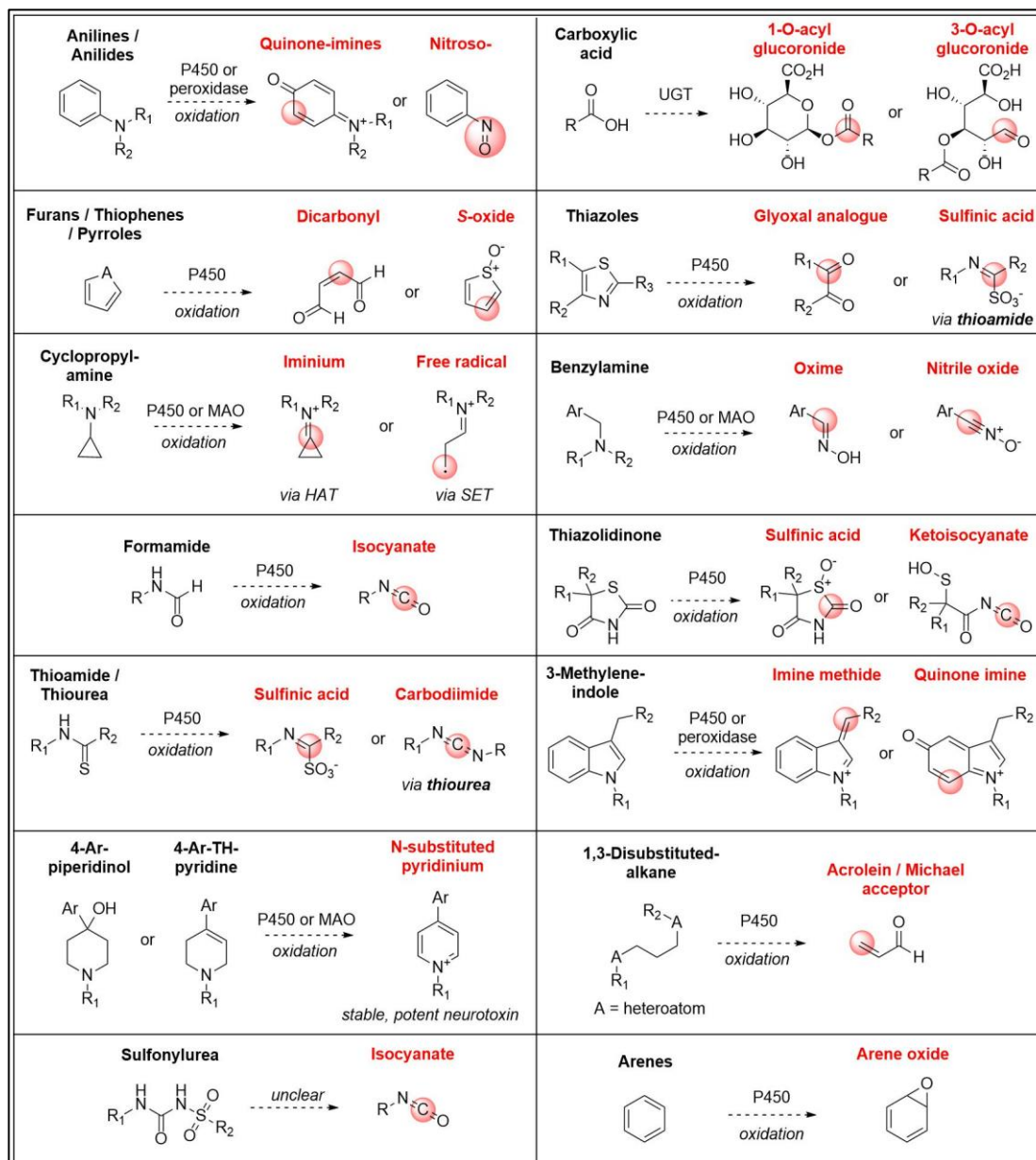


Figure 1.21. Liste des groupements fonctionnels bioactivables les plus courants et leurs métabolites réactifs correspondants (www.drughunter.com, 2022)

1.5 Le rôle de l'analyse par spectrométrie de masse une étude de métabolisme

Étant donné les faibles niveaux d'exposition quotidienne à un cocktail de xénobiotiques, leur détection, leur caractérisation structurale et l'analyse quantitative de leurs métabolites dans des matrices biologiques complexes constituent souvent un défi. Par conséquent, la méthodologie analytique employée pour les études du métabolisme des xénobiotiques menées *in vitro* ou *in vivo* doit répondre à des exigences strictes en termes de sensibilité et de spécificité de la détection. À cet égard, la spectrométrie de masse, qui a toujours été une technique d'analyse importante dans les études du métabolisme des xénobiotiques, est rapidement devenue la technologie dominante dans ce domaine après l'introduction des premiers systèmes commerciaux au début des années 1990 (Lee et Zhu, 2011). La spectrométrie de masse est souvent couplée avec une séparation chromatographique, possède une sensibilité élevée et offre la possibilité d'analyser des mélanges complexes (Li *et al.*, 2012). Plusieurs approches ont été appliquées à l'analyse des xénobiotiques et de leurs métabolites, comme le dosage radio-immunologique, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) et la chromatographie liquide (LC) avec détection UV, fluorescence, radioactivité et spectrométrie de masse (Kostiainen *et al.*, 2003). Or, pour analyser des métabolites stables et réactifs, des techniques sensibles et à haute résolution sont nécessaires. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem à haute résolution (LC-HRMS/MS) est la méthode de choix pour la détection, la caractérisation et la quantification de petites molécules organiques dans des échantillons biologiques complexes (Jhajra *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2006; Pleil et Isaacs, 2016). Elle permettra l'élucidation structurale et la caractérisation des xénobiotiques et leurs métabolites, notamment les métabolites réactifs (Ma et Zhu, 2009).

1.5.1 L'instrumentation de la spectrométrie de masse

Au cours de la dernière décennie, des progrès remarquables ont été réalisés dans la conception des sources et des méthodes d'ionisation, la sensibilité des analyseurs de

masse, l'efficacité des méthodes de fragmentation, la rapidité des détecteurs avec une large gamme dynamique, et la puissance des systèmes d'acquisition et de traitement des données avec des logiciels experts conçus spécifiquement pour les études sur le métabolisme des xénobiotiques. La Figure 1.22 présente les principales composantes d'un spectromètre de masse.

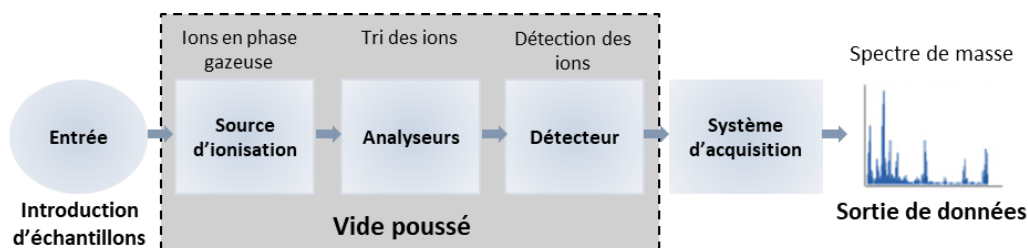


Figure 1.22 Composants d'un spectromètre de masse

En premier lieu, dans un spectromètre de masse, des ions sont produits à partir de l'échantillon dans la source d'ionisation. Ces derniers sont par la suite séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) dans l'analyseur de masse. Ensuite, ils sont fragmentés dans la cellule de collisions et les fragments sont analysés dans un second analyseur. Les ions sortant du dernier analyseur sont détectés et leur abondance est mesurée grâce au détecteur qui convertit les ions en signaux électriques. Finalement, les signaux du détecteur sont transmis à l'ordinateur pour être traités. Ce dernier affiche les signaux graphiquement sous la forme d'un spectre de masse montrant l'abondance relative des signaux en fonction de leur rapport m/z (De Hoffmann et Stroobant, 2007).

1.5.1.1 L'ionisation par électronébulisation

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui peut fournir des informations à la fois qualitatives (structure) et quantitatives (masse ou concentration moléculaire) sur les molécules d'analyte après leur conversion en ions. Les molécules d'intérêt sont d'abord introduites dans la source d'ionisation du spectromètre de masse, où elles sont d'abord ionisées pour acquérir des charges positives ou négatives. L'ionisation par électronébulisation (ou électrospray, ESI) est une technique d'ionisation douce largement utilisée pour la production d'ions en phase gazeuse (sans

fragmentation) de petites et grandes molécules thermiquement labiles de diverses polarités dans un mélange complexe d'échantillons biologiques (Banerjee et Mazumdar, 2012). L'ESI-MS repose sur la production d'ions (parfois à charge multiple) dont les valeurs m/z peuvent être analysées sur pratiquement tous les types de spectromètres de masse. Elle a élargi le champ d'application de l'analyse par MS pour inclure non seulement les composés des masses moléculaires élevées tels que les protéines, les nucléotides et les polymères synthétiques, mais aussi les molécules de faible masse moléculaire, comme les xénobiotiques et leurs métabolites (Smyth, 2003).

Depuis l'introduction des techniques ESI, la LC/MS est devenue une méthode idéale et largement utilisée pour l'analyse des métabolites en raison de sa spécificité, de sa sensibilité et de son efficacité supérieure (Dodds *et al.*, 2020; Kostianen *et al.*, 2003). La spectrométrie de masse à ionisation par électrospray est parfaitement adaptée à l'analyse biochimique, car elle permet d'analyser des molécules non volatiles à haut poids moléculaire directement à partir de la phase liquide. L'ESI-MS est beaucoup plus rapide, sensible et précise que les techniques traditionnelles de détermination de la masse des molécules biologiques, comme l'électrophorèse sur gel. En conséquence, cette technique est devenue indispensable et elle est capable d'analyser à la fois les petites et les grosses molécules de diverses polarités dans un échantillon biologique complexe (Cech et Enke, 2001).

Le mécanisme d'ionisation par électrospray est détaillé dans la Figure 1.23. L'ESI-MS utilise une solution diluée de l'analyte qui est pompée à travers un capillaire à un débit très faible. Une haute tension (2 - 5 kV) est appliquée au capillaire. Cette tension peut être négative ou positive, en fonction des analytes choisis. La tension appliquée fournit le gradient de champ électrique nécessaire pour produire une séparation des charges à la surface du liquide. Ainsi, le liquide sort de l'extrémité du capillaire en formant ce qu'on appelle un "cône de Taylor" (Figure 1.23). Grâce à une température élevée de la source ESI et/ou d'un courant de gaz de séchage à l'azote, la taille des gouttelettes chargées est continuellement réduite par évaporation du solvant, ce qui entraîne une augmentation de la densité de la charge de surface et une diminution du rayon des

gouttelettes. Des gouttelettes chargées positivement ou négativement peuvent être produites en fonction de la polarisation capillaire. L'intensité du champ électrique à l'intérieur de la gouttelette chargée atteint un point critique auquel il est cinétiquement et énergétiquement possible pour les ions à la surface des gouttelettes d'être éjectés dans la phase gazeuse. Ces gouttelettes se déplacent dans l'atmosphère vers l'entrée du spectromètre de masse et génèrent des molécules d'analyte chargées (ions) qui sont ensuite accélérées dans l'analyseur de masse pour une analyse ultérieure de la masse moléculaire et une mesure de l'intensité des ions (Cech et Enke, 2001; Ho *et al.*, 2003).

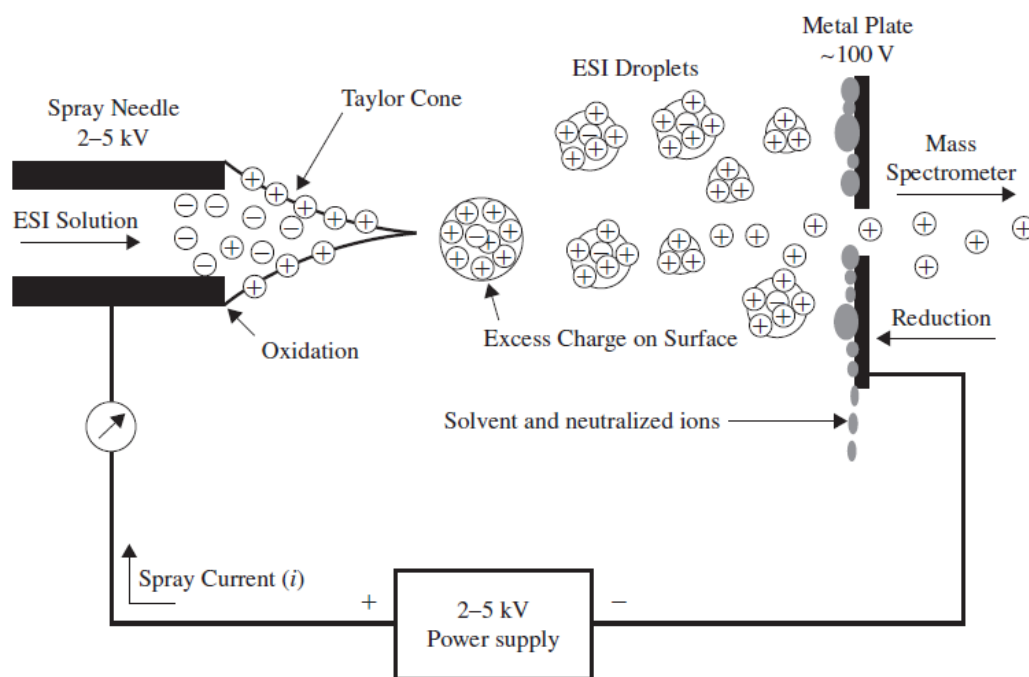


Figure 1.23 Processus d'ionisation par électrospray (ESI) (Cech et Enke, 2001)

1.5.1.2 L'analyseur hybride quadripôle-temps de vol

Une fois les ions générés, ils sont séparés pour établir le spectre de masse. L'une des caractéristiques uniques de la spectrométrie de masse est que l'analyse de masse permettant la séparation des ions en fonction de leurs différents rapports m/z peut être effectuée par différents principes physiques. La spectrométrie de masse en tandem

(MS/MS) est la technique de base pour identifier les métabolites dans les matrices biologiques complexes. Elle utilise deux étapes d'analyse de masse, la première pour présélectionner un ion et la seconde pour analyser les fragments produits, le plus souvent par collision avec un gaz inerte comme l'argon, l'hélium ou l'azote (Ma *et al.*, 2006).

Les quadripôles (Q) et les temps de vol (TOF) sont des systèmes très utilisés, augmentant ainsi leur disponibilité commercialement. En effet, les spectres MS/MS générés par un triple quadripôle (QqQ) souffrent d'une sensibilité relativement faible et d'une résolution limitée, ce qui ne permet pas l'élucidation des structures des métabolites. Le remplacement du dernier quadripôle (Q3) d'un triple quadripôle par un analyseur TOF permet de former un instrument hybride quadripôle-temps de vol (QqTOF) (Figure 1.24). Le QqTOF combine la simplicité et la performance d'un quadripôle pour l'analyse qualitative et quantitative avec la haute efficacité, la résolution améliorée et la capacité à mesurer avec précision les valeurs m/z d'un analyseur TOF (Lacorte et Fernandez-Alba, 2006).

Dans un instrument QqTOF (Figure 1.24), l'échantillon est introduit par l'interface, et les ions sont focalisés dans le premier quadripôle. Ici, l'ion précurseur est sélectionné pour une fragmentation et une analyse ultérieure. Les ions sont éjectés dans la cellule de collision (q), où un gaz inerte est utilisé pour la fragmentation. Les ions sont collectés dans la région TOF où leur direction change de 90° (TOF orthogonal) (Chernushevich *et al.*, 2001). Le but de ce changement de direction est de concentrer optiquement l'énergie cinétique des ions afin qu'elle demeure le plus similaire possible. Les ions sont ensuite accélérés par le propulseur et parcourent environ 1 m dans le tube de vol jusqu'au réflectron. Le but du réflectron est de ralentir les ions de masse égale, mais d'énergie cinétique plus élevée, puis de concentrer ce faisceau d'ions sur le détecteur de sorte que les ions de même masse exacte, mais d'énergie légèrement différente arrivent au détecteur au même moment. Ce processus permet d'obtenir la précision de masse du QqTOF (Ferrer et Thurman, 2003; Lacorte et Fernandez-Alba, 2006). Les spectromètres de masse hybrides QqTOF ont révolutionné le domaine de la

caractérisation structurale des molécules en acquérant des spectres de masse en tandem avec une résolution, une précision de masse et une sensibilité élevées grâce à la détection parallèle de tous les ions.

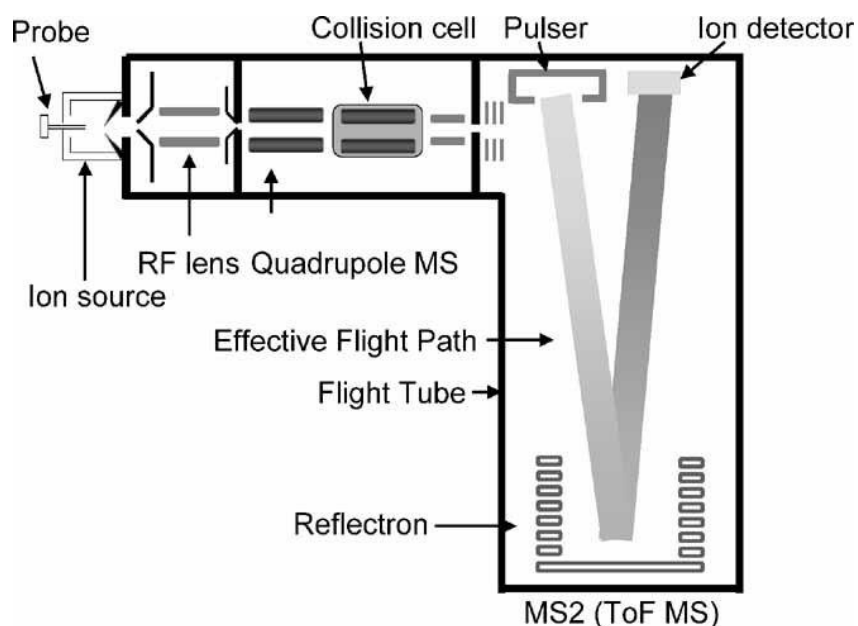


Figure 1.24 Spectromètre de masse QqTOF (Lacorte et Fernandez-Alba, 2006).

Les systèmes QqTOF utilisent souvent, la dissociation induite par collision (CID) comme méthode de fragmentation de choix. Dans la CID, la molécule précurseur excitée cinétiquement entre en collision avec un gaz inerte, communiquant suffisamment d'énergie interne pour provoquer la rupture des liaisons et la formation de l'ion produit (Johnson et Carlson, 2015). Le spectre de fragmentation d'un ion est riche en informations, car il reflète l'énergie relative des liaisons présentes ainsi que la structure de l'ion précurseur et de l'ion produit ce qui est très utile pour l'élucidation structurale des xénobiotiques et de leurs métabolites.

1.5.2 Les techniques de séparation chromatographiques pour le profilage des métabolites

Les xénobiotiques et leurs métabolites possèdent une large gamme de structures chimiques et de propriétés physicochimiques, ce qui rend nécessaire l'utilisation de différentes approches analytiques afin de les séparer et pouvoir les identifier. La GC/MS a été largement utilisée pour la quantification et l'identification de composants à l'état de traces dans des mélanges complexes pour une grande variété de composés. Cependant, en raison du processus laborieux de dérivation de l'analyte lors de la préparation des échantillons et de la décomposition chimique des métabolites labiles de phase II, cette technique n'est pas adéquate pour l'identification des métabolites (Lee et Zhu, 2011). Au cours des deux dernières décennies, la chromatographie liquide ultra-performante (UHPLC) est devenue la méthode privilégiée pour l'étude des métabolites dans les matrices biologiques telles que le plasma, le sérum, l'urine et les homogénats de tissus (Tolonen *et al.*, 2009). Elle est facile à coupler avec l'ESI et utilise généralement la chromatographie en phase inverse (RP) pour séparer les molécules en fonction de leur interaction hydrophobe avec une phase stationnaire solide. Les solvants des phases mobiles couramment utilisés pour la RP-UPLC sont adaptés aux spectromètres de masse. Ils comprennent en général des combinaisons d'eau et de méthanol / acétonitrile avec un acide volatil tels que l'acide formique ou l'acide acétique ou des additives comme l'acétate d'ammonium ou le formate d'ammonium (<10 mM) qui sont souvent ajoutés pour améliorer la forme des pics (Rojo *et al.*, 2012). La chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) est une autre méthode LC qui est de plus en plus utilisée pour les études pharmaceutiques (Hsiao *et al.*, 2018). La HILIC retient les xénobiotiques et les métabolites très polaires et hydrophiles qui éluent parfois avec les interférences de matrice lors de l'utilisation de la RP-UPLC. Cependant, elle n'a pas encore atteint le succès général dont a bénéficié la RP-UPLC (Sun et Walch, 2013).

Les échantillons utilisés pour l'identification des métabolites sont généralement dérivés de milieu d'incubation ou des fluides corporels tels que le plasma, la bile et l'urine. Parfois, des échantillons homogénéisés obtenus à partir de matériels biologiques solides (par exemple, les fèces ou les tissus) sont également utilisés. Le principal défi pour les échantillons est le contenu de la matrice. Généralement, les échantillons bruts sont prétraités avant d'être injectés sur un système LC/MS pour réduire les concentrations des composants de la matrice tels que les sels, les protéines, les lipides, les cofacteurs, les composants cellulaires, etc. Ce prétraitement est nécessaire non seulement pour éviter l'encrassement de la colonne, mais aussi pour améliorer la sélectivité de l'analyse des métabolites des xénobiotiques qui sont généralement à faible concentration (Chambers *et al.*, 2007). La précipitation des protéines par un solvant organique comme le méthanol ou l'acétonitrile, l'extraction en phase solide (SPE) ou l'extraction liquide - liquide (LLE) peuvent être utilisées pour séparer les analytes des interférences résiduelles de la matrice (Chambers *et al.*, 2007).

1.5.3 Stratégies d'identification des métabolites

La première étape du profilage des métabolites consiste à identifier tous les métabolites possibles suivis de leur caractérisation structurale et enfin leur quantification. La méthode classique d'analyse métabolique est le marquage radioactif (^{14}C , ^3H) (Lee et Zhu, 2011). Cette méthode est particulièrement puissante lorsqu'elle est associée à une détection MS. La détection de la radioactivité permet de localiser les métabolites dans un chromatogramme et la MS assure une identification spécifique de la structure des métabolites. Cependant, cette approche présente plusieurs inconvénients. Par exemple, la synthèse et la purification des composés radioactifs sont longues et coûteuses. De plus, les radiations représentent un risque potentiel pour la santé humaine et les exigences relatives à la manipulation des matériaux et des déchets radioactifs rendent l'utilisation de composés radiomarqués très coûteuse et laborieuse (Kostiainen *et al.*, 2003). Pour ces raisons, l'utilisation des techniques basées sur la spectrométrie de masse est plus simple et de plus en plus utilisée pour l'identification des métabolites.

1.5.3.1 La mesure précise de la masse exacte

La masse exacte d'une molécule est l'une des propriétés les plus importantes pour le HRMS. La masse exacte d'un ion de composition isotopique spécifique, qui est calculée en additionnant les masses exactes des atomes qui le composent (Pleil et Isaacs, 2016). Tandis que le terme précision de masse est utilisé pour définir la proximité entre la masse mesurée par le spectromètre de masse et la masse théorique exacte d'un ion (Sleno, 2014). La précision de la masse est généralement exprimée en tant qu'erreur de masse relative en utilisant le rapport de la différence entre les valeurs m/z expérimentales et théoriques sur la valeur m/z théorique d'un ion (Lee et Zhu, 2011). Ce rapport étant toujours une petite valeur fractionnaire, il est généralement exprimé en partie par million (ppm, 10^6). Les mesures de haute précision de masse exacte ne peuvent être réalisées de manière routinière avec des valeurs inférieures à 5 ppm qu'avec les technologies modernes de spectrométrie de masse à haute résolution (Knolhoff *et al.*, 2014).

La mesure précise de la masse exacte des métabolites est essentielle pour déterminer leurs formules empiriques. Par exemple pour le rapport m/z 750,4, il y a 626 formules candidates qui sont à 5 ppm près. La mesure précise de la masse est généralement non ambiguë pour les petites molécules jusqu'à 300 Da, mais nécessite une précision beaucoup plus grande (<1 ppm) pour les moléculaires ayant un poids moléculaire plus élevé (Ma *et al.*, 2006). L'utilisation de mesures de masse précises dans l'identification des métabolites est aussi essentielle pour attribuer des formules empiriques aux ions produits pour l'élucidation de la structure (Li *et al.*, 2012). En utilisant la formule moléculaire du parent, l'analyse de la composition élémentaire des métabolites de ce xénobiotique peut être réduite à un nombre et des types limités d'atomes (Ma *et al.*, 2006).

La plupart des xénobiotiques qui sont analysés, contiennent souvent un niveau plus élevé d'insaturation et incorporent occasionnellement des halogènes. Le tableau 1.4 énumère certains paramètres de base des éléments courants. Le carbone ne contribue pas à la masse fractionnaire (les chiffres après la virgule) d'une molécule. Alors que,

l'hydrogène et l'azote augmentent la masse fractionnaire, et que l'oxygène, les halogènes et le soufre la diminuent. Ainsi, la masse exacte d'une molécule varie en fonction des éléments qui constituent le composé. De plus, la différence entre la masse nominale et la masse exacte d'une molécule est appelée défaut de masse (Tableau 1.4) (Pleil et Isaacs, 2016).

Tableau 1.4 Liste des éléments communs et leurs masses exactes

Élément	Masse nominale	Masse exacte	Défaut de masse
Carbone (¹²C)	12	12.0000	0.0000
Azote (¹⁴N)	14	14.0031	0.0031
Hydrogène (¹H)	1	1.0078	0.0078
Oxygène (¹⁶O)	16	15.9949	-0.0051
Chlore (³⁵Cl)	35	34.9689	-0.0311
Fluor (¹⁹F)	19	18.9984	-0.0016
Soufre (³²S)	32	31.9721	-0.0279

Une raison importante du succès de la méthode de filtration par défaut de masse, indépendamment du changement de masse nominale brut associé à une biotransformation, les défauts de masse des ions des métabolites de phase I et II sont généralement inférieurs à 50 mDa par rapport à ceux du xénobiotique parent à l'exception du glutathion, qui entraîne un changement de +68 mDa du défaut de masse (Tableau 1.5) (Mortishire-Smith *et al.*, 2005).

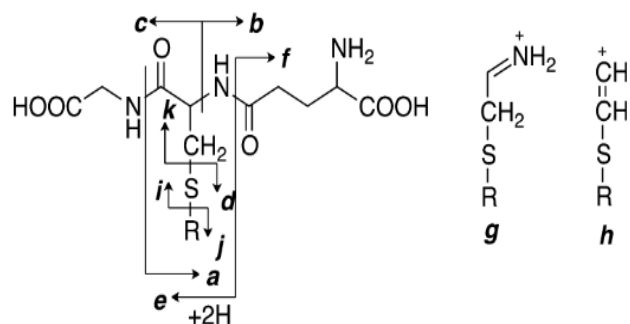
Les recherches ciblées de métabolites tirent avantage du fait que la majorité des métabolites de xénobiotique peuvent être classés comme des réactions prévisibles, c'est-à-dire formées par des réactions de biotransformation communes (Tableau 1.5). Cependant, il existe de nombreux exemples de métabolites importants qui résultent de réactions peu communes et qui ne sont donc pas faciles à prédire a priori tels que des métabolites formés suite à un clivage ou une dimérisation du parent (Zhu *et al.*, 2011). La tâche la plus difficile dans l'identification des métabolites par LC/MS est la détection et l'élucidation structurale de ces métabolites inattendus qui se retrouvent en faible concentration et en présence de grandes quantités d'ions interférents complexes provenant de composants endogènes.

Tableau 1.5 Les biotransformations communes avec leurs compositions élémentaires et défauts de masse exacts correspondants

	Biotransformation	Changement	Exacte masse de changement (u)	Défauts de masse (mu)
Phase I	Désacétylation	-C ₂ H ₂ O	-42.0106	-10.6
	Déshydratation	-H ₂ O	-18.0106	-10.6
	Déméthylation	-CH ₂	-14.0157	-15.7
	Déshydrogénation	-2H	-2.0157	-15.7
	Hydrogénation	+2H	+2.0157	+15.7
	Oxydation	+O	+15.9949	-5.1
	Hydrolyse interne	+H ₂ O	+18.0106	+10.6
Phase II	Méthylation	+CH ₂	+14.0157	+15.7
	Acétylation	+C ₂ H ₂ O	+42.0106	+21.5
	Sulfatation	+SO ₃	+79.9568	-43.2
	Acide mercapturique	+C ₃ H ₇ NO ₃ S	+161.0147	+14.7
	Glucuronidation	+C ₆ H ₈ O ₆	+176.0321	+32.1
	Conjugaison GSH	+C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆ S	+305.0682	+68.2

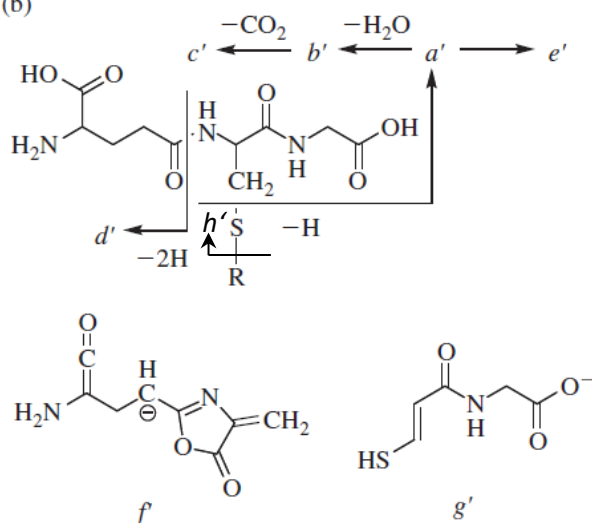
En effet, la détection et l'élucidation des structures des métabolites réactifs des xénobiotiques piégés avec le GSH sont des défis particulièrement intéressants. La fragmentation caractéristique des conjugués du GSH en mode positifs et négatifs a été largement étudiée (Lee et Zhu, 2011; Xie *et al.*, 2013a; Zheng *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007) et elle résulte principalement du clivage du squelette peptidique de la partie GSH (Figure 1.25). Les conjugués du GSH peuvent être détectés par un balayage de perte neutre (NL) constant de 129 Da. L'expérience NL peut être utilisée pour détecter certains adduits GSH peu communs. Cependant, la méthode de balayage NL a une sensibilité et une sélectivité relativement faibles, ce qui entraîne souvent l'apparition de nombreux pics ayant une forte intensité, mais étant des faux positifs. Ceci limite ainsi son utilisation (Zhu *et al.*, 2007). D'autre part, la fragmentation par CID des ions [M-H]⁻ des conjugués GSH donne une série d'ions prééminents à *m/z* 128, 143, 160, 179, 210, 254, 272 et 306. Ceci permet de faciliter la caractérisation des conjugués GSH en mode négatif (Dieckhaus et al., 2005) (Figure 1.25).

(a)



[M+H] ⁺	
Fragment	Description
a	[M+H] ⁺ - 75.0320
b	145.0613
c	[M+H] ⁺ - 146.0691
d	[M+H] ⁺ - 273.0961 or 275.1117
e	[M+H] ⁺ - 129.0426
f	130.0504
g	[M+H] ⁺ - 232.0696
h	[M+H] ⁺ - 249.0955
i	308.0911
j	[M+H] ⁺ - 307.0838/305.0682
k	274.1034

(b)



[M-H] ⁻		
Fragment	Formule neutre	Ion produit (m/z)
a'	C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆	272.0888
b'	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₅	254.0782
c'	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₃	210.0884
d'	C ₅ H ₇ NO ₃	128.0353
e'	C ₅ H ₈ N ₂ O ₃	143.0462
f'	C ₈ H ₈ N ₂ O ₃	179.0462
g'	C ₅ H ₇ NO ₃ S	160.0073
h'	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	306.0765

Figure 1.25 Fragmentation des conjugués GSH dans le mode positif (a) et le mode négatif (b) (Dieckhaus *et al.*, 2005; Lee et Zhu, 2011; Xie *et al.*, 2013a; Zhu *et al.*, 2007)

1.5.3.2 La spectrométrie de masse en tandem à haute résolution et les voies de fragmentation

Les performances des analyseurs de masse sont généralement exprimées en termes de pouvoir de résolution (R) (équation 1) (Pleil et Isaacs, 2016).

La résolution R est donnée par l'équation 1 :

$$R = m/\Delta m \text{ (Équation 1)}$$

Où m est la masse de l'ion et Δm est la différence de masse entre m et la masse suivante la plus élevée (Jhajra *et al.*, 2014)

La spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) a eu un impact considérable dans un certain nombre de domaines analytiques. La plupart des applications utilisent la précision robuste des instruments modernes pour effectuer des recherches non supervisées des ions présents dans un échantillon donné. (Zhu *et al.*, 2011). La recherche sur le métabolisme des xénobiotiques est légèrement différente dans la mesure où les ions d'intérêt proviennent tous d'une masse de départ connue, celle du xénobiotique parent, qui peut être utilisé comme point de départ dans les recherches. Cependant, le fait que ces composants soient présents en faible quantité et qu'ils se retrouvent parmi une variété de matrices très complexes présente encore de nombreux défis. L'examen attentif des produits de fragmentation des molécules protonées ou déprotonées générés par les analyses LC-MS/MS peut fournir des informations structurelles détaillées sur les métabolites.

1.5.3.3 Le marquage avec des isotopes stables

Comme tous les xénobiotiques et leurs métabolites ne contiennent pas d'isotopes naturels diagnostiques tels que le chlore ou le brome, le marquage des isotopes stables est souvent utilisé pour faciliter l'identification des métabolites et l'élucidation de leurs structures par HRMS. Les isotopes stables ont le même nombre de protons que les éléments communs, et partagent donc les mêmes propriétés physico-chimiques, mais leur masse diffère en raison d'une différence dans le nombre de neutrons. Parmi ces

éléments, on trouve le carbone, l'hydrogène, l'azote, l'oxygène et le soufre qui ont tous au moins deux isotopes stables dont l'abondance est mesurable dans la nature (par exemple ^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{18}O et ^{34}S). Les métabolites formés à partir des isotopes produisent des pics qui co-éluent avec les métabolites d'intérêts, mais ils possèdent une masse plus élevée (Chokkathukalam *et al.*, 2014).

Comme pour le marquage isotopique radioactif, les sites de marquage des isotopes stables doivent être choisis avec soin (Kind et Fiehn, 2010). La combinaison des techniques de marquage isotopique stable avec la spectrométrie de masse permet une acquisition et une interprétation rapide des données (Mutlib, 2008),

Le deutérium est largement utilisé dans les études métaboliques en raison de sa disponibilité et de son faible coût. L'influence de l'échange de deutérium dans les expériences HRMS est pertinente à la fois lors d'une acquisition MS et MS/MS. Comme le deutérium (2,01410 Da) a une masse différente de celle de l'hydrogène (1,00783 Da), le nombre de deutériums peut être facilement déterminé par la différence de masse entre l'ion d'intérêt et l'ion deutéré dans le balayage complet (MS1). À partir de ces informations, il est possible de déterminer le nombre maximum d'hydrogènes facilement échangeables disponibles sur la molécule (Kind et Fiehn, 2010).

Cependant, les limites du marquage au deutérium ont été observées dans de nombreuses études métaboliques. Lorsque la biotransformation implique une liaison C- ^2H , un effet isotopique cinétique peut se produire en plus de la perte du marquage au deutérium (Dybala-Defratyka *et al.*, 2008). Ainsi, les sites pour le marquage au deutérium doivent être choisis avec soin afin d'éviter la perte du marqueur par échange de protons qui peut se produire dans les cycles aromatiques (Guroff *et al.*, 1967).

Les isotopes stables de ^{13}C et ^{15}N sont aussi utilisés en raison de leur stabilité et de l'absence d'effets isotopiques du deutérium, mais ils sont beaucoup plus coûteux ce qui limite leur utilisation. Par exemple, 0.12 mg de pyrene- $^{13}\text{C}_3$ coûte 955\$, ce qui est 15000 fois plus cher que le pyrene- d_{10} (Chen *et al.*, 2022).

1.5.4 Traitement des données et création de la base de données

Ces dernières années, des algorithmes et des logiciels experts pour les prédictions des métabolites formés ont été développés. Cela inclut des outils tels que DEREK, Catabol, LHASA, MetaboGen, METEOR et MetabolExpert (Dearden, 2003). Ces logiciels fonctionnent selon les règles de biotransformations connues et effectuent une prédiction *in silico* des métabolites possibles. Les structures des métabolites peuvent être identifiées ultérieurement par des changements de masse exacte ou par spectrométrie de masse en tandem.

Les logiciels spécialisés centrés sur la spectrométrie de masse provenant de différents fournisseurs tels que MetabolitePilot (Sciex), Metabolynx (Waters), Metworks (Thermo), MassHunter/Metabolite ID (Agilent) et MetaboliteTools (Bruker) utilisent une combinaison de masse précise, de pertes neutres et de règles de biotransformation avec des masses précises associées pour identifier les métabolites (Kind et Fiehn, 2010). Tout d'abord, les données acquises sont traitées à l'aide d'un paramétrage défini par l'utilisateur. Cela implique une comparaison automatique des chromatogrammes de l'analyte avec des échantillons de contrôle appropriés. Ces comparaisons sont effectuées avec les paramètres définis par l'utilisateur pour l'intégration des chromatogrammes d'ions extraits (XIC) et la reconstruction des données spectrales. Ces logiciels contiennent une liste de réactions de biotransformation connues pour la détection rapide des métabolites de xénobiotiques. Ils analysent tous les chromatogrammes en fonction des gains ou des pertes de masse moléculaire prévus par rapport à la masse moléculaire du parent pour détecter les métabolites attendus. Bien que les réactions de biotransformation dans ces logiciels soient limitées, ces procédures sont généralement flexibles et permettent l'ajout de nouvelles valeurs m/z pour les réactions métaboliques à plusieurs étapes ou peu communes (Anari et Baillie, 2005). Ensuite, un rapport est généré et affiné à l'aide d'une variété de filtres de données. Selon les conditions d'ionisation utilisées, il y a des échantillons susceptibles de subir une fragmentation dans la source. La liste des métabolites obtenue peut être "contaminée", ce qui augmente le temps nécessaire pour le traitement des données.

Cependant, il est possible d'identifier et d'éliminer rapidement ces fragmentations dans la source qui co-eluent parfaitement avec des produits attendus connus.

Les métabolites qui présentent des changements de masse "conventionnels" par rapport aux parents sont généralement faciles à identifier et ne nécessitent pas une investigation supplémentaire. Les métabolites pour lesquels le changement de masse est inattendu sont souvent plus intéressants, car ils peuvent être formés par une enzyme non standard (autre que le cytochrome P450), ou encore refléter une vulnérabilité de la molécule à l'oxydation, à la dimérisation ou même au clivage. Un élément essentiel pour confirmer la nature de ces métabolites est la détermination de la composition élémentaire probable du métabolite, et c'est là que la HRMS présente un avantage considérable par rapport aux instruments de masse nominale. La capacité à déterminer les compositions élémentaires des adduits moléculaires et des ions produits est importante dans l'identification des métabolites, car elle facilite l'élucidation structurelle des métabolites détectés ainsi que l'élimination de certains faux positifs. La clé d'une identification réussie des compositions élémentaires est l'exactitude de la masse. Une grande confiance dans la précision de la masse mesurée permet de déterminer la bonne composition élémentaire parmi la multitude de possibilités différentes à un m/z nominal donné ou, au moins, de limiter le nombre de compositions possibles à celles qui sont les plus probables. En pratique, l'utilisation de la connaissance d'un candidat métabolite potentiel (N, O, S ou d'halogène et/ou ses profils isotopiques) peut être utile pour réduire davantage le nombre de formules probables (Pleil et Isaacs, 2016).

1.6 Problématique, hypothèses et objectifs des études présentées

Dans notre vie quotidienne, nous sommes exposés à de nombreux xénobiotiques. Ces molécules peuvent provenir de produits pharmaceutiques, de produits de soins personnels, d'additifs alimentaires, de plastifiants et de pesticides. La plupart de ces xénobiotiques ne font pas l'objet de réglementations normalisées liées à l'exposition et à leur biotransformation, mais pourraient avoir des effets néfastes sur l'homme et l'environnement, même à de très faibles concentrations. Une fois métabolisées dans le corps humain, certaines de ces molécules peuvent être transformées en espèces réactives qui peuvent provoquer des effets nocifs sur la santé. Il est donc important d'évaluer le métabolisme de ces xénobiotiques et l'exposition aux métabolites qui en résultent. Cette étude est axée sur le développement de méthodes bioanalytiques pour étudier le métabolisme des xénobiotiques environnementaux à l'aide de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem à haute résolution.

L'objectif de ce projet est d'étudier, tout d'abord, le métabolisme *in vitro* de plusieurs xénobiotiques issus de différentes familles, tels que les plastifiants (BPA et ses analogues), les additifs alimentaires (BHT et ses analogues) et les métabolites secondaires de plantes (EGCG et ses analogues) afin de caractériser leurs voies de biotransformation et de détoxification. Pour tous ces xénobiotiques, la formation de métabolites oxydatifs et méthylés, des adduits glutathion, des conjugués glucuroniques et sulfatés en utilisant différentes fractions hépatiques provenant de l'humain et du rat ont été étudiées. De plus, des composés deutérés ont été utilisés pour mieux caractériser les mécanismes de formation de certains métabolites. Par la suite, les structures de tous les métabolites détectés pour tous les xénobiotiques étudiés ont été élucidées en utilisant des mesures de masse précises à haute résolution, la spectrométrie de masse en tandem et le marquage isotopique. Une base de données interne des métabolites détectés *in vitro* a été développée pour étudier ceux qui pourraient être des biomarqueurs potentiels d'exposition importants *in vivo*.

Cette étude sera en mesure d'identifier des centaines de produits de biotransformation, y compris plusieurs produits non signalés auparavant, et d'élucider leurs structures en utilisant des stratégies bioanalytiques. Notre approche innovante permettra de mieux comprendre le métabolisme des xénobiotiques et d'élucider de multiples voies de biotransformation, y compris la formation de métabolites réactifs.

CHAPITRE II

ARTICLE I

COMPREHENSIVE *IN VITRO* METABOLISM STUDY OF
BISPHENOL A USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-
HIGH RESOLUTION TANDEM MASS SPECTROMETRY

Ons Ousji, Leanne Ohlund, Lekha Sleno*

Université du Québec à Montréal, Chemistry Department P.O. Box 8888, Downtown
Station, Montréal, QC, CanadaRunning title: *In vitro* metabolism of BPA by LC-HRMS/MSManuscrit publié dans la revue scientifique *Chemical Research in Toxicology* 2020,
33, 6, 1468–1477 dans l'édition spéciale : Environmental Toxicology

DOI : 10.1021/acs.chemrestox.0c00042

Contribution des auteurs :

Ons Ousji, Leanne Ohlund et Lekha Sleno sont les co-auteurs de ce manuscrit. Ons Ousji a été responsable de la rédaction du manuscrit ainsi que de toutes les manipulations, expérimentation et analyse de données. Leanne Ohlund a été responsable de l'assistance technique de la plateforme spectrométrie de masse pendant l'optimisation de la méthode. Lekha Sleno a supervisé le projet, vérifié l'analyse des données et l'interprétation des résultats, révisé et finalisé le manuscrit.

2.1 Résumé

Le métabolisme du bisphénol A (BPA) a été étudié à l'aide de plusieurs modèles *in vitro*, y compris des microsomes et des fractions subcellulaires (S9) de foie humain et de rat, ainsi que du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) recombinant humain exprimé dans des Supersomes, pour un aperçu complet de toutes les voies métaboliques possibles. Grâce à une approche non ciblée utilisant la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à haute résolution de type quadripôle - temps de vol, nous avons pu détecter un grand nombre de métabolites connus de phase I et de phase II du BPA, ainsi que plusieurs métabolites non caractérisés auparavant. Une étude détaillée de la fragmentation du BPA et de ses métabolites détectés était cruciale afin de confirmer leurs structures. Les analogues du BPA marqués aux isotopes stables ont été très utiles pour l'élucidation des structures de nombreux métabolites. Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension du métabolisme du BPA, y compris des voies qui peuvent causer une toxicité supplémentaire, ainsi qu'à l'évaluation de l'exposition au BPA dans différentes matrices biologiques.

2.2 Abstract

BPA metabolism has been investigated using several *in vitro* models, including human and rat liver microsomes and S9 fractions, as well as human recombinant CYP3A4 expressed in Supersomes, for a comprehensive look at all possible metabolic pathways. By an untargeted approach using liquid chromatography coupled to a high-resolution quadrupole-time of flight mass spectrometer, we were able to detect a large number of known Phase I and Phase II metabolites of BPA, as well as several previously uncharacterized ones. A detailed fragmentation study of BPA and its detected metabolites was crucial to confirm structures. Isotope-labeled BPA analogs were highly useful for the structural elucidation of many metabolites. These results contribute to a better understanding of BPA metabolism, including pathways that may introduce additional toxicity, as well as help with the assessment of BPA exposure in different biological matrices.

2.3 Introduction

Bisphenol A (BPA, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane) is one of the most highly produced chemicals in the world (among the top 2% of organic chemicals produced commercially) (Szafran *et al.*, 2017). Global BPA production is expected to exceed well over 10 million tons by 2022 with an average annual growth of 4.8%. (Experts, 2016) It is used as a monomer in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins, as well as in many consumer products, including food packaging, beverage cans, water pipes, dentistry sealants, eyeglasses, toys, medical equipment and electronics (Chen *et al.*, 2016; Michałowicz, 2014). As an additive, one of its main uses is thermal paper (*e.g.* store sale receipts, books), where it is used as a "developer", triggering the appearance of colors in paper when exposed to heat (Castro *et al.*, 2019).

BPA exposure via direct ingestion, inhalation and transdermal routes can induce adverse effects on human health. It is an endocrine disruptor and xenoestrogen. Indeed, it has been shown that BPA can cross the placenta and may therefore present a risk for fetal development (Matuszczak *et al.*, 2019). It can also reduce the basal secretion of testosterone and leads to premature puberty (Matuszczak *et al.*, 2019). Its epimutagenic, obesogenic and diabetogenic effects are widely reported in the literature (Hoepner, 2019; Michałowicz, 2014; Rochester, 2013). In addition, BPA is a widespread environmental pollutant and its presence in various environmental matrices has been confirmed (Chen *et al.*, 2016; Michałowicz, 2014).

In recent years, BPA has received intense scrutiny from scientists, government agencies, environmental groups and media. Potential hazards related to human exposure to BPA have led to regulations on its production and use in North America and the European Union (EU). In 2008, Canada was the first country in the world to ban the use of BPA in baby bottles followed by the EU and the United States in 2011 and 2013, respectively (Kubwabo *et al.*, 2009; Usman et Ahmad, 2019).

Previous studies on the biotransformation of BPA *in vitro* have been reported using human and rat hepatic or intestinal microsomes (Jaeg *et al.*, 2004; Mazur *et al.*, 2010),

hepatocytes from mice, rat, and human (Pritchett *et al.*, 2002), S9 fractions (Yoshihara *et al.*, 2001) and human skin explants (Zalko *et al.*, 2011). Different *in vivo* samples have also been analyzed, such as urine (Nachman *et al.*, 2014; Sajiki *et al.*, 1999), serum (Takeuchi et Tsutsumi, 2002), breast milk (Sun *et al.*, 2004) and pregnancy-associated fluids (Schonfelder *et al.*, 2002). Several techniques have been applied to detect and quantify BPA and its metabolites from different biological matrices by LC-MS (Li et Franke, 2015), GC-FID (Suryadi *et al.*, 2018), GC-MS (Pednekar *et al.*, 2018), and ELISA (Kim *et al.*, 2015). Previous work has been nicely reviewed (Cao, 2012; Vandenberg *et al.*, 2007). Despite the large number of studies on BPA over the years, questions remain regarding its safety and actual human and environmental exposure levels. Moreover, no published studies on BPA metabolism have shown results based on high-resolution tandem mass spectrometry (HR-MSMS) data.

BPA metabolism has been studied here using *in vitro* incubations to form phase I and phase II metabolites followed by the characterization of formed metabolites via liquid chromatography coupled to a high-resolution tandem mass spectrometry, on a quadrupole time-of-flight instrument, in both negative and positive ion modes. The comparison of *in vitro* incubation results with three different deuterated analogs of BPA was also performed, to support the structural elucidation of detected metabolites.

2.4 Materials and Methods

Chemicals and reagents

Bisphenol A (BPA) [2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane, CAS 80-05-7], glutathione (GSH), uridine-5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA), 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS), D-saccharic acid 1,4-lactone (saccharolactone), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), glucose-6-phosphate, MgCl₂ and glucose-6-phosphate dehydrogenase, acetonitrile and methanol (both HPLC grade) as well as formic acid (LC-MS grade) were all purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Bisphenol A-d₆ (BPA dimethyl-d₆) [CAS 86588-58-1], bisphenol A-2,2',6,6'-

d₄ [CAS 102438-62-0] and bisphenol A-3,3',5,5'-d₄ [CAS 347841-41-2] were purchased from CDN Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada). Human and rat (Sprague-Dawley) liver microsomes (part #452161 and #452501, respectively), cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) Supersomes (part #456202) and rat S9 hepatic fraction (part no.: 452591) were purchased from Corning (Corning, NY). Ultrapure water was from a Millipore Synergy UV system (Billerica, MA).

In vitro incubations

Oxidative metabolites and GSH adducts

Bisphenol A (20 µM) was incubated with human or rat liver microsomes (1 mg/ml protein) or CYP3A4 Supersomes (1 mg/mL protein, 125 pmol/mL CYP3A4 final concentration) containing 5 mM GSH, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 5 mM glucose-6-phosphate and 2 units/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, at 37°C for 1 hour in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. Incubations without NADPH and/or without GSH were used as controls. The reaction was quenched by adding an equal volume of cold acetonitrile, and then centrifuged for 8 min at 14000 rpm and 4°C. Supernatants were then evaporated and reconstituted in 10% acetonitrile prior to LC-MS/MS analysis.

Glucuronide conjugates

Bisphenol A (20 µM) was incubated with rat liver microsomes (1 mg/ml protein), 2 mM UDPGA, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 5 mM glucose-6-phosphate and 2 units/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase and 2.5 mM saccharolactone at 37°C for 1 h. Controls without the addition of UDPGA were also prepared. The reaction was quenched and centrifuged as above, and supernatant was diluted in 1:1 with water prior to LC-MS/MS for the determination of glucuronide conjugates.

Sulfate conjugates

Bisphenol A (20 µM) was incubated with rat S9 fraction (2 mg/ml protein) in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 1 mM of PAPS, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 5 mM glucose-6-phosphate and 2 units/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase. Samples were incubated at 37°C for 1 h, and controls without the addition of PAPS were also prepared. The reaction was quenched, centrifuged, and diluted as for

glucuronidation incubations, prior to LC-MS/MS for the determination of sulfate conjugates.

LC-HRMS/MS analysis and data processing

LC-HRMS/MS analyses were performed on a Shimadzu Nexera UHPLC coupled to a Sciex 5600 TripleTOF (quadrupole-time-of-flight) system (Concord, ON, Canada), with DuoSpray™ ion source operating in positive and negative electrospray mode. Chromatographic separation was achieved using a Kinetex Biphenyl (100 x 2.1 mm, 2.6 µm) column and gradient elution with water (with 0.1% formic acid) and 100% ACN as mobile phases A and B, respectively, at 0.25 ml/min and a column temperature of 40°C. The injection volume was 25 µl. The HPLC gradient was as follows: 5% B at 0.5 min, linearly increased to 50% B at 15 min and up to 95% B at 18 min. For the detection of sulfate conjugates, the same column was used and the gradient elution used 5 mM ammonium acetate in water and 100% ACN as mobile phases, at 0.25 ml/min. The gradient was as follows: 5% B at 0.5 min, 30% B at 8 min than 50% B at 12 min and up to 85% B at 13 min.

The ion source parameters were as follows: ionization voltage at 5000 V, curtain gas of 35 psi, drying and nebulizer gases each at 50 psi, source temperature of 450°C and declustering potential of 60 V. TOF-MS was collected with an accumulation time of 300 ms, followed by MS/MS in information-dependent acquisition (IDA) mode on the top 5 ions, with dynamic background subtraction. Collision energy was set at 30 ± 10 V (150 ms each), with nitrogen as collision gas and the total cycle time was 1.1 s.

Data were examined by comparing control and metabolism samples to detect stable oxidative metabolites, GSH adducts, glucuronide and sulfate conjugates. Data were processed using Metabolite Pilot 2.0 (Sciex, Concord, ON, Canada) for metabolite identification by comparing incubations with their respective controls for unique peaks from a list of possible biotransformations of the parent compound, and PeakView 2.2 with Masterview 1.1 (Sciex, Concord, ON, Canada) were used for LC-MS/MS data visualization.

2.5 Results

The metabolism of bisphenol A and three deuterated analogs (see structures in Figure 2.1) was studied by LC-HRMS/MS using several *in vitro* systems to probe the formation of oxidative metabolites, GSH adducts, glucuronide and sulfate conjugates.

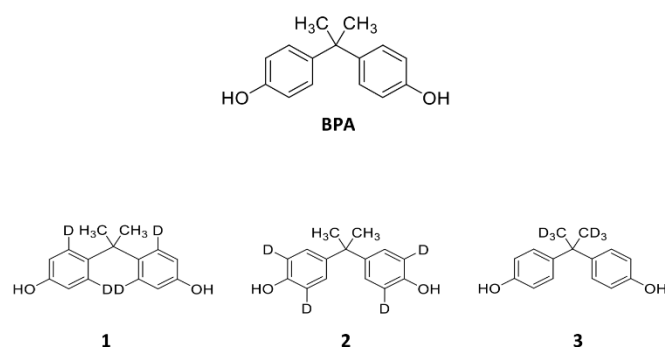


Figure 2.1 Chemical structure of bisphenol A and deuterated analogs used in this study; 1: BPA-2,2',6,6'-d4, 2: BPA-3,3',5,5'-d4, 3: BPA dimethyl-d6

The negative ion electrospray (ESI) mass spectrum of BPA yielded a deprotonated molecule at m/z 227.1083 ($C_{15}H_{15}O_2^-$, 2.4 ppm) with a retention time of 12.8 min (Figure 2.2A). The HR-MS/MS spectrum of deprotonated BPA (Figure 2.3A) produces major fragment ions at m/z 212.0840, 211.0770, 133.0659 and 93.0343. These ions are due to the neutral losses of CH_3^\bullet and CH_4 , and the formation of isopropenyl-phenol ($C_9H_9O^-$) and phenol ($C_6H_5O^-$) ions, respectively. Zhao et al. have previously investigated the fragmentation pathway of BPA in negative ESI mode on an Orbitrap mass spectrometer and found similar results, except that the product at m/z 212 wasn't assigned and was less abundant under their conditions (Zhao *et al.*, 2016b). Table 2.1 summarizes results from LC-HRMS/MS analyses of BPA and all its detected metabolites from this study.

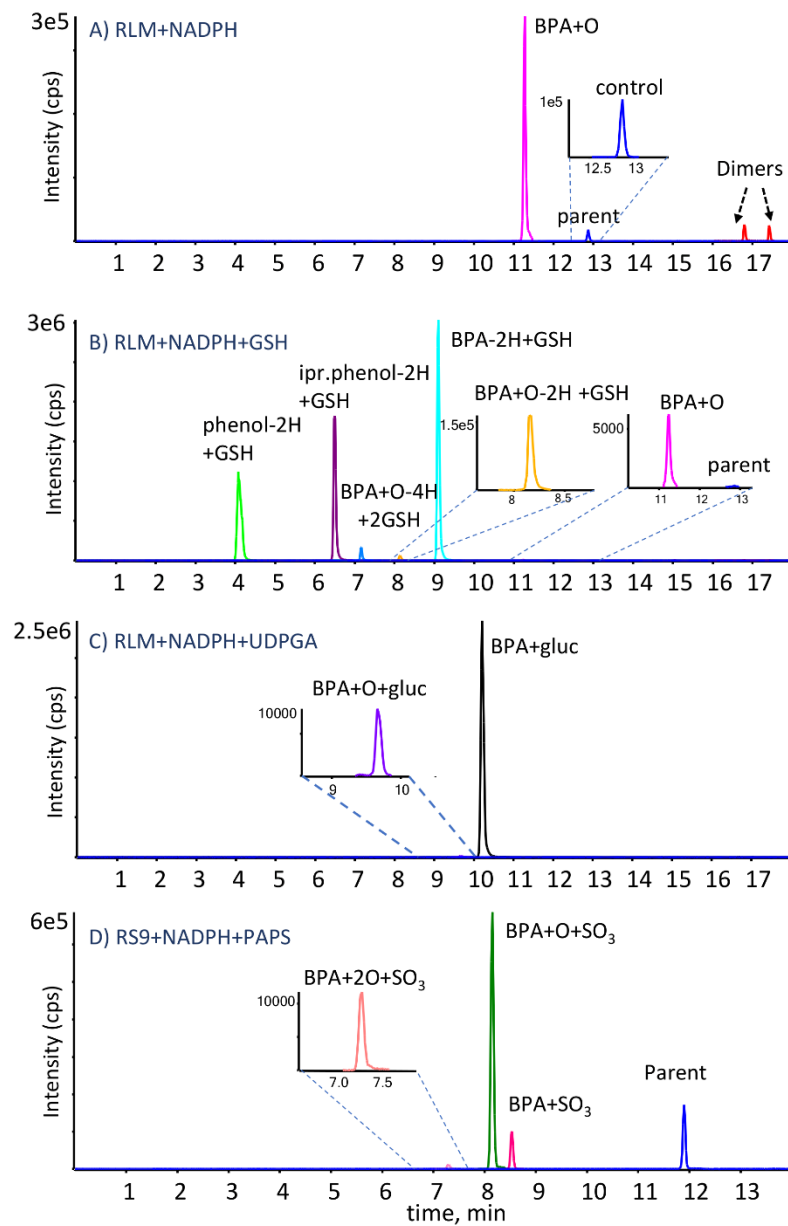


Figure 2.2 Extracted ion chromatograms of BPA metabolites formed in (A) RLM with NADPH; (B) RLM with NADPH and GSH; (C) RLM with NADPH and UDPGA; (D) rat S9 fraction with NADPH and PAPS; dotted peak is parent BPA in control incubation (without cofactors)

Table 2.1 LC-HRMS/MS data for BPA and detected metabolites

Metabolite	Formula	Measured <i>m/z</i> [M-H] ⁻	ppm	RT (min)	MS/MS fragment ions (<i>m/z</i>) ^a
BPA (parent)	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	227.1083	2.4	12.8	212.0840, 211.0770, 133.0659, 93.0343
BPA+O	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	243.1030	1.5	11.2	228.0791, 227.0716, 149.0608, 133.0656, 93.0342
BPA-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₈ S	532.1774	2.8	9.1	272.0893, 259.0808, 254.0794, 179.0466, 143.0465, 128.0355
BPA+O- 2H+GSH	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₉ S	548.1716	1.4	8.1	275.0753, 272.0898, 254.0792, 143.0465, 128.0352
phenol- 2H+GSH	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₇ S	398.1043	3.9	4.1	272.0893, 254.0777, 210.0884, 179.0466, 143.0466, 128.0358, 125.0073
ipr.phenol- 2H+GSH	C ₁₉ H ₂₇ O ₇ N ₃ S	440.1515	4.2	6.5	306.0776, 272.0903, 254.0797 160.0082, 143.0465, 128.0356
BPA+O- 4H+2GSH	C ₃₅ H ₄₆ N ₆ O ₁₅ S ₂	853.2421	3.6	7.1	724.2010, 719.1639, 580.1485, 546.1604, 272.0886
C-C dimer	C ₃₀ H ₃₀ O ₄	453.2067	-0.8	16.8	423.1591, 359.1666, 319.1357, 93.0350
C-O dimer	C ₃₀ H ₃₀ O ₄	453.2069	-0.4	17.4	438.1827, 359.1635, 319.1326, 243.1024, 227.0704, 211.0763, 133.0662, 93.0342
BPA+gluc	C ₂₁ H ₂₄ O ₈	403.1401	0.8	10.3	227.1084, 175.0256, 113.0245, 85.0294
BPA+O+gluc	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	419.1344	-0.6	9.6	243.1031, 175.0254, 113.0242, 85.0293
BPA+SO₃	C ₁₅ H ₁₆ O ₅ S	307.0652	2.1	8.5	227.1073, 79.9577
BPA+O+SO₃	C ₁₅ H ₁₆ O ₆ S	323.0604	3	8.2	243.1018, 228.0782, 79.9574
BPA+2O+SO₃	C ₁₅ H ₁₆ O ₇ S	339.0548	1	7.2	259.0961, 257.0803, 149.0608, 79.9577

^a Fragment ions with > 20% relative intensity of base peak are shown in bold

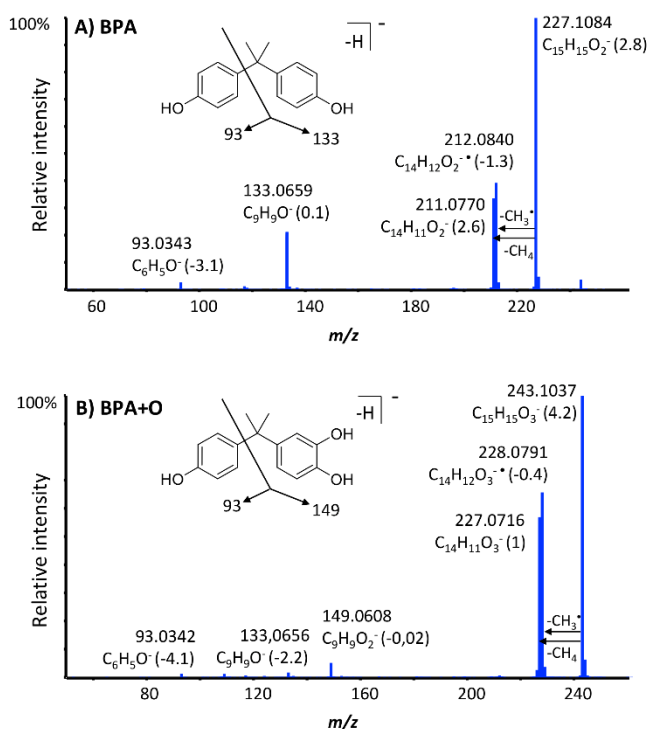


Figure 2.3 High-resolution MS/MS spectra of BPA (A) and hydroxylated BPA (BPA+O) (B)

Oxidative metabolites

The extracted ion chromatograms for metabolites detected in rat and human liver microsomal incubations are shown in Figure 2.2A and Figure 2.7A, respectively. The largest metabolite peak under these conditions corresponded to BPA+O with measured m/z 243.1030 (1.5 ppm) at 11.2 min. This peak was attributed to BPA catechol, which can undergo further oxidation to BPA-*o*-quinone, known for its genotoxic effects and its ability to bind to DNA (Edmonds *et al.*, 2004; Stack *et al.*, 2018). The MS/MS spectrum of this metabolite, with its similar fragmentation to BPA, is shown in Figure 2.3B. Further structural characterization was aided by using isotope-labeled BPAs, and these results are compiled in Table 2.2.

Table 2.2 Summary of HRMS data for oxidative metabolites and GSH adducts of deuterated BPA analogs using isotope-labeled BPA analogs

Metabolite	labeled BPA	Formula	measured (m/z) (ppm)	# lost labels	Comments
BPA+O	22'66'-d ₄	C ₁₅ D ₄ H ₁₂ O ₃	247.1281 (1.6)	0	O added in <i>ortho</i> position of phenol ring
	33'55'-d ₄	C ₁₅ D ₃ H ₁₂ O ₃	246.1223 (3.4)	1	
	dimethyl-d ₆	C ₁₅ D ₆ H ₁₀ O ₃	249.1410 (2.8)	0	
BPA-2H+GSH	22'66'-d ₄	C ₂₅ D ₄ H ₂₇ N ₃ O ₈ S	536.2012 (0.4)	0	SG group added in <i>ortho</i> position
	33'55'-d ₄	C ₂₅ D ₃ H ₂₇ N ₃ O ₈ S	535.1959 (2.3)	1	
	dimethyl-d ₆	C ₂₅ D ₆ H ₂₅ N ₃ O ₈ S	538.2153 (3.4)	0	
BPA-2H+O+GSH	22'66'-d ₄	C ₂₅ D ₄ H ₂₇ N ₃ O ₉ S	552.1966 (1.3)	0	SG group and O are added both in <i>ortho</i> positions
	33'55'-d ₄	C ₂₅ D ₂ H ₂₉ N ₃ O ₉ S	550.1838 (0.9)	2	
	dimethyl-d ₆	C ₂₅ D ₆ H ₂₅ N ₃ O ₉ S	554.2096 (2.1)	0	
phenol-2H+GSH	22'66'-d ₄	C ₁₆ D ₂ H ₁₉ N ₃ O ₇ S	400.1160 (1.8)	0	SG group is added in <i>para</i> position
	33'55'-d ₄	C ₁₆ D ₂ H ₁₉ N ₃ O ₇ S	400.1164 (2.8)	0	
	dimethyl-d ₆	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₇ S	398.1037 (2.5)	0	
ipr.phenol-2H+GSH	22'66'-d ₄	C ₁₉ D ₂ H ₂₅ O ₇ N ₃ S	442.1633 (2.5)	0	SG group is added to the <i>para</i> position
	33'55'-d ₄	C ₁₉ D ₂ H ₂₅ O ₇ N ₃ S	442.1632 (2.3)	0	
	dimethyl-d ₆	C ₁₉ D ₆ H ₂₁ O ₇ N ₃ S	446.1892 (4.3)	0	
BPA+O-4H+2GSH	22'66'-d ₄	C ₃₅ D ₃ H ₄₃ N ₆ O ₁₅ S ₂	856.2595 (2)	1	SG and O are added the <i>ortho</i> position and 2 nd SG is added in <i>meta</i> position
	33'55'-d ₄	C ₃₅ D ₂ H ₄₄ N ₆ O ₁₅ S ₂	855.2541 (3)	2	
	dimethyl-d ₆	C ₃₅ D ₆ H ₄₀ N ₆ O ₁₅ S ₂	859.2796 (3.5)	0	
C-C Dimer	22'66'-d ₄	C ₃₀ D ₈ H ₂₂ O ₄	461.2572 (-0.3)	0	C <i>ortho</i> - C <i>ortho</i> bond formation
	33'55'-d ₄	C ₃₀ D ₆ H ₂₄ O ₄	459.2456 (1.8)	2	
	dimethyl-d ₆	C ₃₀ D ₁₂ H ₁₈ O ₄	465.2828 (0.8)	0	
C-O Dimer	22'66'-d ₄	C ₃₀ D ₈ H ₂₂ O ₄	461.2572 (-0.3)	0	C <i>ortho</i> - O bond formation
	33'55'-d ₄	C ₃₀ D ₇ H ₂₄ O ₄	460.2511 (0.3)	1	
	dimethyl-d ₆	C ₃₀ D ₁₂ H ₁₈ O ₄	465.2828 (0.8)	0	

The formation of the BPA+O metabolite was confirmed not to involve oxidation of the methyl groups. As reported by Schmidt et al., the oxidation reaction could form *meta*-hydroxylated BPA and/or *ortho*-hydroxylated BPA (Schmidt *et al.*, 2013b). Using the bisphenol A-2,2',6,6'-d₄ and bisphenol A-3,3',5,5'-d₄ analogs, the BPA+O peak was shifted from m/z 243.1037 to 247.1281 and 246.1223, respectively (Table 2.2), indicating the oxidation in the *ortho* position.

Two BPA dimers were also detected under oxidative conditions, at 16.8 and 17.4 min (Figure 2.2A), both having the formula $C_{30}H_{30}O_4$ measured at m/z 453.2067 (-0.8 ppm) and 453.2069 (-0.4 ppm), indicating that they are linear dimers, not cyclic ones. HR-MS/MS spectra were compared between the two detected dimer peaks (Figure 2.4). Several fragment ions are shared, such as loss of neutral phenol and isopropenylphenol moieties. The dimer at 17.4 min, however, yields a few unique ions of m/z 243.1024, 227.0704 and 211.0763. The characteristic fragment at m/z 243.1024 has three oxygen atoms remaining. To demonstrate whether the dimerization was via a C-O or O-O or C-C link, results from the deuterated bisphenols were studied (Table 2.2). The BPA- d_6 dimer did not exchange any of its deuterium atoms, indicating that the dimerization does not involve the methyl groups. BPA-2,2',6,6'- d_4 did not lose any deuterium either. However, BPA-3,3',5,5'- d_4 lost two deuterium atoms in the isomer at 16.8 min (m/z 459.2456, 1.8 ppm) and one deuterium in the one at 17.4 min (m/z 460.2511, 0.3 ppm). These results confirmed that the earlier eluting dimer resulted from C *ortho*-C *ortho* linkage and that the latter one via a C *ortho*-O bond formation (see Figure 2.4). Wang et al. have previously detected these two BPA dimers and studied their NMR spectra (Wang *et al.*, 2013). Their findings support these LC-MS/MS results. With the knowledge of the elution order of the two dimers (C-O. vs C-C), it would be possible to measure relative proportions of these dimers in complex samples by LC-MS.

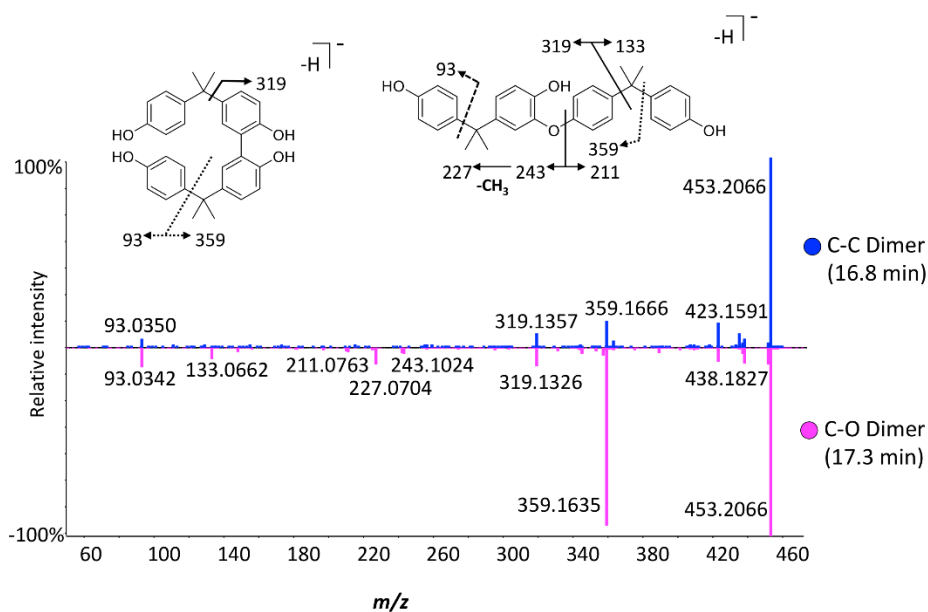


Figure 2.4 Mirror plot of BPA dimers with proposed routes of fragmentation.

Reactive metabolites and GSH adducts

The metabolism of xenobiotics, such as bisphenol A, is generally considered as a detoxification process. However, in some cases, biotransformation of xenobiotics may lead to the formation of reactive intermediates (Lee et Zhu, 2011; Ma et Zhu, 2009; Park *et al.*, 2011). These unstable metabolites can bind to several biomolecules and cause, for instance, protein inactivation, lipid peroxidation, and DNA modification. Reactive intermediates may therefore be involved in carcinogenesis and allergic reactions, in addition to hepatotoxicity and tissue necrosis (Evans *et al.*, 2004; Franklin et Yost, 2000; Lee et Zhu, 2011). Most reactive metabolites are electrophilic, unstable and therefore difficult to isolate or even detect. They can be studied *in vitro* by trapping them with appropriate nucleophiles, such as GSH, an endogenous tripeptide that is used to scavenge reactive oxygen species from the body as a defense mechanism under oxidative stress (Ma et Zhu, 2009). When BPA was incubated with NADPH and GSH, several GSH adducts were formed, as seen in Figure 2.2B for RLM and Figure 2.7B/C

for HLM and CYP3A4. These included BPA-2H+GSH (9.1 min), BPA+O-2H+GSH (8.1 min), BPA+O-4H+2GSH (7.1 min) and two GSH conjugates involving cleavage of the BPA molecule, namely phenol-2H+GSH (4.1 min) and isopropylphenol-2H+GSH (6.5 min). No peaks were detected for the parent BPA, BPA+O or BPA dimers, when GSH was added to the microsomal incubations. When these samples were analysed in positive electrospray mode, the same species were detected as protonated molecules, with only some variation in relative response factors between the formed metabolites. Extracted ion chromatograms in positive mode are presented in Supplemental data (Figure 2.8).

The GSH adduct having the highest LC-MS signal intensity was BPA-2H+GSH, measured at m/z 532.1774 $[M-H]^-$ (with 2.8 ppm error). The HR-MS/MS spectra (Figure 2.5A) is dominated by characteristic GSH fragment ions seen commonly in negative ion mode following collision-induced dissociation (m/z 272.0893, 254.0794, 179.0466, 143.0465, 128.0355) (Lee et Zhu, 2011). There was also a fragment ion at m/z 259.0808, corresponding to deprotonated BPA with the sulfur atom of GSH attached. To determine the exact position of the SG group in this metabolite, the three deuterated compounds were incubated with RLM in the presence of NADPH and GSH. Table 2.2 summarizes these results. BPA-3,3',5,5'-d₄ lost one deuterium for this GSH adduct, in line with the proposed structure shown in Figure 2.6 (**M4**).

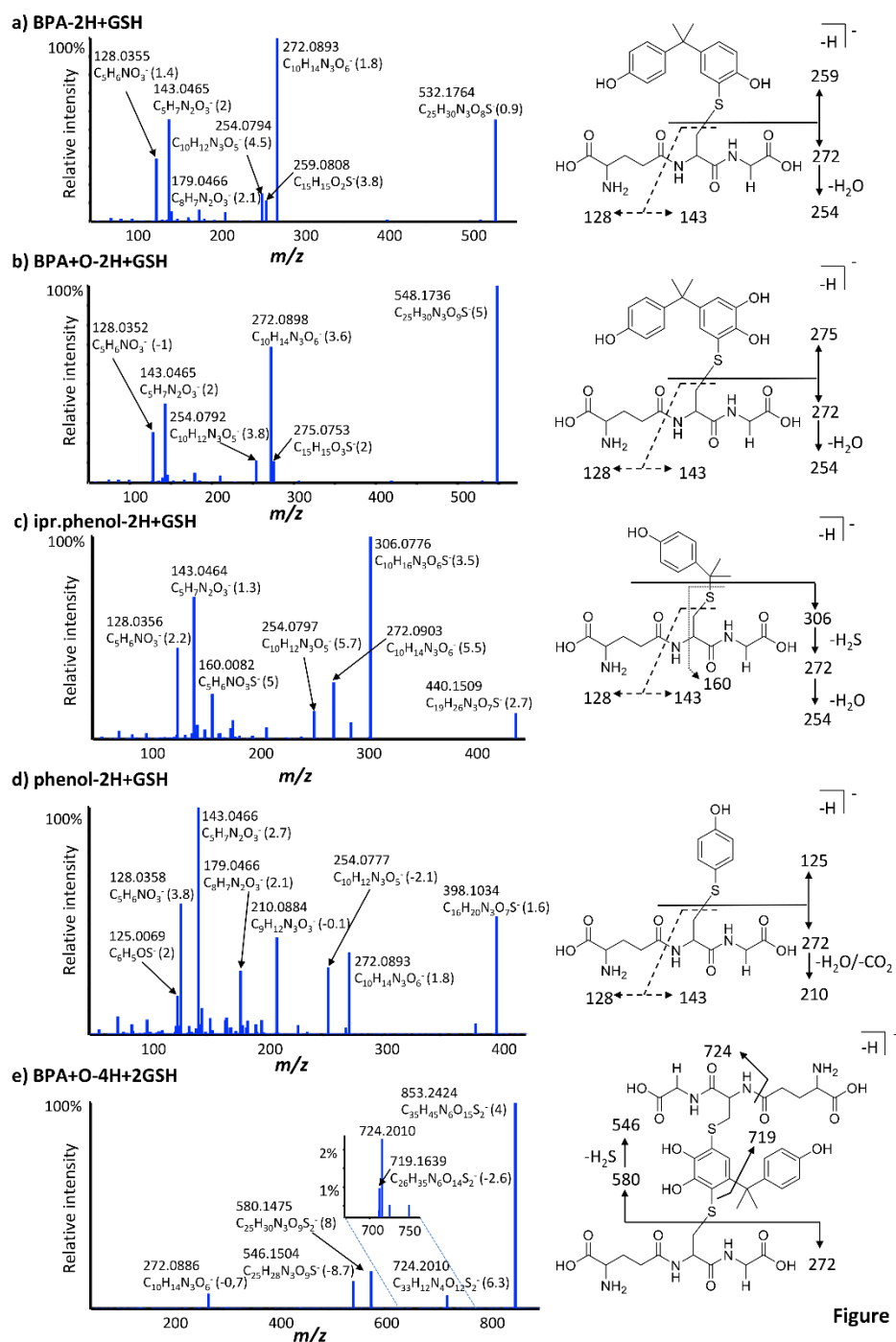


Figure 5

Figure 2.5 High-resolution MS/MS spectra and fragmentation reactions of GSH adducts detected in rat and human liver microsomes; (A) BPA-2H+GSH, (B) BPA+O-2H+GSH, (C) ipr.phenol-2H+GSH; (D) phenol-2H+GSH and (E) BPA+O-4H+2GSH.

The BPA+O-2H+GSH adduct, detected at m/z 548.1716, is formed following GSH binding to *ortho*-quinone BPA (Schmidt *et al.*, 2013b). Its HR-MS/MS spectrum (Figure 2.5B) is also dominated with the same characteristic GSH fragments as noted above. An interesting peak at m/z 275.0753, assigned as deprotonated BPA+O with the sulfur of GSH attached, confirms the binding between the hydroxylated BPA and GSH. BPA-3,3',5,5'-d₄ exchanged two deuterium atoms when it formed the analogous GSH adduct, and none were exchanged in the case of BPA-2,2',6,6-d₄ and BPA-d₆ (Table 2.2). These results indicate that the SG group and the oxygen atom are both added to the *ortho* position (**M5**, Figure 2.6). Neither of these glutathione conjugates (BPA-2H+GSH and BPA+O-2H+GSH) were produced without NADPH, suggesting oxidized reactive intermediates prior to GSH conjugation (through an arene-epoxide of BPA or BPA-*o*-quinone, respectively) as suggested by Jaeg *et al.* (Jaeg *et al.*, 2004). We also detected two GSH adducts from cleavage products of BPA, forming conjugates of 4-isopropylphenol (iPr.Ph) and phenol (Ph). The chemical formulae of these two metabolites were confirmed by accurate mass measurements, with deprotonated molecules at m/z 440.1515 (C₁₉H₂₆O₇N₃S⁻, 4.2 ppm) and m/z 398.1043 (C₁₆H₂₀O₇N₃S⁻, 3.9 ppm), for the iPr.Ph-2H-GSH and Ph-2H+GSH, respectively. Their MS/MS spectra are presented in Figure 2.5 (C-D). For these two metabolites, characteristic GSH fragments were again observed. An interesting fragment ion (Figure 2.5D) of the phenol-2H+GSH adduct at m/z 125.0069 assigned as the phenolic ring with the added sulfur group from GSH (1.9 ppm). To determine the exact site of GSH addition for the cleavage metabolites, the TOF-MS spectra of the deuterated BPAs were compared to the results from unlabeled BPA (Table 2.2). None of the deuterated analogs exchanged any deuterium after forming these cleaved GSH adducts (Table 2.2). These results indicate that the SG group is not added onto the phenolic ring of BPA and it could only be added as shown in the proposed **M7** and **M8** structures (Figure 2.6). This is the first report that has successively identified the structure of these two metabolites and the exact position of the glutathione addition.

In addition to these previously known transformations, a novel GSH adduct was identified as a di-GSH conjugate of hydroxylated BPA (BPA+O-4H+2GSH) with a retention time of 7.1 min (Figure 2.2B). The elemental formula was confirmed by accurate mass with a measured m/z 853.2421 (3.6 ppm) (Table 2.1). A characteristic product ion (Figure 2.5E) at m/z 719.1639, corresponds to two molecules of GSH bound to the hydroxylated phenolic ring of BPA. This ion is crucial support for the proposed structure (**M6**, Figure 2.6). This structure is further supported from isotope-labeled BPA results (Table 2.2), showing that BPA-3,3',5,5'-d₄ lost 2 atoms of deuterium ([Md₄-2D], m/z 855.2595 with 3 ppm), whereas BPA-2,2',6,6'-d₄ exchanged one deuterium ([Md₄-D], m/z 856.2595 with 2 ppm) and none were lost for the case of BPA-d₆. These results prove that this reaction doesn't involve the CH₃ groups and that SG group and the + O are added to both *ortho* positions (as in (+O+GSH) and the second SG is added to the *meta* position.

Glucuronide conjugates

Two BPA glucuronide conjugates were detected (Figure 2.2C) when both NADPH and UDPGA were added to microsomal incubations. The largest peak corresponded to BPA glucuronide (BPA+gluc) at 10.3 min. A second conjugate was found to be hydroxylated BPA glucuronide (BPA+O+gluc) at 9.6 min. BPA+gluc was confirmed by HR-MS/MS (Figure 2.9A) with a deprotonated molecule measured at m/z 403.1401 (C₂₁H₂₃O₈⁻, 0.8 ppm), and was also detected in the absence of NADPH. The hydroxylated glucuronide conjugate (BPA+O+gluc) yielded a deprotonated ion at m/z 419.1344, confirming the C₂₁H₂₃O₉⁻ formula (-0.6 ppm) (Figure 2.9B). Some important fragment ions were seen at 175.0254 (3.3 ppm) for the glucuronide sugar moiety, m/z 243.1031 (1.8 ppm) for deprotonated hydroxylated BPA ion, m/z 113.0242 (-1.9 ppm) corresponding to deprotonated glucuronic acid-CO₂-H₂O and finally m/z 85.0293 (-2.4 ppm), having a subsequent CO loss from the 113 ion. It can't be confirmed, from this data, if the glucuronic acid was added to the original or the new hydroxyl group.

Sulfate conjugates

When PAPS was added as a cofactor to rat S9 incubations, several BPA sulfate conjugates were detected, including a direct sulfate conjugate (BPA+SO₃) at 8.5 min with *m/z* 307.0652 (C₁₅H₁₅O₅S⁻, 2.1 ppm), a hydroxylated sulfate conjugate (BPA+O+SO₃) at 8.2 min with *m/z* 323.0604 (C₁₅H₁₅O₆S⁻, 3 ppm) and a dihydroxylated sulfate conjugate (BPA+2O+SO₃) at 7.2 min with *m/z* 339.0548 (C₁₅H₁₅O₇S⁻, 1ppm) (Figure 2.2D). MS/MS spectra from all these metabolites showed a common product ion *m/z* 79.957, corresponding to the sulfonate group (SO₃⁻), as well a neutral loss of SO₃ radical (-80 Da) (Figures 2.10). The BPA+SO₃ and BPA+O+SO₃ have previously been described in literature, however, this is the first report of the BPA+2O+SO₃.

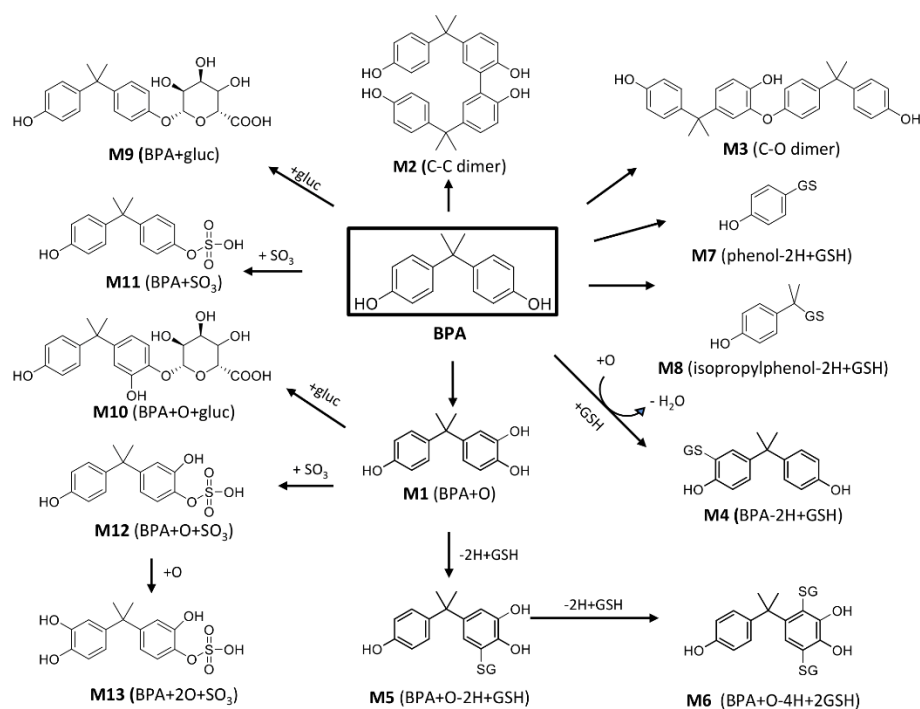


Figure 2.6 Proposed biotransformation reactions of BPA, forming metabolites detected in this study

2.6 Discussion

BPA exposure can induce adverse effects on human health such as endocrine disruption, hepatotoxicity, neurotoxicity and mutagenicity (Michałowicz, 2014). However, the complete picture involving the molecular mechanisms of BPA toxicity is still evolving. To better characterize all possible biotransformation products of BPA, high-resolution tandem mass spectrometry was employed to detect and elucidate metabolites using several *in vitro* systems. No previous high-resolution mass spectrometry-based untargeted screening method has been reported for the detection of known phase I and II metabolites. Complementary *in vitro* systems, including human and rat liver microsomes, CYP3A4 Supersomes and rat S9 fractions, were used with appropriate co-factors (NADPH, UDPGA and PAPS). Three isotopically-labeled bisphenol A analogs were also employed to aid in the structural elucidation of formed metabolites. Under oxidative conditions, the same metabolites were detected in RLM, HLM, RS9 and CYP3A4 incubations. Jaeg *et al.* studied the metabolism of radiolabeled BPA in mouse liver microsomes and S9 fraction from CD1 mice (Jaeg *et al.*, 2004). The *in vitro* incubations were performed in the presence of NADPH, UDPGA and PAPS. Metabolites were separated and radioactive fractions were isolated by HPLC, and then analyzed on an ion trap mass spectrometer in electrospray negative ion mode. Schmidt *et al.* incubated BPA with HLM and six human CYP isozymes in the presence of GSH and NADPH and analyzed metabolites by LC-MS/MS on a triple quadrupole platforms in multiple reaction monitoring mode, as well as precursor ion scan mode for confirming GSH adducts (Schmidt *et al.*, 2013b). They concluded that the metabolism of BPA was not specific for one particular isozyme.

In the presence of NADPH, BPA forms hydroxylated BPA (BPA+O), in the *ortho* position (**M1**, Figure 2.6). This hydroxy-BPA is subsequently oxidized to the *ortho*-quinone (BPAQ), which can bind to DNA and reduced glutathione (Zhao *et al.*, 2018). When GSH was added to the incubations, many adducts were detected. BPAQ is the likely reactive intermediate for the formation of **M5** (adduct) (BPA+O-2H+GSH)

(Figure 2.6) (Schmidt *et al.*, 2013b). A 1,6-addition mechanism of GSH to BPAQ (C3 and C4 carbonyls) has been proposed (Bolton *et al.*, 1994; Stack *et al.*, 2018). This supports the proposed structure of 3-hydroxy-5-GSH-BPA. Several studies showed the production of BPAQ-GSH (chemically or enzymatically) but this is the first study to indicate the regiochemistry of this conjugate using high-resolution mass spectrometry (Bolton *et al.*, 1994; Qiu *et al.*, 2004; Stack *et al.*, 2018).

A most prominent glutathione conjugate peak was BPA-2H+GSH (**M4**), which follows a different metabolic pathway than the previous one. The formation of this adduct was NADPH-dependent. Jaeg *et al.* suggested that **M4** was formed after the formation of an epoxide followed by GSH addition and loss of a water molecule (Jaeg *et al.*, 2004). This biotransformation has been investigated for different types of xenobiotics such as estradiol, aflatoxin B, and pyrazinone (Singh *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2007). These results agree with the mechanism that BPA follows the same pathway by adding GSH to a CYP450-mediated arene epoxide intermediate of BPA (Guengerich, 2001). HR-MS/MS (Figure 2.5A) and results from isotope-labeled analogs (Table 2.2) supports this metabolic activation pathway.

The BPA+O-4H+2GSH adduct (**M6**) had not been detected previously. This metabolite is proposed to follow the same pathway as **M5** followed by a second oxidation (quinone formation) and GSH addition on the same ring, most likely being the less hindered C2 position. The structural elucidation by HR-MS/MS, with isotope-labeling experiments, proved that both glutathionyl groups and the +O are added onto the same ring. Stack *et al.* have previously reacted synthetic BPAQ *in vitro* with GSH and identified a bis-glutathionyl adduct of BPAQ and subsequently characterized it by NMR (Stack *et al.*, 2018). Their results proposed the GSH adduction to positions C2 and C5 on the ring and agrees with the current results and proposal for the structure of 3-hydroxy-2,5-diGSH-BPA. Similarly, a di-GSH conjugate of safrole has been presented by Bolton *et al.* The ¹H-NMR spectrum contained only one aromatic proton, suggesting that two molecules of GSH had added to the quinone ring, however the

exact site of attachment of the GSH residues on the ring could not be confirmed (Bolton *et al.*, 1994).

GSH can react, either nonenzymatically or via GSH-S-transferases, with electrophiles and free radicals. In some cases, GSH adducts are not stable and can be chemically degraded or undergo rearrangement or enzymatic cleavages (Evans *et al.*, 2004). The formation of **M7** and **M8** was seen with HLM, RLM and Supersomes in the presence of NADPH and GSH. Based on MS/MS fragmentation pathways and isotope labeling experiments, the addition of GSH for these products can be confirmed to be in the *para* position (**M7** and **M8**, Figure 2.6). This phenomenon can be explained by a radical mechanism in which BPA undergoes a homolytical cleavage of the C-C bond, which produces a radical phenol and a radical of isopropylphenol. These radicals are unstable and could undergo adduct formation in the presence GSH. GSH is able to scavenge radicals by its electron donating ability, which enables it to neutralize reactive species such as the superoxide, hydroperoxyl, hydroxyl (OH[•]) radicals (Fiser *et al.*, 2013). Gabriel *et al.* suggested a cleavage mechanism of BPA by manganese peroxidase through α cleavage (Gabriel *et al.*, 2007). They reported that the detection of phenol instead of hydroquinone indicates that BPA is not hydroxylated, but rather undergoes a homolytical cleavage after abstraction of a phenolic H-atom. Other studies suggested the mechanism of *ipso*-substitution of bisphenol A catalyzed by microsomal cytochromes P450 (Nakamura *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2013b; Skledar *et al.*, 2016). Schmidt *et al.* detected isopropylphenol+GSH but not phenol+GSH, using HLM and different isozymes of CYP450 (Schmidt *et al.*, 2013b). They found that this metabolite was formed in presence of CYP2C8, CYP2C9 and CYP 3A4. Nakamura *et al.* reported that this reaction was mainly catalyzed by CYP3A4 and CYP3A5 and found that the products of the *ipso*-substitution of BPA had higher estrogen receptor binding activity than BPA (Nakamura *et al.*, 2011). They concluded that this metabolic pathway could enhance the estrogenic activity of BPA. Based on the work presented here, BPA would undergo a homolytical cleavage in presence of cytochrome P450 and

not *ipso*-substitution, as previously proposed, based on the isotope-labeled data as well as the presence the GSH conjugate of phenol.

BPA is also able to dimerize under oxidative incubation conditions (Figure 2.2A). By studying the MS/MS spectra for both formed dimers, it was possible to conclude that the first isomer of BPA dimer at 16.8 min results from C *ortho*-C *ortho* linkage and that the one at 17.4 min is formed following the formation of a C *ortho*-O bond (**M2** and **M3**, Figure 2.6). Jaeg *et al.* hypothesized that BPA dimerization may be a two-step metabolic pathway : (1) enzymatic oxidation of BPA into an unidentified reactive intermediate, (2) a nonenzymatic reaction between the reactive compound and unchanged BPA (Jaeg *et al.*, 2004). It has also been reported that unusual CYP-catalyzed reactions, such as dimer formation, involving ring coupling through C-C and C-O linkage for several xenobiotics (including morphine, BDE-47, and capsaicin) involve radical chemistry (Lamb *et Waterman*, 2013). Generally, these reactions have been demonstrated as internal couplings, in which rings are in juxtaposition to fuse if a radical pathway is initiated (Guengerich *et Munro*, 2013). Based on these results, during BPA oxidation, an aromatic radical pathway is proposed to initiate formation of an aryl radical by CYP450 followed by the fusion between the rings of two BPA molecules to form the C-C dimer or between the formed aryl radical of a hydroxy group of BPA to form C-O dimer.

Unlike the dimerization or GSH conjugation pathways, glucuronidation and sulfation was independent of phase I oxidation, as confirmed through the formation of BPA+gluc and BPA+SO₃ (**M9** and **M11**, Figure 2.6). The addition of NADPH to those incubations allowed the additional formation of oxidized conjugates, **M10**, **M12** and the novel BPA+2O+SO₃ (**M13**). Glucuronidation has been reported to be the main route of metabolism of BPA in humans mediated by the UDP-glucuronosyltransferase (UGT) enzymes (Street *et al.*, 2017), while phenol-sulfotransferases mediate the sulfation of BPA (Stowell *et al.*, 2006). Interestingly, the previously reported *in vivo* di-sulfate or di-glucuronide conjugates were not detected here (Inoue *et al.*, 2016). Even though glucuronidation and sulfation are considered as detoxification pathways

for BPA, there is a risk of deconjugation of the formed phase II metabolite to BPA by enzymes, such as glucuronidases or sulfatases (Gerona *et al.*, 2013).

2.7 Conclusion

Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry enabled the detection and characterization of BPA metabolites produced from *in vitro* incubations. A detailed study of MS/MS fragmentation pathways, aided by the use of three different isotope-labeled bisphenol A analogs, allowed structure elucidation and confirmed the regiochemistry of known and novel metabolites of BPA. This method could be adapted for identifying metabolites of similar compounds, such as BPA analogs. Moreover, the chromatographic and fragmentation behavior of BPA metabolites described in this study will surely be useful for further studies on BPA exposure.

2.8 Supplemental information

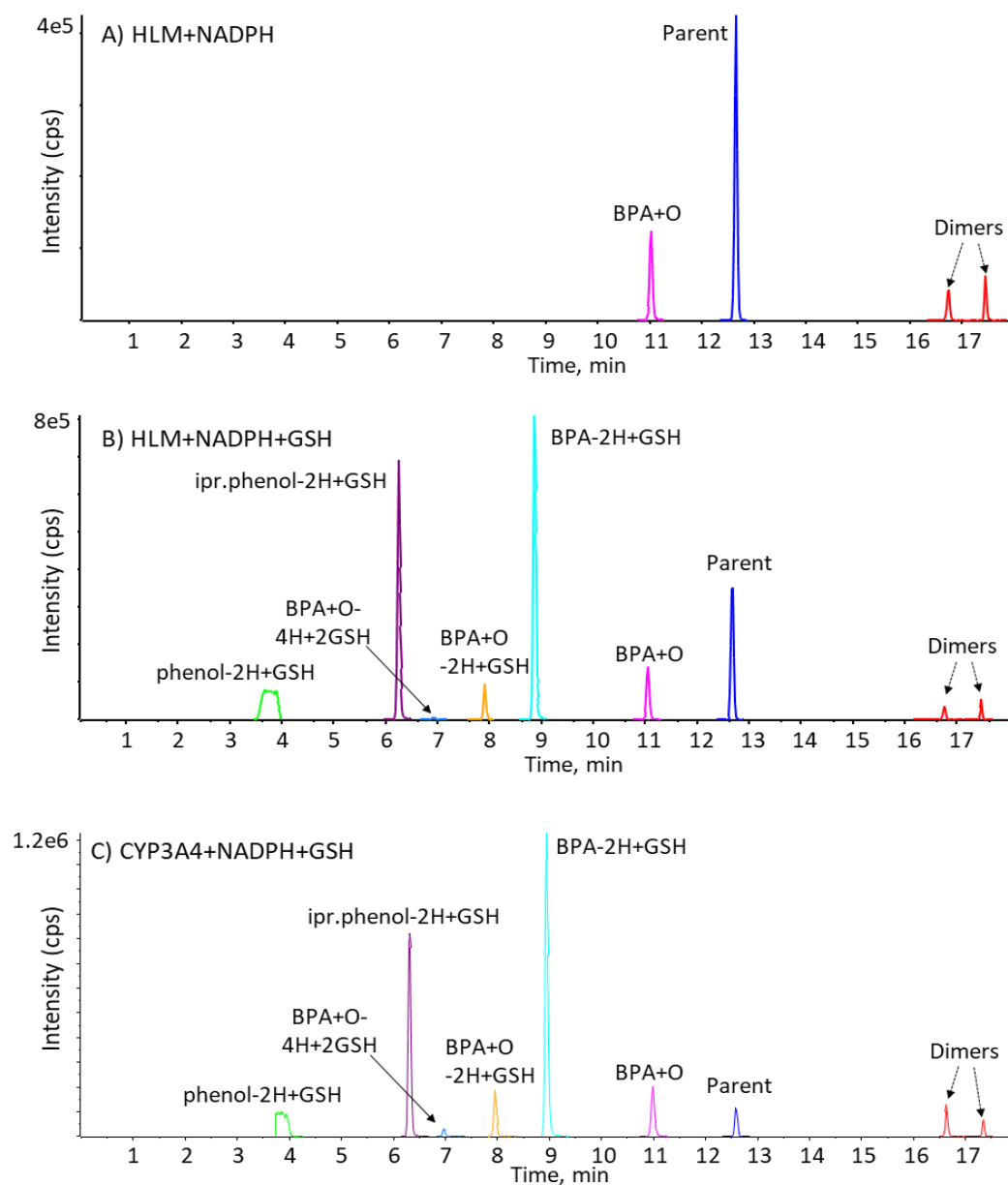


Figure 2.7 Extracted ion chromatograms of incubations with BPA containing (A) human liver microsomes (HLM) + NADPH, (B) HLM + NADPH + GSH, (C) CYP3A4 (Supersomes) + NADPH + GSH

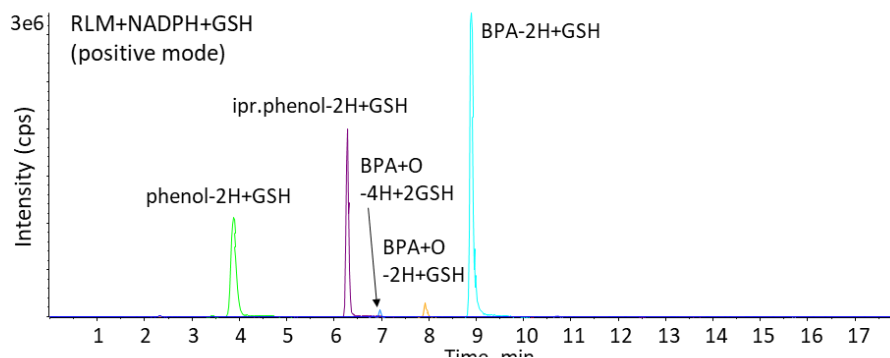
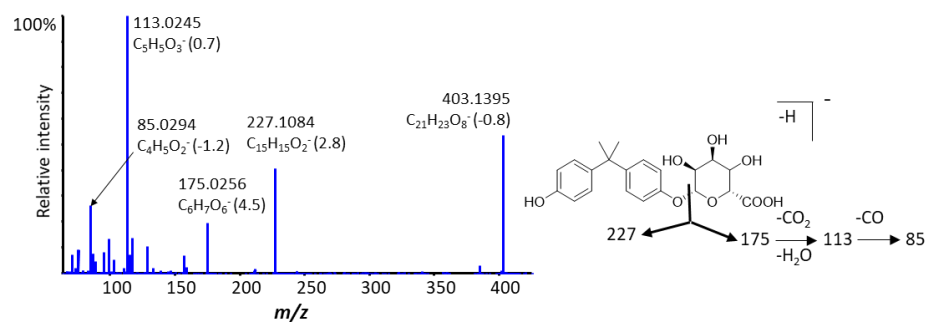


Figure 2.8 Extracted ion chromatograms of BPA and metabolites detected in incubations with rat liver microsomes, NADPH and GSH, in positive ion mode

A) BPA+gluc



B) BPA+O+gluc

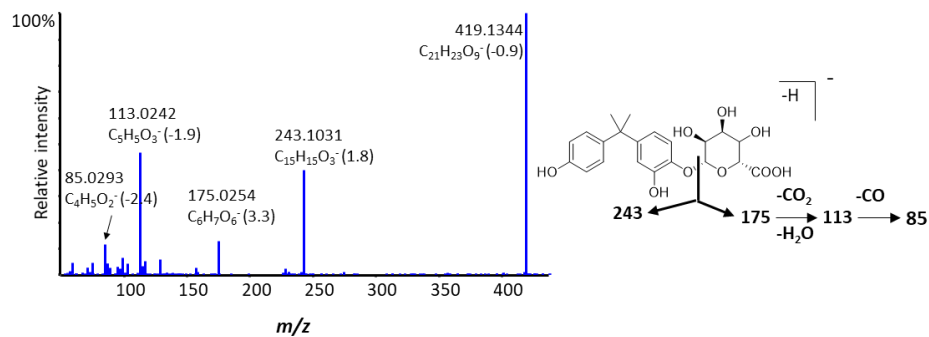


Figure 2.9 HR-MS/MS spectra for BPA glucuronide conjugates with proposed routes of fragmentation; (A) BPA+gluc and (B) BPA+O+gluc

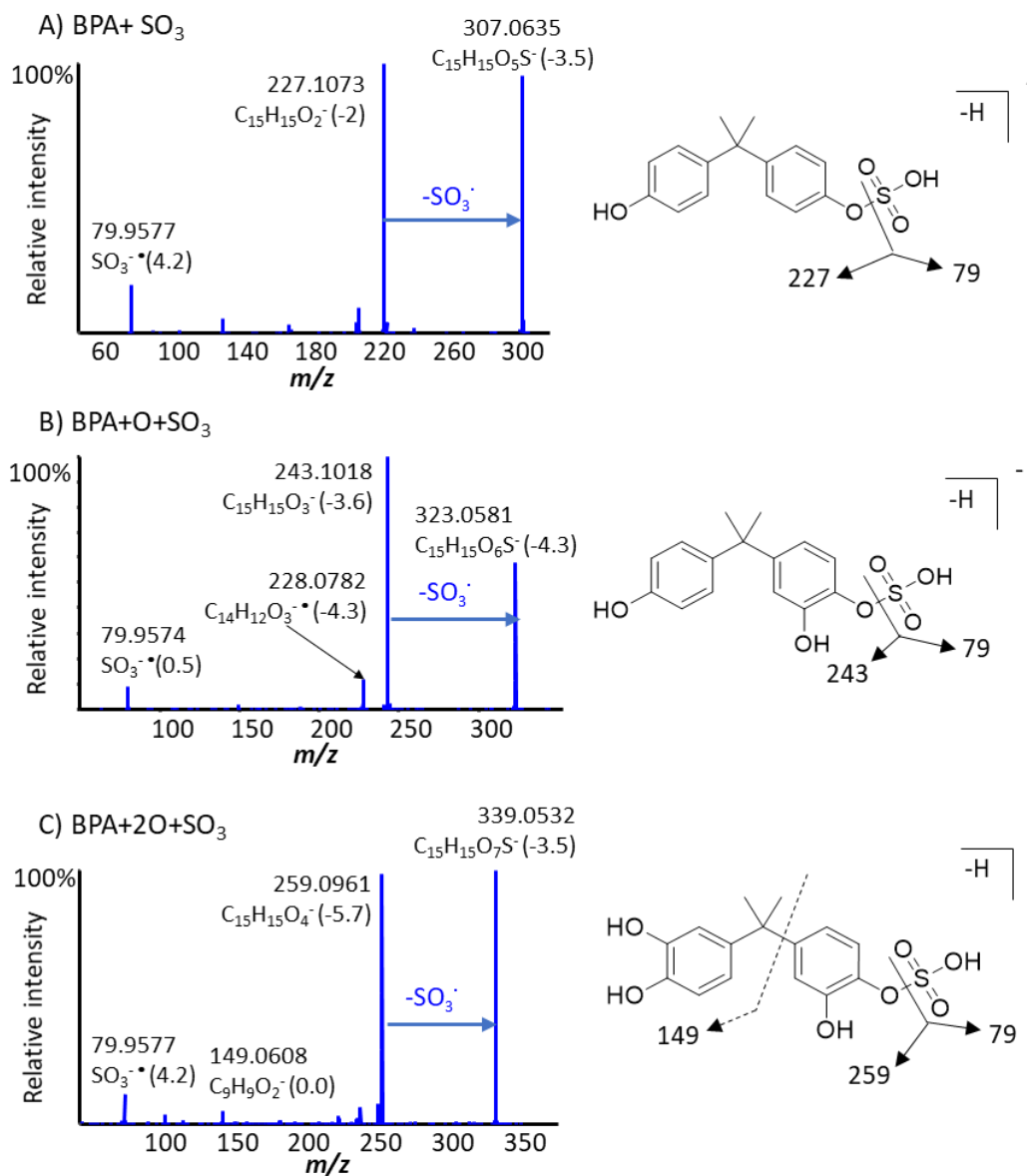


Figure 2.10 HR-MS/MS spectra for sulfate conjugates of BPA with proposed routes of fragmentation; (A) BPA+SO₃; (B) BPA+O+SO₃; (C) BPA+2O+SO₃

CHAPITRE III

ARTICLE 2

IN VITRO METABOLISM OF FIVE BISPHENOL A ANALOGS STUDIED BY LC-HRMS/MS

Ons Ousji and Lekha Sleno

Université du Québec à Montréal, Chemistry Department P.O. Box 8888, Downtown
Station, Montréal, QC, Canada

Running title: *In vitro* metabolism of BPA analogs

Article publié dans la revue scientifique *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2021, 32 (4), 847-859 dans l'édition spéciale : 2020 Sanibel: Exposome
DOI: 10.1021/jasms.0c00301

Contribution des auteurs :

Ons Ousji et Lekha Sleno sont les co-auteurs de ce manuscrit. Ons Ousji a mené la recherche bibliographique, préparé les protocoles expérimentaux, réalisé les expériences, traité les données et préparé le manuscrit. Lekha Sleno a supervisé le projet, vérifié l'analyse des données et l'interprétation des résultats, révisé et finalisé le manuscrit.

3.1 Résumé

Les analogues de structure du bisphénol A (BPA) sont de plus en plus utilisés comme alternatives dans de nombreuses applications industrielles, en raison des évidences croissantes de la toxicité liée au BPA. Malgré leur utilisation répandue, on a peu d'informations sur la biotransformation de ces analogues du BPA dans l'organisme. Dans cette étude, le métabolisme *in vitro* de cinq analogues du BPA (bisphénol AF, bisphénol F, bisphénol S, cumylphénol et tétraméthylbisphénol F) a été étudié, en utilisant des fractions de foie humain et de rat, pour évaluer la formation de métabolites de phase I et de phase II. La spectrométrie de masse en tandem à haute résolution couplée à la chromatographie liquide a été utilisée pour séparer et caractériser plus de cinquante métabolites, dont beaucoup n'avaient pas été reportés auparavant. Les structures de tous les métabolites oxydatifs détectés, des dimères, des adduits GSH et des conjugués glucuronides et sulfates ont été élucidées. Une colonne chromatographique biphenyle à noyau solide a été utilisée pour la séparation de tous les métabolites, ainsi qu'une méthode complémentaire, sur une colonne F5, spécifiquement optimisée pour la séparation des dimères formés par le métabolisme oxydatif. Il existe plusieurs exemples dans ce travail où la combinaison de la haute résolution chromatographique et de la spectrométrie de masse en tandem a été nécessaire pour distinguer les métabolites isomères et les conjugués.

3.2 Abstract

Bisphenol A (BPA) structural analogs are increasingly used as alternatives in many industrial applications, due to growing evidence of BPA-related toxicity. Despite their widespread use, little is known about the biotransformation of these BPA analogs in the body. In this study, the *in vitro* metabolism of five BPA analogs (bisphenol AF, bisphenol F, bisphenol S, cumylphenol, and tetramethylbisphenol F) were investigated, using human and rat liver fractions, to evaluate the formation of phase I and phase II metabolites. Liquid chromatography high-resolution tandem mass spectrometry was employed to separate and characterize over fifty metabolites, many of which were not previously reported. The structures of all detected oxidative metabolites, dimers, GSH adducts, glucuronide, and sulfate conjugates were elucidated. A biphenyl solid-core chromatographic column was utilized for the separation of all metabolites, with a subsequent method, on a F5 column, specifically optimized for the separation of dimers formed via oxidative metabolism. There are several examples in this work where the combination of high chromatographic resolution and tandem mass spectrometry were necessary to distinguish between isomeric metabolites and conjugates.

3.3 Introduction

Bisphenol A (BPA) is widely used in polycarbonate plastic products (including water bottles, food storage containers, sports equipment, and eyeglasses), as well as in epoxy resin liners of canned food and beverage containers, in dental composites and cash register receipts (den Braver-Sewradj *et al.*, 2020; Pelch *et al.*, 2017). BPA is a known endocrine-disrupting chemical and has been reported to cause multiple harmful effects to human health (Michałowicz, 2014). This has led to the banning of BPA in baby bottles, as well as food and beverage containers, in several countries, including Canada, Japan, the European Union, and the United States (Fic *et al.*, 2013). Public concern and government regulation have led many manufacturers to replace BPA with several substitutes (den Braver-Sewradj *et al.*, 2020). In this study, the metabolism of five common BPA alternatives, bisphenol AF (BPAF), bisphenol F (BPF), bisphenol S (BPS), cumylphenol (CUMY) and tetramethylbisphenol F (TMBPF) (Figure 3.1), has been investigated.

BPAF contains two trifluoromethyl groups on the bridging carbon, and it is commonly used as a rubber bridging material for certain fluoroelastomers and as a monomer in the production of polycarbonates, polyamides and polyesters (Fic *et al.*, 2013; Skledar et Mašič, 2016). BPAF was recently reported to induce DNA damage at as low as 1 ng/ml (Mokra *et al.*, 2018). It can also bind strongly to estrogen receptors and to disrupt the balance of hormones in zebrafish (Shi *et al.*, 2015; Skledar et Mašič, 2016).

BPF is a diphenylalkane very similar to BPA, without the two methyls on the bridging carbon. BPF has a broad range of applications needing increased thickness and durability, such as lacquers, industrial floors, road and bridge deck toppings, adhesives plastics, and water pipes, as well as in dental sealants, oral prosthetics, and food packaging (Chen *et al.*, 2016). It has been detected in human urine up to 212 ng/mL, as well as blood and adipose tissue (Cabaton *et al.*, 2008; Rochester et Bolden, 2015). Many studies have reported adverse effects from BPF exposure, (Cabaton *et al.*, 2008;

Fic *et al.*, 2013; Rochester et Bolden, 2015) including DNA strand breaks and oxidative stress in the immune system. It was also shown to affect the antioxidant defense system in newborn mice liver and to perturb lipid, glucose and amino acid metabolism (Meng *et al.*, 2019).

BPS has two phenol groups on either side of a central sulfonyl group. It is stable at high temperatures and resistant to sunlight, (Fic *et al.*, 2013) thus it is used for a variety of industrial applications, including epoxy glues, can coatings and cleaning products (Rochester et Bolden, 2015). It has replaced BPA in thermal paper, commonly used as cash receipts (Chen *et al.*, 2016; Rochester et Bolden, 2015). BPS has been detected in human urine as high as 0.25 µg/L (Ye *et al.*, 2015). The health effects of BPS and BPF were recently reviewed, showing BPS and BPF are as hormonally active as BPA, and therefore have important endocrine-disrupting effects (Rochester et Bolden, 2015).

CUMY has a very similar structure to BPA, with only one less hydroxyl group (Hasegawa *et al.*, 2016). It is a common ingredient in surfactants, antioxidants, fungicides, printing inks and phenolic resins (Chaudhuri et Sharma, 1991). CUMY has been reported to be nephrotoxic and to be a strong binder to the human estrogen-related receptor γ (Hasegawa *et al.*, 2016). It is also an important impurity in industrial-grade BPA, and it is 12 times as active as BPA in the human estrogen receptor α (hER α) assay (Terasaki *et al.*, 2005).

Finally, TMBPF is used as a raw material for the manufacturing of polycarbonate flame retardants and as an antioxidant in rubber compounds. It is also found in epoxy resins, used for coating lightweight metal containers designed for packaging food, and in polycarbonates, phosphate esters and cyano esters (ANSES, 2017). Regarding the endocrine disrupting character of TMBPF, it shows much less estrogen receptor binding than BPA (Soto *et al.*, 2017). On the other hand, Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) predictive models suggest that TMBPF may act as an androgen receptor antagonist (ANSES, 2017; Vinggaard *et al.*, 2008). It is also not currently possible to exclude endocrine disrupting activity from TMBPF metabolites.

Given the many applications of these compounds, it is important to assess their safety and potential biotransformation products. The effects of BPA analogs on human health and the environment have been studied (Chen *et al.*, 2016; Pelch *et al.*, 2017; Pivnenko *et al.*, 2015; Skledar et Mašič, 2016; Usman et Ahmad, 2019), however, metabolism studies are limited (Schmidt *et al.*, 2013a; Skledar et Mašič, 2016). The formation of reactive metabolites is of specific interest in assessing toxicity of these compounds.

As a continuation of previous work on BPA metabolism (Ousji *et al.*, 2020), BPAF, BPF, BPS, CUMY and TMBPF have been investigated to evaluate the formation of oxidative metabolites, reactive metabolites via the detection of glutathione adducts, as well as glucuronide and sulfate conjugates using *in vitro* incubations with human and rat liver fractions with HPLC-HRMS/MS.

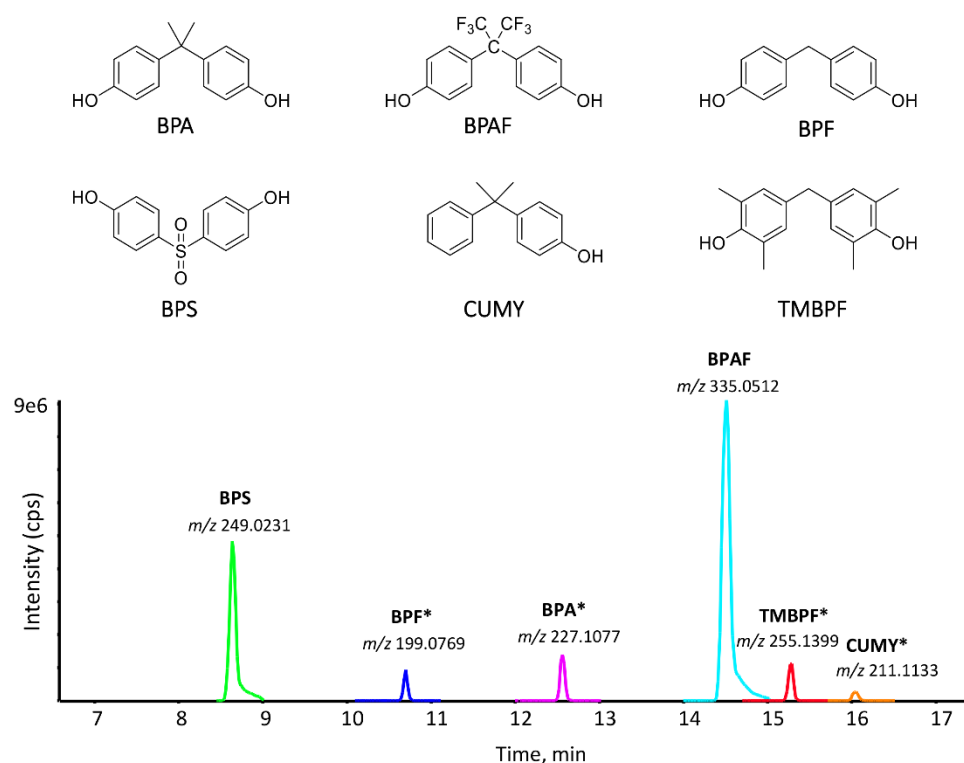


Figure 3.1 Chemical structures and overlaid negative ion mode LC-HRMS extracted ion chromatograms of BPA analogs from control microsomal incubations. Peaks with asterisk (*) were increased by 10x for clarity.

3.4 Methods

Chemicals

Bisphenol A [BPA, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane], bisphenol AF [BPAF, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane], bisphenol F [4,4'-methylenediphenol], bisphenol S [BPS, 4-hydroxyphenyl sulfone], *para*-cumylphenol [CUMY, 4-(2-phenylisopropyl)phenol], tetramethylbisphenol F [TMBPF, 4,4'-methylenebis(2,6-Dimethylphenol)], glutathione (GSH), uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA), 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS), D-saccharic acid 1,4-lactone (saccharolactone), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), glucose-6-phosphate, MgCl₂ and glucose-6-phosphate dehydrogenase, HPLC-grade acetonitrile (ACN) and methanol as well as formic acid (LC-MS grade) were all purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Ultrapure water was from a Millipore Synergy UV system (Billerica, MA). Human and rat liver microsomes (HLM and RLM) and rat liver S9 fractions (RS9) were purchased from Corning (Corning, NY).

In vitro incubations

Oxidative metabolites and GSH adducts

Bisphenols were incubated at 20 μM with human and rat liver microsomes (HLM or RLM, 1mg/ml protein) with a NADPH-regenerating system, containing 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 5 mM glucose-6-phosphate and 2 units/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), as well as 5 mM GSH at 37°C for 1h in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) with a total volume of 300 μL. Control samples were prepared without NADPH regenerating system and/or GSH. The reaction was quenched with cold acetonitrile (1:1), followed by centrifugation (14,000 rpm at 4°C for 8 min). The supernatants (500 μL) were evaporated and reconstituted in 200 μL of 10% acetonitrile prior to LC-MS/MS analysis.

Glucuronidation and sulfation reactions

For glucuronidation reactions, BPA analogs were incubated as above with rat liver microsomes (1 mg/ml protein) and NADPH-regenerating system, adding 2 mM UDPGA and 2.5 mM saccharolactone. Each compound was also incubated with rat S9 fractions (2 mg/ml) in phosphate buffer containing the NADPH regenerating system and 1 mM PAPS to form sulphate conjugates.

LC-HRMS/MS analysis and data processing

LC-MS/MS analyses were performed on a Shimadzu Nexera HPLC coupled to a Sciex 5600 TripleTOF® (quadrupole-time-of-flight) system (Concord, ON, Canada), in positive and negative electrospray modes using a DuoSpray™ ion source.

For oxidative metabolites, GSH adducts and glucuronide conjugates, chromatographic separation was performed using a Kinetex Biphenyl (100 x 2.1 mm, 2.6 µm) column and gradient elution with water containing 0.1% formic acid (A) and 100% ACN (B), at 0.25 ml/min, column temperature of 40°C and injection volume of 25 µl. HPLC gradient started at 5% B for 0.5 min than up to 50% at 15 min and to 95% at 18 min. Dimers were also analyzed on a Kinetex F5 column (100 x 2.1 mm, 2.6 µm) (Phenomenex, Torrance, CA) with a gradient starting at 5% B for 0.5 min, linearly increased to 50% at 12 min and up to 98% at 18 min, held for another 5 min. For detection of sulfate conjugates, the biphenyl column was used, with 5 mM ammonium acetate in water (A) and 100% ACN (B), starting at 5% B for 0.5 min, up to 30% at 8 min, 50% at 12 min and to 85% at 13 min.

Mass spectrometry parameters were as follows: source voltage at 5000 V, curtain gas at 35 psi, drying and nebulizer gases each at 50 psi, source temperature of 450°C and declustering potential of 60 V. TOF-MS spectra (300 ms accumulation time), followed by MS/MS in information-dependent acquisition (IDA) mode on the top 5 ions (150 ms each) were acquired, with nitrogen as collision gas and a collision energy (CE) of 30 ± 10 V. Targeted MS/MS mode was also employed for BPS and CUMY dimers as

well as di-GSH adducts at CE 50 ± 10 V. MS/MS spectra for BPAF dimers were acquired at CE 70 ± 10 V. MetabolitePilot 2.0 (Sciex) software was used to compare control samples with those containing co-factors for metabolism. PeakView 2.2 and MasterView 1.1 (Sciex) were also used for processing data.

3.5 Results and discussion

The *in vitro* metabolism of BPA substitutes (BPAF, BPF, BPS, CUMY, and TMBPF) was studied to elucidate phase I and phase II biotransformation reactions. Both positive and negative ionisation modes were assessed for the detection of these compounds and deprotonated species yielded the highest signal in each case (Figure 3.1), with the exception of BPS, which showed comparable signals in both protonated and deprotonated ions. The CID fragmentation behavior of these compounds was investigated to elucidate biotransformation products (Figure 3.2). For all compounds, the same metabolites were formed in human and rat incubations, with similar profiles. Table 3.1 summarizes negative ion mode LC-HRMS/MS results for the BPA analogs and all detected metabolites. GSH adducts were also characterized by LC-HRMS/MS in positive mode and these results can be found in Table 3.2. All metabolites were confirmed by accurate mass (within 5 ppm) and associated HRMS/MS can be found in supporting information.

Bisphenol AF

BPAF yielded the highest peak intensity of the five BPA analogs in negative ion mode, approximately 100 and 400-fold higher than BPA and CUMY, respectively (Figure 3.1). This large difference in signal intensity could affect the detectability of metabolites, however most metabolites yielded much larger response factors than the unmetabolized compound, especially for phase II conjugates and GSH adducts. Deprotonated BPAF was detected at m/z 335.0521 (3.3 ppm) (Table 3.1). Its CID spectrum (Figure 3.2), had only two fragments at m/z 265.0496 and m/z 68.9958

corresponding to the loss of CHF_3 and to the ion CF_3^- , respectively, similar to a previous study of BPAF fragmentation (Zhao *et al.*, 2016a).

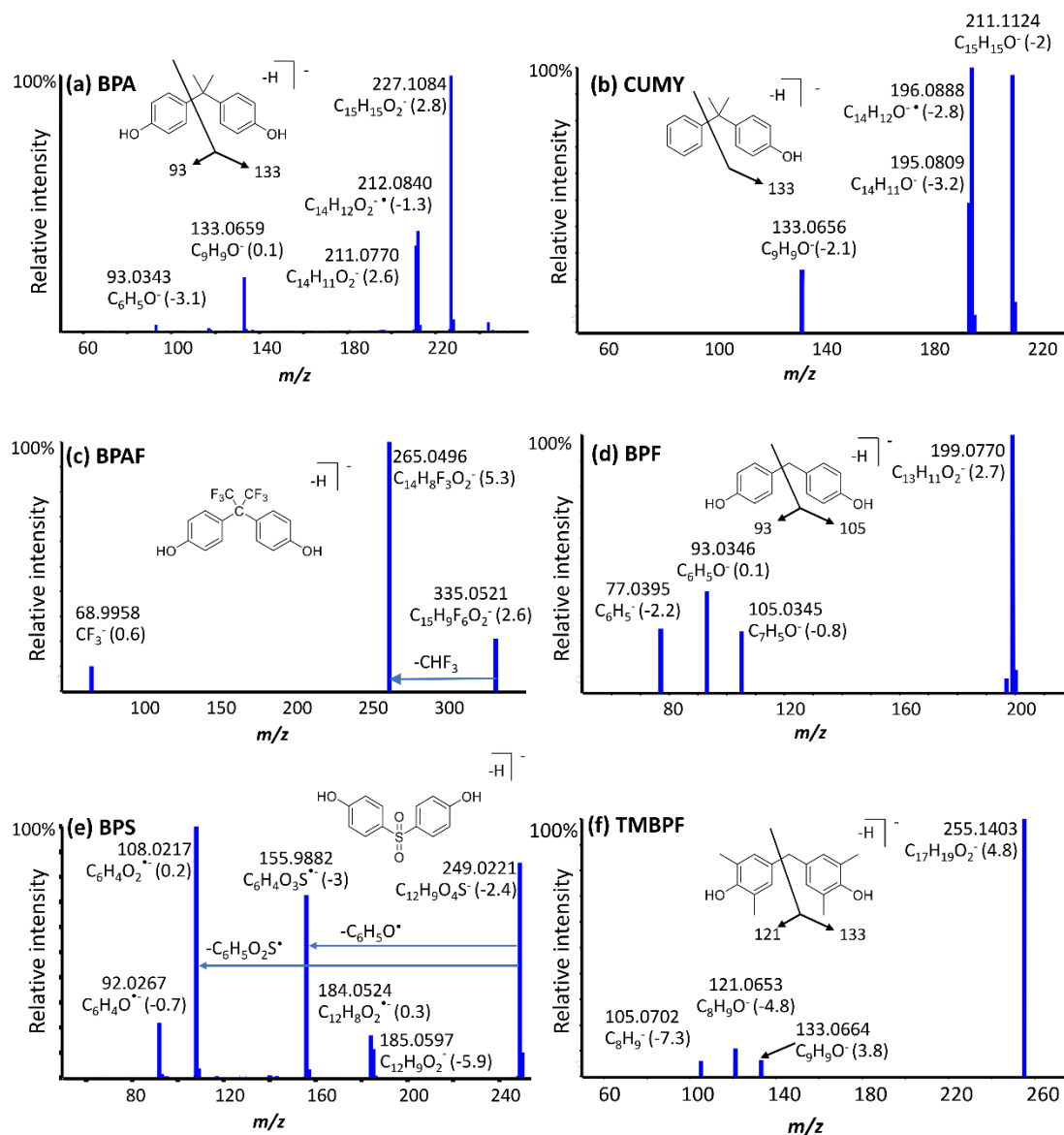


Figure 3.2 High-resolution MS/MS spectra and proposed fragmentation pathways of deprotonated molecules of BPA (a), CUMY (b), BPAF (c), BPF (d), BPS (e) and TMBPF (f).

Table 3.1 Summary of MS/MS data for BPA analogs metabolites in negative ion mode

Biotransformation	Formula	m/z [M-H] ⁻	RT (min)	ppm	Selected MS/MS fragments ^a
BPAF	C ₁₅ H ₁₀ O ₂ F ₆	335.0512	14.5	3.3	<u>265.0496</u> , 68.9958
+O	C ₁₅ H ₁₀ O ₃ F ₆	351.0461	13.3	3.3	281.0441, 261.0382
+O-2H+GSH	C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₉ F ₆ S	656.1142	9.6	0.6	383.0183, 272.0897, 143.0458
C-C dimer ^b	C ₃₀ H ₁₈ O ₄ F ₁₂	669.0934	17.2	0.4	599.0879, 529.0938, <u>511.0986</u> , 335.0611, 68.9962
C-O dimer ^b	C ₃₀ H ₁₈ O ₄ F ₁₂	669.0943	17.6	-1	599.0903, <u>529.0881</u> , 509.0798, 281.0414, 265.0484, 252.0387, 68.9962
+gluc	C ₂₁ H ₁₈ O ₈ F ₆	511.0853	11.7	4	335.0514, 265.0487, 175.0258, <u>113.0247</u>
+O+gluc	C ₂₁ H ₁₈ O ₉ F ₆	527.0794	11.3	2.3	351.0462, 175.0257, 113.0244
+2gluc	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₄ F ₆	687.1163	9.4	1.3	511.0835, 335.0539, 113.0229
+SO ₃	C ₁₅ H ₁₀ O ₅ F ₆ S	415.0091	10.0	2.5	335.0494, 265.0465
+O+SO ₃	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ F ₆ S	432.0102	9.7	0.1	351.0451, 281.0388
BPF	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	199.0769	10.7	2.5	105.0345, 93.0346, 77.0395
+O	C ₁₃ H ₁₂ O ₃	215.0719	9.0	2.5	121.0288, 109.0288, 93.0339
+2O	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	231.0671	7.6	3.7	121.0294, 109.0297
-2H+GSH	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₈ S	504.1455	5.6	1.9	<u>306.0775</u> , 288.0665, 272.0901, 254.0782, 160.0070, 143.0459, 128.0349
-2H+GSH (2)	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₈ S	504.1459	7.5	2.7	272.0898, 254.0791, 231.0496, 210.0897, 179.0475, 146.0457, 143.0463, 128.0352
+O-2H+GSH	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₉ S	520.1404	6.6	1.7	<u>272.0902</u> , 254.0797, 247.0445, 210.0890, 179.0477, 146.0459, 143.0466, 128.0356
+2O-2H+GSH	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₁₀ S	536.1350	5.9	1.1	272.0895, 263.0380, 254.0775, 143.0460, 128.0348
phenol- 2H+GSH	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₇ S	398.1031	3.7	1.7	272.0893, 254.0784, 210.0884, <u>143.0466</u> , 128.0358, 125.0073
methylphenol- 2H+GSH	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₇ S	412.1189	4.2	1.3	<u>306.0772</u> , 272.0894, 254.0786, 160.0075, 143.0464, 128.0354
+O-4H+2GSH	C ₃₃ H ₄₂ N ₆ O ₁₅ S ₂	825.2096	5.5	2.4	719.1701, 696.1656, 552.1110, 518.1219, 306.0782, 279.0170, <u>272.0908</u> , 245.0303, 143.0465, 128.0353
C-C dimer	C ₂₆ H ₂₂ O ₄	397.1461	14.7	4	379.1340, 303.1043, 93.0346
C-O dimer	C ₂₆ H ₂₂ O ₄	397.1457	16.1	3.2	303.1043, 215.0728, 214.0639, 213.0550, 93.0339
+gluc	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	375.1094	8.5	2.5	199.0773, 175.0245, <u>113.0248</u> , 85.0295
+O+gluc	C ₁₉ H ₂₀ O ₉	391.1039	8.1	1.3	215.0725, 175.0258, 113.0250
+SO ₃	C ₁₃ H ₁₂ O ₅ S	279.0344	7.0	4.3	<u>199.0757</u> , 79.9581
+O+SO ₃	C ₁₃ H ₁₂ O ₆ S	295.0292	6.7	3.7	<u>215.0709</u> , 79.9580
+2O+SO ₃	C ₁₃ H ₁₂ O ₇ S	311.0238	5.8	2.3	<u>231.0655</u> , 109.0294, 79.9579
BPS	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ S	249.0231	8.7	1.7	185.0597, 184.0524, 155.9892, <u>108.0217</u> , 92.0267
+O	C ₁₂ H ₁₀ O ₅ S	265.0182	7.5	2.3	171.9848, 156.9972, 124.0166, 108.0218, 93.0342
+2O	C ₁₂ H ₁₀ O ₆ S	281.0127	6.3	0.9	172.9920, 171.9845, 124.0162, 109.0289, 108.0211
+O-2H+GSH	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₁₁ S ₂	570.0852	5.6	-1	<u>296.9885</u> , 272.0873, 203.9543, 139.9929

C-C dimer ^c	C ₂₄ H ₁₈ O ₈ S ₂	497.0366	11.4	-0.8	340.0422, <u>323.0404</u> , 322.0312, 275.0736, 259.0755, 247.0075, 199.0401, 156.9952, 108.0217
C-O dimer ^c	C ₂₄ H ₁₈ O ₈ S ₂	497.0370	13.2	0.1	433.0754, <u>340.0418</u> , <u>339.0343</u> , 312.0467, 265.0197, 264.0100, 232.0205, 171.0452, 123.0085, 92.0265
+gluc	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₀ S	425.0555	6.9	1.7	<u>249.0244</u> , 175.0260, 113.0251
+O+gluc	C ₁₈ H ₁₈ O ₁₁ S	441.0500	6.6	0.9	<u>265.0178</u> , 113.0248
+SO ₃	C ₁₂ H ₁₀ O ₇ S ₂	328.9797	5.9	0.6	<u>249.0213</u> , 155.9888, 108.0215
+O+SO ₃	C ₁₂ H ₁₀ O ₈ S ₂	344.9744	5.4	0.1	<u>265.0189</u> , 124.0158
CUMY					
	C ₁₅ H ₁₆ O	211.1133	16.1	2.5	<u>196.0888</u> , 195.0809, 133.0656
+O	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	227.1087	14.3	4.5	212.0845, 211.0768, 149.0605
+2O	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	243.1028	10.9	0.7	228.0790, 227.0726, 149.0592, 133.0656, 93.0344
+O-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₈ S	532.1774	9.7	2.8	<u>272.0900</u> , 259.0810, 254.0797, 179.0466, 146.0461, 143.0467, 128.0355, 74.0248
+2O-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₉ S	548.1712	8.4	0.7	306.0787, 275.0760, 272.0902, 254.0797, 179.0465, 143.0463, 128.0350
+O-4H+2GSH	C ₃₅ H ₄₆ N ₆ O ₁₄ S ₂	837.2454	7.6	1.7	719.1673, 708.2046, 564.1458, 530.1571, 306.0776, 291.0533, <u>272.0904</u> , 210.0809, 143.0467, 128.0353
C-C dimer ^c	C ₃₀ H ₃₀ O ₂	421.2169	15.2 ^d	-0.8	406.1927, <u>405.1860</u> , 403.2053, 387.1733, 301.1205
+gluc	C ₂₁ H ₂₄ O ₇	387.1461	12.8	3.2	211.1140, 1750255, <u>113.0247</u> , 85.0296
+O+gluc	C ₂₁ H ₂₄ O ₈	403.1409	12.2	2.7	227.1092, 175.0260, 1130248, 85.0293
+SO ₃	C ₁₅ H ₁₆ O ₄ S	291.0705	10.4	3.1	<u>211.1122</u> , 196.0885, 79.9572
+O+SO ₃	C ₁₅ H ₁₆ O ₅ S	307.0656	10.1	3.5	<u>227.1074</u> , 212.0838, 79.9580
+2O+SO ₃	C ₁₅ H ₁₆ O ₆ S	323.0603	7.9	2.7	<u>243.1024</u> , 228.0786, 79.9578
TMBPF					
	C ₁₇ H ₂₀ O ₂	255.1399	15.3	3.3	133.0664, 121.0653, 105.0702
+O	C ₁₇ H ₂₀ O ₃	271.1351	12.9	4.2	<u>269.1192</u> , 253.1242, 241.1241, 121.0657, 119.0493
-2H+GSH	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₈ S	560.2079	8.5	1.4	<u>306.0762</u> , 160.0082, 128.0352
-2H+GSH (2)	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₈ S	560.2072	10.1	-0.1	306.0758, <u>272.0883</u> , 254.0779, 179.0458, 143.0461
dimethylphenol -2H+ GSH	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₇ S	426.1353	5.6	3.1	272.0894, 254.0790, 143.0458, 128.0347
trimethylpheno l-2H+ GSH	C ₁₉ H ₂₇ N ₃ O ₇ S	440.1509	6.1	2.9	<u>306.0773</u> , 272.0895, 160.0076, 143.0461, 128.0350
+gluc	C ₂₃ H ₂₈ O ₈	431.1720	11.7	2.2	255.1406, 175.0262, 113.0249, 85.0294
+SO ₃	C ₁₇ H ₂₀ O ₅ S	335.0973	9.3	4.3	<u>255.1389</u> , 79.9579
+O+SO ₃	C ₁₇ H ₂₀ O ₆ S	351.0912	7.4	1.4	336.0667, 271.1318, 256.1093, 255.1024, 137.0610, 79.9580

a: fragment ions of >10% relative intensity relative, the base peak in each spectrum is underlined; MS/MS spectra were acquired CE 70 V (b), and CE 50 V (c); d: retention time on the F5 column

Extracted ion chromatograms of oxidative metabolites of BPAF are shown in Figure 3.9 Hydroxylated BPAF (BPAF+O) was detected at 13.3 min (m/z 351.0461, 3.3 ppm). Its HRMS/MS spectrum (Figure 3.10a) showed two fragment ions at m/z 281.0441 and 261.0382, corresponding to the loss of CHF_3 and an additional HF. Two BPAF dimers (2BPAF-2H) were detected at 17.2 and 17.6 min (m/z 669.09) (Figure 3.9a). A higher CE of 70 V was necessary to compare the two MS/MS spectra of these dimers (Figure 3.11). Common fragment ions were seen at m/z 599.09 and 529.08 (loss of one and two CHF_3 groups, respectively), as well as the CF_3^- ion at m/z 68.99. However, the dimer at 17.6 min yielded a characteristic ion at m/z 281.9414 (loss of $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{F}_6\text{O}$ and CHF_3), with three oxygen atoms remaining, confirming it to be the C-O dimer and the C-C dimer at 17.2 min showed a unique fragment ion at m/z 335.0611 (loss of BPAF). These dimers yielded the same elution order as previously seen for BPA dimers (Ousji *et al.*, 2020). Li *et al.* (Li *et al.*, 2018) previously studied the transformation of bisphenol AF by manganese dioxide (MnO_2) and detected isomers of dimeric BPAF and proposed their formation as a result radical coupling.

One GSH adduct corresponding to BPAF+O-2H+GSH was detected (Figure 3.3a) at 9.6 min with m/z 656.1142 ($\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{F}_6\text{O}_9\text{N}_3\text{S}^-$, 0.6 ppm). Its HRMS/MS showed an interesting peak at m/z 383.0183 ($\text{C}_{15}\text{H}_9\text{F}_6\text{O}_3\text{S}^-$, 0.2 ppm) (Figure 3.10b), corresponding to deprotonated BPAF+O+S. The *ortho*-catechol metabolite (BPAF+O) is further oxidized into the reactive *o*-quinone (-2H) followed by GSH addition, which recovers the aromaticity (Zheng *et al.*, 2007). When BPA metabolism was studied previously, we detected GSH adducts of cleavage products (phenol and isopropyl phenol). For BPAF, however, GSH adducts of cleavage products were not detected. This could be explained by the electronegative CF_3 moieties, lessening the potential for homolytic cleavage.

Three glucuronide conjugates were detected (Figure 3.4, Table 3.1), including the mono-glucuronide (BPAF+gluc) at m/z 511.0853 ($\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{O}_8\text{F}_6^-$, 4 ppm), the di-glucuronide (BPAF+2gluc) detected with m/z 687.1163 ($\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{O}_{14}\text{F}_6^-$, 1.3 ppm), and

the oxidized glucuronide (BPAF+O+gluc) at m/z 527.0794 ($C_{21}H_{17}O_9F_6^-$, 2.3 ppm). The MS/MS spectra of the three conjugates (Figures 3.10) showed characteristic ions from the glucuronide moiety, including m/z 175 and 113. Li et al. (Li *et al.*, 2013b) studied the metabolism of BPAF *in vitro* using HLM and *in vivo* in rat urine, where BPAF+gluc, and BPAF+2gluc were both detected.

Two BPAF sulfate conjugates were formed (Figure 3.4) corresponding to BPAF+SO₃ at m/z 415.0091 ($C_{15}H_9F_6O_5S^-$, 2.5 ppm) and BPAF+O+SO₃ at m/z 432.0102 ($C_{15}H_9F_6O_6S^-$, 0.1 ppm). CID spectra for both sulfate conjugates (Figure 3.10f and g) exhibited a facile neutral loss of SO₃. BPAF+SO₃ has previously been reported *in vitro* and *in vivo* (Li *et al.*, 2013b; Waidyanatha *et al.*, 2015).

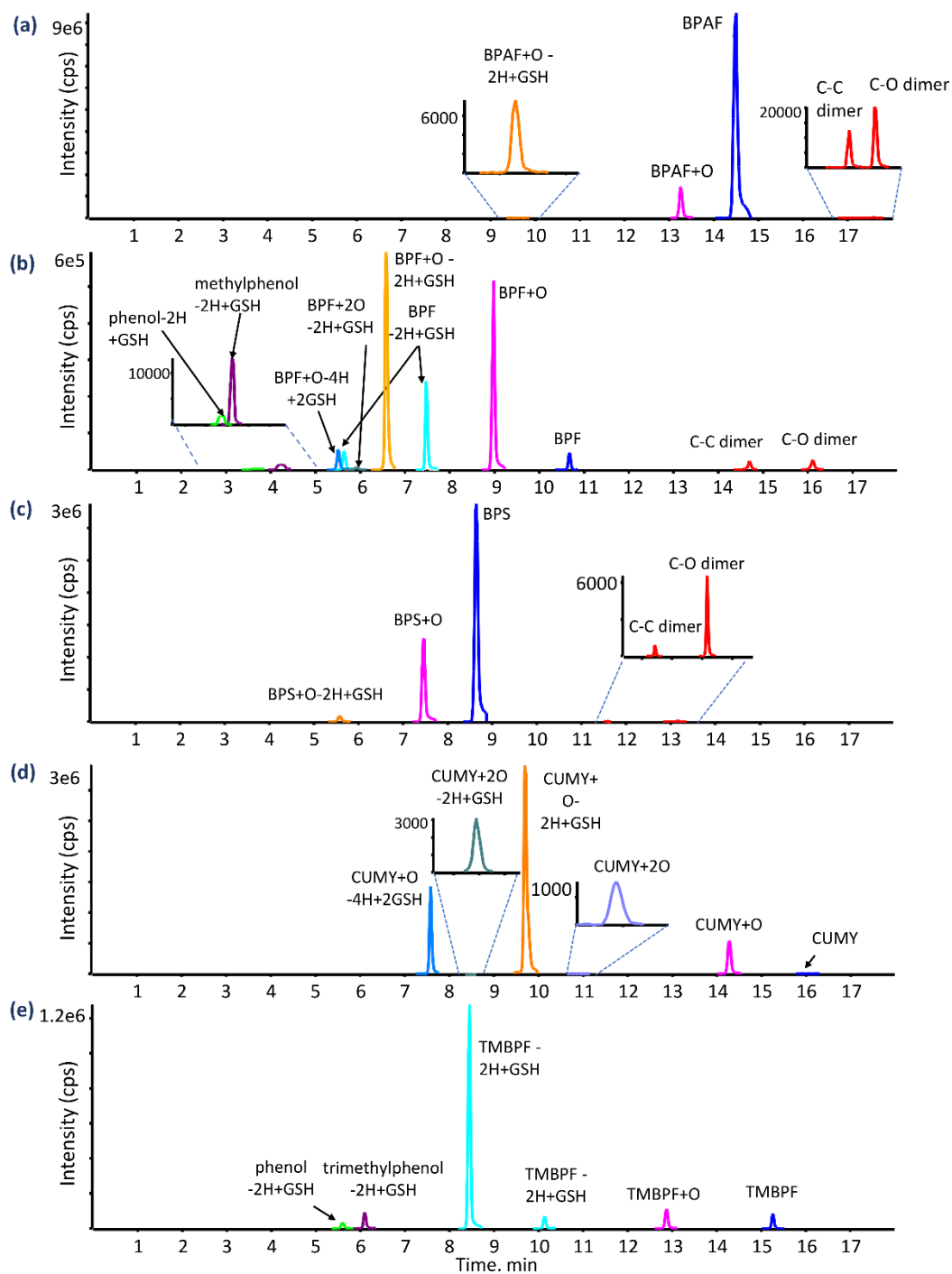


Figure 3.3 Extracted ion LC-MS chromatograms, in negative ion mode, of oxidative metabolites and GSH adducts of BPAF (a), BPF (b), BPS (c), CUMY (d) and TMBPF (e).

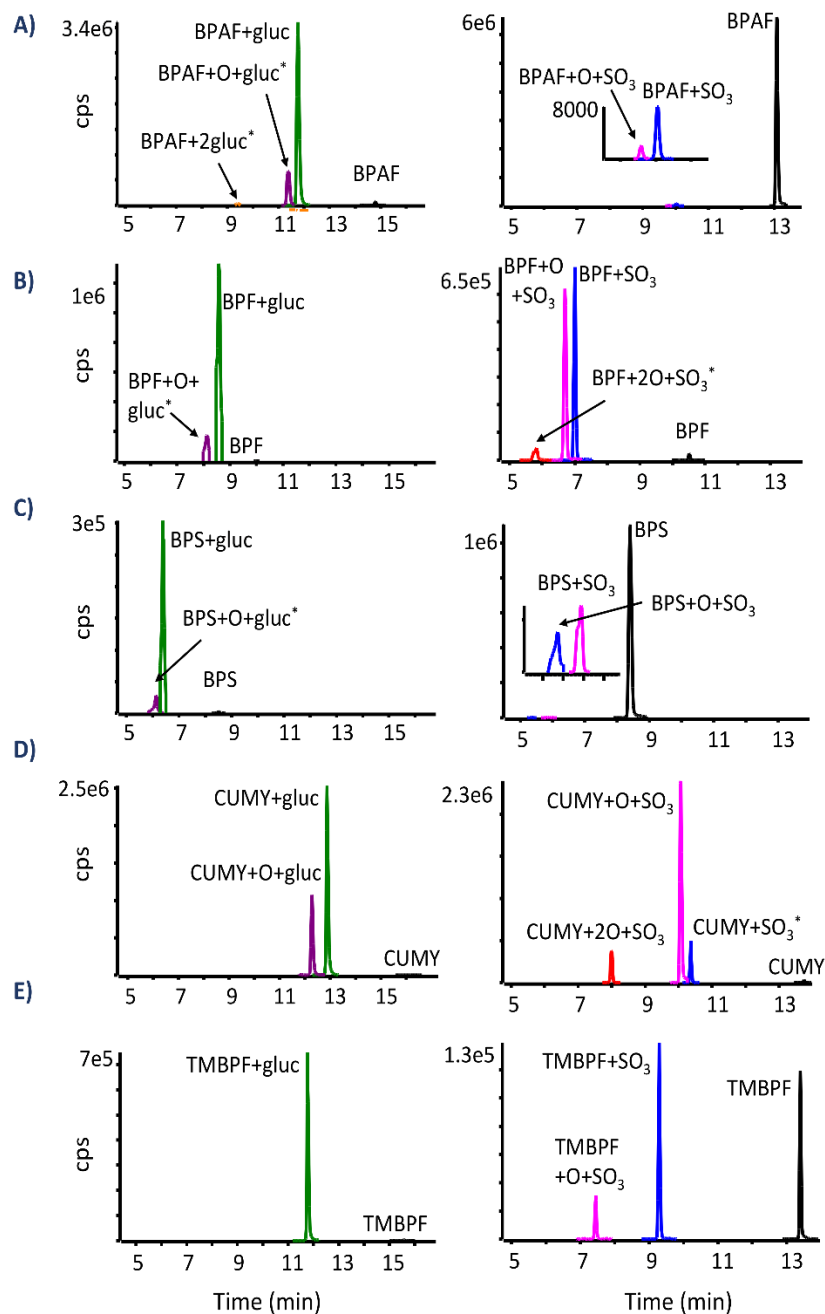


Figure 3.4 Extracted ion LC-MS chromatograms of glucuronide and sulfate conjugates of BPAF (a), BPF (b), BPS (c), CUMY (d) and TMBPF (e). Peaks with asterisk (*) were increased by 5x.

Bisphenol F

BPF yielded a relatively small signal (Figure 3.1) for its deprotonated molecule (m/z 199.0769, $C_{13}H_{11}O_2^-$, 2.5 ppm) at 10.7 min. Its CID spectrum (Figure 3.2) yielded major product ions at m/z 105.0345, 93.0346, and 77.0395, assigned as $C_7H_5O^-$, $C_6H_5O^-$ (deprotonated phenol) and $C_6H_5^-$ (deprotonated benzene), respectively, consistent with those reported previously (Gallart-Ayala *et al.*, 2011).

Under oxidative conditions, hydroxylated BPF (BPF+O) was detected (Figure 3.9b) at m/z 215.0719 (2.5 ppm) at 9.0 min, with a characteristic fragment ion at m/z 109.0288, corresponding to the catechol ion, $C_6H_5O_2^-$ (Figure 3.12a). Based on previous results with isotopically-labeled BPA (Ousji *et al.*, 2020), the addition of the oxygen atom was proven to occur in the *ortho* position. Only one peak for BPF+O was detected, similar to BPA. Dihydroxylated BPF (BPF+2O) was detected at m/z 231.0671 ($C_{13}H_{11}O_4^-$, 3.7 ppm) and 7.6 min. Two interesting fragment ions were found in the MS/MS spectrum (Figure 3.12b) at m/z 109.0297 and 121.0294, corresponding to the $C_6H_5O_2^-$ and $C_7H_5O_2^-$, respectively, proving the two oxygen atoms were added to different rings. This metabolite was also detected by Cabaton *et al.* (Cabaton *et al.*, 2008), with the same fragment ions and 1H NMR results confirmed that the two hydroxyl groups were positioned *ortho* to original hydroxyl groups of BPF.

Two BPF dimers ($C_{26}H_{22}O_4$) were detected, at 14.7 and 16.1 min (Figure 3.9b), with m/z 397.15. The later eluting dimer yielded a few unique ions, including m/z 215.0728 ($C_{13}H_{11}O_3^-$, 6.6 ppm), 214.0639 ($C_{13}H_{10}O_3^-$, 1.7 ppm) and m/z 213.0550 ($C_{13}H_9O_3^-$, -3.4 ppm) (Figure 3.13), indicating that it is the C-O dimer and the earlier isomer at 14.7 min is the C-C dimer. The elution order was again similar to BPA and BPAF dimers. Cabaton *et al.* (Cabaton *et al.*, 2008), detected two metabolites more hydrophobic than BPF in their incubations, and identified one of these as the BPF C-O dimer using 1H NMR (Cabaton *et al.*, 2008).

Several GSH adducts of BPF were formed (Figure 3b), including BPF-2H+GSH, BPF-2H+O+GSH, BPF-2H+2O+GSH, BPF+O-4H+2GSH, methylphenol-2H+GSH and phenol-2H+GSH. Two isomers of BPF-2H+GSH were detected, and their MS/MS spectra were compared (Figure 3.5). The most prominent fragment ion for the isomer at 5.6 min was m/z 306.0775 (3.2 ppm), corresponding to deprotonated GSH. Based on this, we proposed the formation of quinone methide intermediate followed by the addition of GSH on the central C-atom. The second BPF-2H+GSH peak, at 7.5 min, did not form m/z 306 upon CID and instead had a unique fragment ion at m/z 231.0496, assigned as deprotonated BPF with the sulfur still attached. In the case of BPA, the glutathione was added to the *ortho* position in BPA-2H+GSH, via the formation of an epoxide-intermediate followed by GSH addition with a concerted loss of water (Ousji *et al.*, 2020).

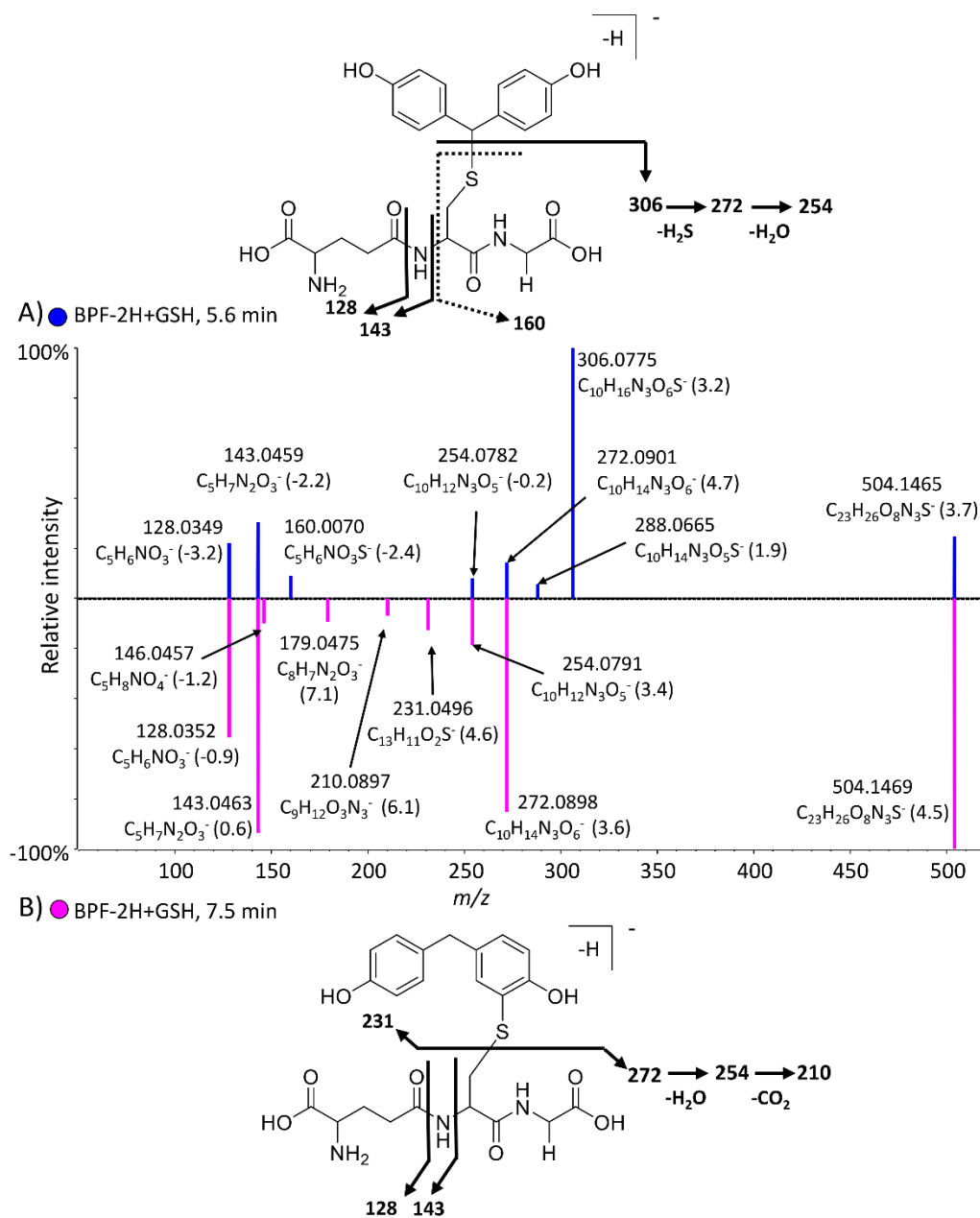


Figure 3.5 Mirror plot of BPF-2H+GSH isomers with proposed routes of fragmentation in negative mode (a) BPF-2H+GSH at 5.6 min and (b) BPF-2HGSH at 7.5 min.

The BPF+O-2H+GSH adduct was detected at m/z 520.1404 (1.7 ppm), with characteristic fragment ions from the glutathione moiety (Dieckhaus *et al.*, 2005) at m/z 272.0902, 254.0797, 143.0466, 128.0356. An additional fragment ion at m/z 247.0445 conserved the bond between the sulfur of GSH to hydroxylated BPF (Figure 3.6a). This adduct is formed via GSH binding to the *ortho*-quinone reactive metabolite of BPF. Of all these GSH adducts, only the BPF-2H+GSH and BPF+O-2H+GSH adducts were previously reported, in HLM and recombinant CYP incubations (Schmidt *et al.*, 2013a).

BPF+2O-2H+GSH was detected with a relatively small signal but with high quality MS/MS data acquired in data-dependent mode (Figure 3.12c). The same characteristic GSH fragment ions were seen, in addition to deprotonated BPF+2O+S at m/z 263.0372. Similar to BPA, GSH adducts of BPF cleavage products (methylphenol and phenol) were detected, yielding deprotonated molecules at m/z 412.1189 ($C_{17}H_{22}O_7N_3S^-$, 1.3 ppm) and m/z 398.1031 ($C_{16}H_{20}O_7N_3S^-$, 1.7 ppm), respectively. Their MS/MS spectra are presented in Figure 3.12. The same metabolic pathway as BPA is rationalized for BPF, via homolytic cleavage and GSH addition in each *para*-position.

Another novel GSH adduct of BPF, with a peak at 5.5 min, was identified as di-GSH conjugate of hydroxylated BPF (BPF+O-4H+2GSH) at m/z 825.2096 ($C_{33}H_{41}O_{15}N_6S_2^-$, 2.4 ppm). As was the case for the similar BPA adduct (Ousji *et al.*, 2020), its HRMS/MS spectra (Figure 3.6b) has a characteristic ion at m/z 719.1701 ($C_{26}H_{35}N_6O_{14}S_2^-$, 6 ppm), corresponding to two molecules of GSH bound to the hydroxylated phenolic ring.

With the addition of UDPGA, BPF glucuronide (BPF+gluc) and hydroxylated BPF glucuronide (BPF+O+gluc) were detected at m/z 375.1094 (8.5 min) and m/z 391.1039 (8.1 min), respectively (Figure 3.4b). The MS/MS spectra of both conjugates were dominated by characteristic peaks of the glucuronide moiety at m/z 175, m/z 113, and m/z 85 (Figure 3.12).

Three sulfate conjugates were also found (Figure 3.4b), namely BPF sulfate (BPF+SO₃) at 7.0 min (*m/z* 279.0344), a hydroxylated sulfate conjugate (BPF+O+SO₃) at 6.7 min (*m/z* 295.0292) and a di-hydroxylated sulfate BPF (BPF+2O+SO₃) at 5.8 min (*m/z* 311.0238). Their HRMS/MS spectra are also presented in Figure 3.12. The CID spectrum of BPF+2O+SO₃ metabolite showed an interesting peak with *m/z* 109.0294 (C₆H₅O₂⁻, -0.9 ppm), consistent with each phenolic ring being mono-hydroxylated. This metabolite had not previously been reported.

Overall, BPF showed a very similar *in vitro* metabolic profile to BPA (Ousji *et al.*, 2020). Recently, Skledar *et al.* (Skledar *et Mašič*, 2016) reviewed previous work on BPF metabolism. All previously characterized metabolites, with the exception of 4-(hydroxymethyl)phenol, have been identified here as well as several novel metabolites, including BPF+2O-2H+GSH, BPF+O-4H+2GSH, phenol-2H+GSH, methylphenol-2H+GSH, BPF C-C dimer, BPF+O+gluc, BPF+O+SO₃ and BPF+2O+SO₃.

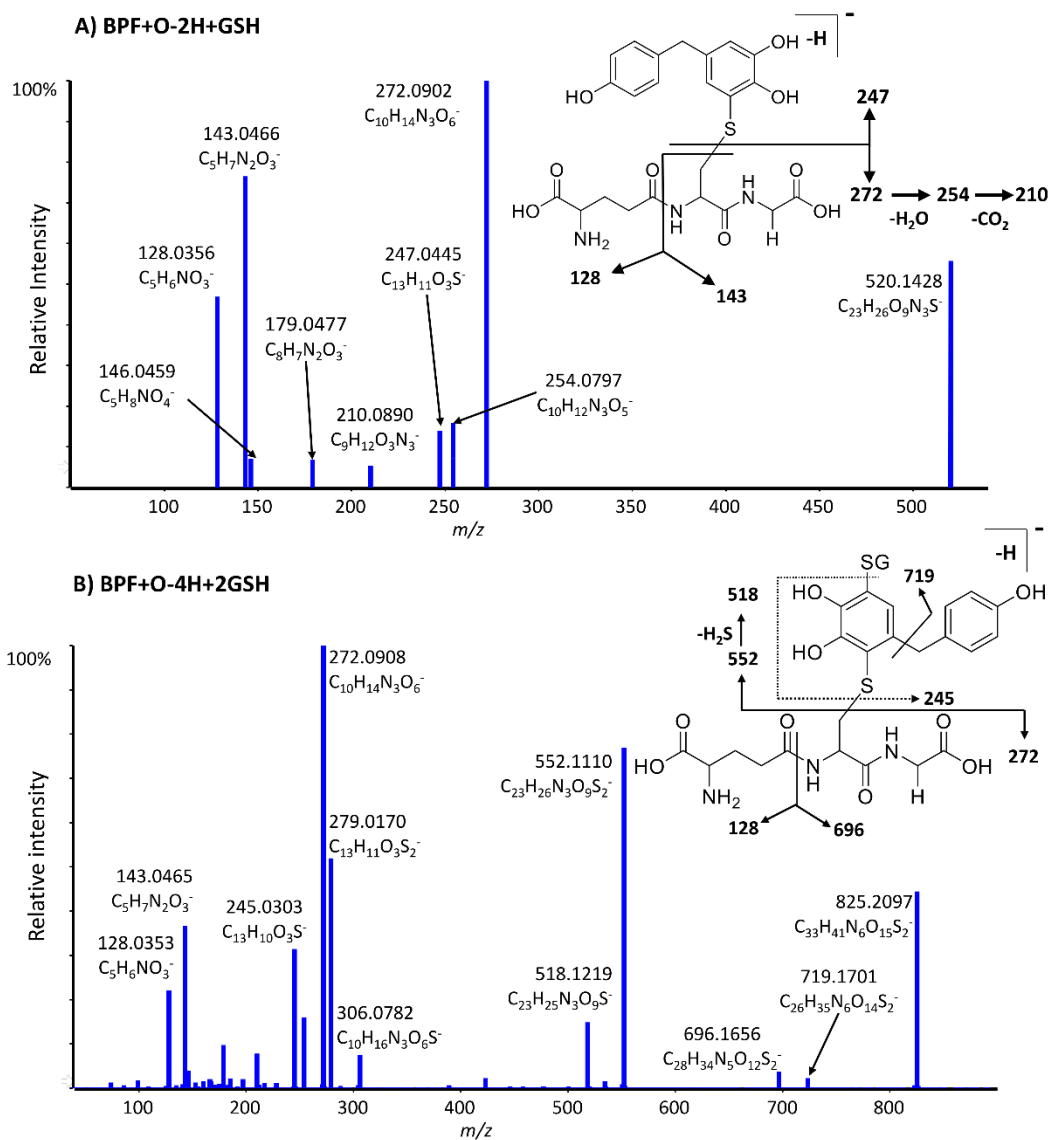


Figure 3.6. High-resolution MS/MS spectra and proposed fragmentation pathways of BPF+O-2H+GSH (a), BPF+O-4H+2GSH (b). All fragments ions were within 10 ppm proposed ion formula.

Bisphenol S

BPS is a unique BPA analog since it has a sulfonyl group between the two phenol rings. It is also the only analog that was detected well in both negative and positive ion mode. The deprotonated molecule $[M-H]^-$ was detected at m/z 249.0231 (1.7 ppm), with prominent product ions at m/z 185.0597, 184.0524, 155.9882, 108.0217, and 92.0267, due to the neutral losses of SO_2 , HSO_2^* , $C_6H_5O^*$, $C_6H_5O_2S^*$, and $C_6H_5O_3S^*$, respectively. Similar ions were detected by Gallart-Ayala et al. (Gallart-Ayala *et al.*, 2011) on a triple quadrupole instrument. The MS/MS spectrum of BPS in positive mode is presented in Figure 3.14a, having similar fragmentation but with an extra ion at m/z 65.0390 ($C_5H_5^+$). A unique feature of ionized BPS is its ability to rearrange during CID. BPS formed one hydroxylated metabolite (BPS+O) at 7.5 min (m/z 265.0182) and one dihydroxylated metabolite (BPS+2O) at 6.3 min (m/z 281.0127) (Figure 3.14), both of which have been previously reported *in vitro*. (Gys *et al.*, 2018) BPS also formed two dimers (BPS-2H) at 11.4 and 13.2 min (Figure 3.9). The later eluting dimer (Figure 3.15) had product ions at m/z 265.0197 and 264.0100, corresponding to $C_{12}H_9O_5S^-$ and $C_{12}H_8O_5S^*$, respectively, proving it to be the C-O dimer. The BPS dimer eluting at 11.4 min is therefore the C-C dimer. The difference in intensities of BPS dimers can be explained by the fact that the formation of C-C dimer is less accessible due to steric hindrance from the sulfonyl groups. This is the first report describing BPS dimers from *in vitro* microsomal incubations; however, BPS dimers were previously found to form in the presence of manganese dioxide (MnO_2) (Li *et al.*, 2018).

One GSH adduct was detected at 5.6 min, corresponding to BPS+O-2H+GSH (Figure 3c). Its CID spectrum (Figure 3.14) has a characteristic fragment ion at m/z 296.9885 ($C_{12}H_9O_5S_2^-$, -4.0 ppm) corresponding to hydroxy BPS with the sulphur atom of GSH attached. Like BPAF, no di-GSH adducts or GSH conjugates of cleavage products were detected for BPS.

BPS glucuronide (BPS+gluc) and hydroxylated BPS glucuronide (BPS+O+gluc) were detected (Figure 3.4c), at 6.9 min (m/z 425.0555) and 6.6 min (m/z 441.0500), respectively. Their HRMS/MS spectra are presented in Figures 3.14. BPS sulfate (BPS+SO₃) and hydroxylated BPS sulfate (BPS+O+SO₃) were detected at 5.9 min (m/z 328.9797) and 5.4 min (m/z 344.9744), respectively. These glucuronide and sulfate conjugates, with the exception of BPS+O+SO₃, have been previously reported in human liver and intestinal microsomes and recombinant CYP enzymes (Gys *et al.*, 2018; Skledar *et al.*, 2016), however, no GSH adducts were reported.

Cumylphenol

CUMY is the most hydrophobic analog and showed a very modest signal in negative mode, eluting at 16.2 min (Figure 3.1). Major product ions of its deprotonated molecule (m/z 211.1133) were detected at m/z 196.0888, 195.0809 and 133.0656, corresponding to neutral losses of CH₃[•], CH₄ and the formation of an isopropenylphenol ion (C₉H₉O⁻), respectively (Figures 3.2e).

Extracted ion chromatograms of oxidative metabolites (Figure 3.9d) show the formation of hydroxylated CUMY (CUMY+O) and di-hydroxylated CUMY (CUMY+2O) at 14.3 and 10.9 min, respectively. Despite the same formula of CUMY+O and BPA (C₁₅H₁₆O₂), their retention times are quite different (14.3 min vs 12.6 min), indicating two distinct structures. Deprotonated CUMY+O dissociates to form an interesting peak at m/z 149.0605 (C₉H₉O₂⁻), confirming the addition of the oxygen atom to the hydroxylated ring, not to the benzyl moiety (Figure 3.17a). HRMS/MS of CUMY+2O presented two significant peaks at m/z 93.0344 and m/z 149.0592, corresponding to deprotonated phenol and isopropyl catechol ions, proving the second oxidation occurs on the benzene ring (Figure 3.17b). These results exemplify perfectly that LC-HRMS/MS is an effective technique to differentiate isomers and elucidate metabolite structures.

Due to the hydrophobic character of CUMY, no dimer was detected using the gradient used initially. A different column (F5) with a steeper gradient was able to achieve better detectability for the bisphenol dimers (Figure 3.7), including only one dimer for CUMY as expected from its asymmetric structure. The HRMS/MS spectrum confirmed it to be a C-C dimer due to the absence of a peak at m/z 227 (characteristic ion of C-O dimer) and the loss of water due to the proximity of both hydroxyl groups (Figure 3.17k).

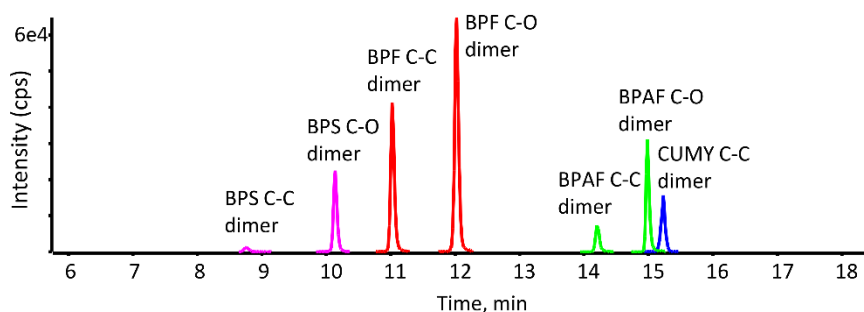


Figure 3.7 LC-MS traces of deprotonated dimers from BPA analogs formed in HLM using a modified gradient on the F5 HPLC column.

Three GSH adducts were detected (Figure 3.3d), corresponding to CUMY+O-2H+GSH at 9.7 min, CUMY+2O-2H+GSH at 8.4 min and a di-glutathione adduct CUMY+O-4H+2GSH at 7.6 min. No peaks were detected for CUMY-2H+GSH or those associated to any cleavage products. The HRMS/MS of CUMY+O-2H+GSH is dominated by characteristic peaks from the GSH moiety (m/z 272, 146, 143, 128 and 74), with the exception of m/z 259.0810 ($C_{15}H_{15}O_2S^-$, 4.5 ppm), where the sulfur atom of GSH is still bound to deprotonated hydroxylated CUMY (Figure 3.17c). As in the case of the other BPA analogs, the CUMY+O-2H+GSH is the result of the formation of the reactive quinone followed by the GSH addition to the ring. CUMY+2O-2H+GSH yields the same formula of BPA+O-2H+GSH ($C_{25}H_{31}N_3O_9S$), but the two have different retention times (8.4 min vs. 7.9 min), indicating different structures. Similar to BPA and BPF, CUMY also formed a di-glutathione adduct, with a fragment

ion at m/z 719.1673 ($C_{26}H_{35}N_6O_{14}S_2^-$), corresponding to two molecules of GSH bound to a catechol ring (Figure 3.17e). Therefore, a similar mechanism as the formation of BPF and BPA di-GSH conjugates was confirmed.

CUMY also formed similar glucuronide conjugates as BPA (Figure 3.4d), namely CUMY+gluc and CUMY+O+gluc at 12.8 and 12.2 min, respectively. Their MS/MS are presented in Figure 3.17, with ions mostly from glucuronide moiety (m/z 175, 113 and 85). Three sulfate conjugates were detected, including CUMY+SO₃ at 10.4 min (m/z 291.0705, 3.1 ppm), CUMY+O+SO₃ at 10.1 min and CUMY+2O+SO₃ at 7.9 min (Figure 3.4d, Table 3.1).

Despite the large number of metabolism studies on BPA analogs, this is the first report investigating the metabolism of CUMY.

Tetramethylbisphenol F

TMBPF is the only analog studied here containing methyl groups within the rings, having a direct effect on its biotransformation reactions. Deprotonated TMBPF was detected at 15.3 min with m/z 255.1399 ($C_{17}H_{19}O_2^-$). Its HRMS/MS spectrum (Figure 3.2) yielded three major product ions at m/z 133.0664 ($C_9H_9O^-$), m/z 121.0653 ($C_8H_9O^-$) and m/z 105.0702 ($C_8H_9^-$). Hydroxylated TMBPF (TMBPF+O) was detected at m/z 271.1350 (4.2 ppm) under oxidative conditions (Figure 3.9) eluting at 12.9 min. The added oxygen atom could be on the ring (in the *meta* position), on one of the methyl groups or on the central carbon. To investigate the exact position of this oxidation, its CID spectrum was studied (Figure 3.18) and showed a water loss at m/z 253.1242 ($C_{17}H_{17}O_2^-$), as well as a fragment ion at m/z 241.1241 ($C_{16}H_{17}O_2^-$), as a result of the neutral loss of CH₂O. These results show that the oxygen atom is added to a methyl group. Two isomers of TMBPF-2H+GSH adducts were detected at 8.5 and 10.1 min (Figure 3.3). By comparing their MS/MS spectra in both negative (Figure 3.19) and positive (Figure 3.20) ion modes, the structures of these two isomers were elucidated. The base peak of the first GSH adduct at m/z 306.0774 ($C_{10}H_{16}N_3O_6S^-$, 2.8 ppm),

corresponds to a deprotonated GSH. The later eluting adduct's base peak in negative mode was at m/z 272.0882 ($C_{10}H_{14}N_3O_6^-$, 2.2 ppm, deprotonated GSH- H_2S). In positive mode, important differences were also seen. The isomer at 10.1 min presented a base peak at m/z 308.0926 ($C_{10}H_{18}N_3O_6S^+$, 2.8 ppm, protonated GSH), while the base peak of the earlier isomer is at m/z 255.1384, corresponding to a neutral loss of GSH molecule. Different fragmentation patterns were observed by Xie et al., (Xie *et al.*, 2013a). for the aromatic and benzylic classes of GSH conjugates. They reported that the aromatic conjugates yield a fragment ion resulting from cleavage of the cysteinyl C-S bond at m/z 272, and the benzylic conjugates yield a highly abundant ion at m/z 306 formed by the cleavage of the C-S bond between the drug and GSH (Xie *et al.*, 2013a). These results indicate that the glutathione is added to the central carbon for the peak at 8.5 min and on the ring at the *meta* position for the peak at 10.1 min. Two peaks associated to GSH adducts resulting from the cleavage of TMBPF were also observed, namely dimethylphenol-2H+GSH and trimethylphenol-2H+GSH at 5.6 and 6.1 min, respectively. None of these GSH adducts have been reported in previous studies. Based on their HRMS/MS spectra (Figure 3.18b and c) and knowledge of BPA and BPF cleavage products, the same pathway is proposed for TMBPF.

Only one glucuronide metabolite was detected for TMBPF (TMBPF+gluc) with a retention time of 11.7 min (m/z 431.1720). This conjugate presented similar fragmentation to all other glucuronides detected in this study (Figure 3.18d). Two sulfate conjugates formed (Figure 3.4) namely TMBPF+ SO_3 at 9.3 min (m/z 335.0973) and TMBPF+O+ SO_3 at 7.4 min (m/z 351.0912). The HRMS/MS of TMBPF+ SO_3 (Figure 3.18) presented typical sulfo-conjugate fragmentation with m/z 255.1389 ($C_{17}H_{19}O_2^-$, -0.6 ppm) and m/z 79.9579 (SO_3^- , 6.6 ppm). The HRMS/MS of TMBPF+O+ SO_3 (Figure 3.18) showed two neutral losses of CH_3^{\bullet} but no water losses and an interesting peak with m/z 137.0610 ($C_8H_9O_2^-$, 1.4 ppm). The oxygen is therefore proposed to be added to the *meta* position of the ring instead of the methyl group like for TMBPF+O.

Despite the large number of applications for this BPA substitute, this is the first report describing the *in vitro* metabolism of TMBPF. A scheme summarizing the biotransformation for TMBPF and other analogs is presented in Figure 3.8.

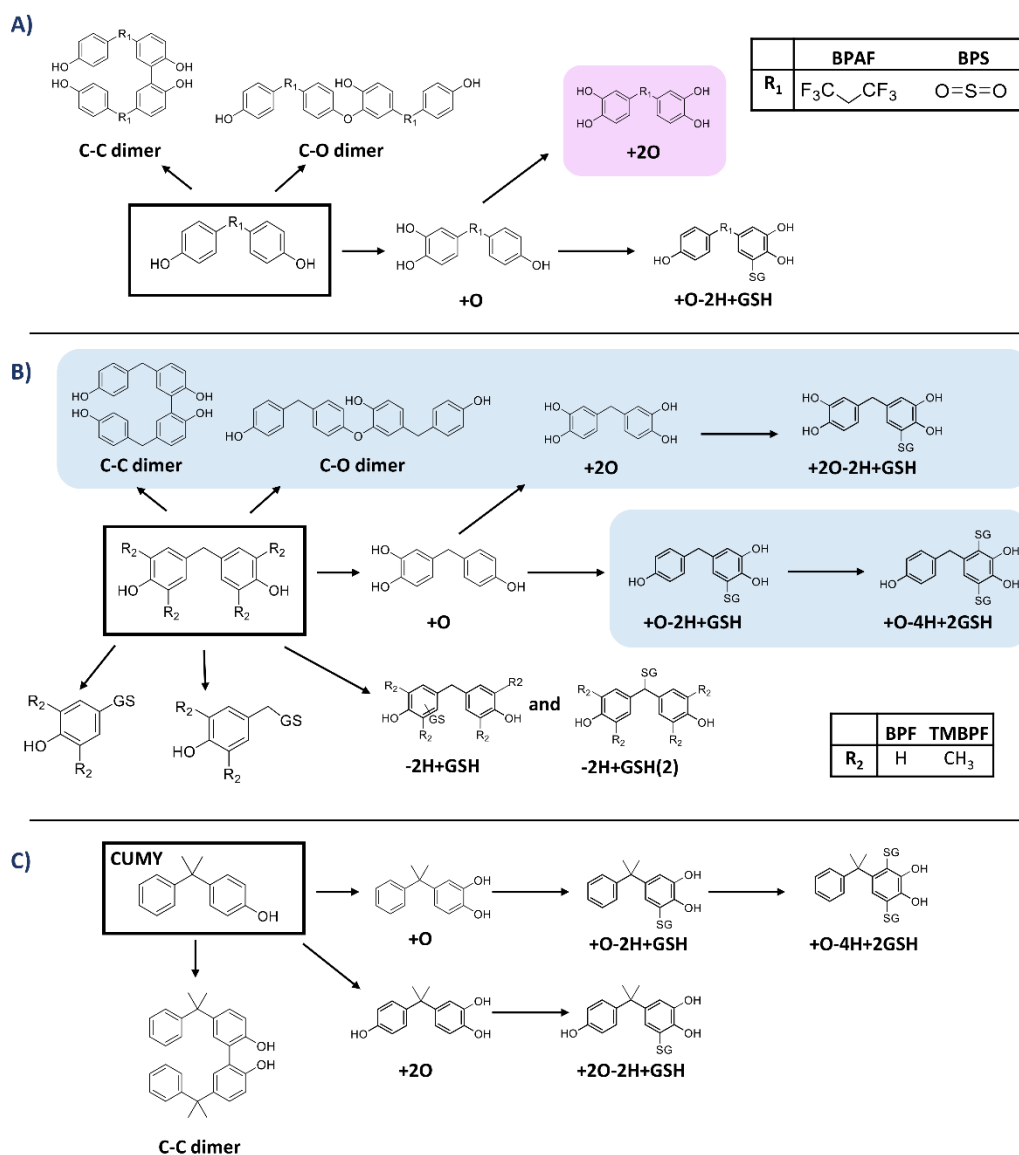


Figure 3.8 Proposed biotransformation pathways of BPA analogs for the formation of detected GSH adducts of (a) BPAF/BPS, (b) BPF/TMBPF and (c) CUMY. Shaded metabolites are specific for BPS (a) and BPF (b).

3.6 Conclusion

Five BPA analogs was studied *in vitro* to investigate the formation of phase I and II metabolites in rat and human liver fractions. In general, BPAF, BPS, BPF, CUMY and TMBPF showed similar biotransformations to BPA. All analogs yielded oxidative metabolites, several different GSH adducts, as well as glucuronide and sulfate conjugates. Optimized chromatography, high mass accuracy measurements and detailed fragmentation pathways served to elucidate structures of all detected metabolites and adducts. Several metabolites have been characterized here for the first time. Future studies should be aimed at studying the relevance of these metabolic pathways in the overall toxicity of BPA analogs.

3.7 Supplemental information

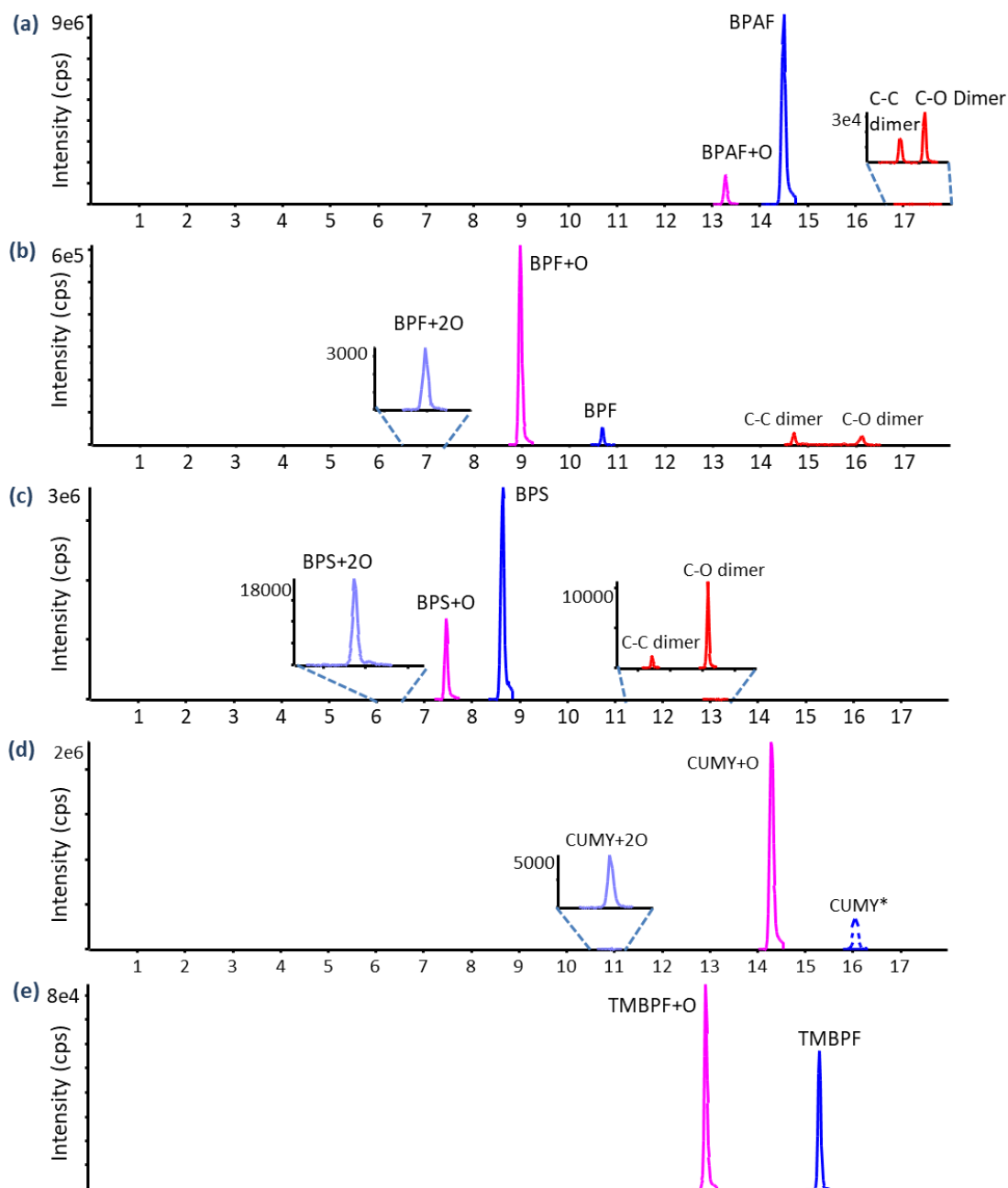


Figure 3.9 Extracted ion chromatograms of BPA analogs oxidative metabolites formed in RLM with NADPH only for BPAF (a), BPF (b), BPS (c), CUMY (d), TMBPF (e). *peak for CUMY parent shown is from control incubations (without NADPH)

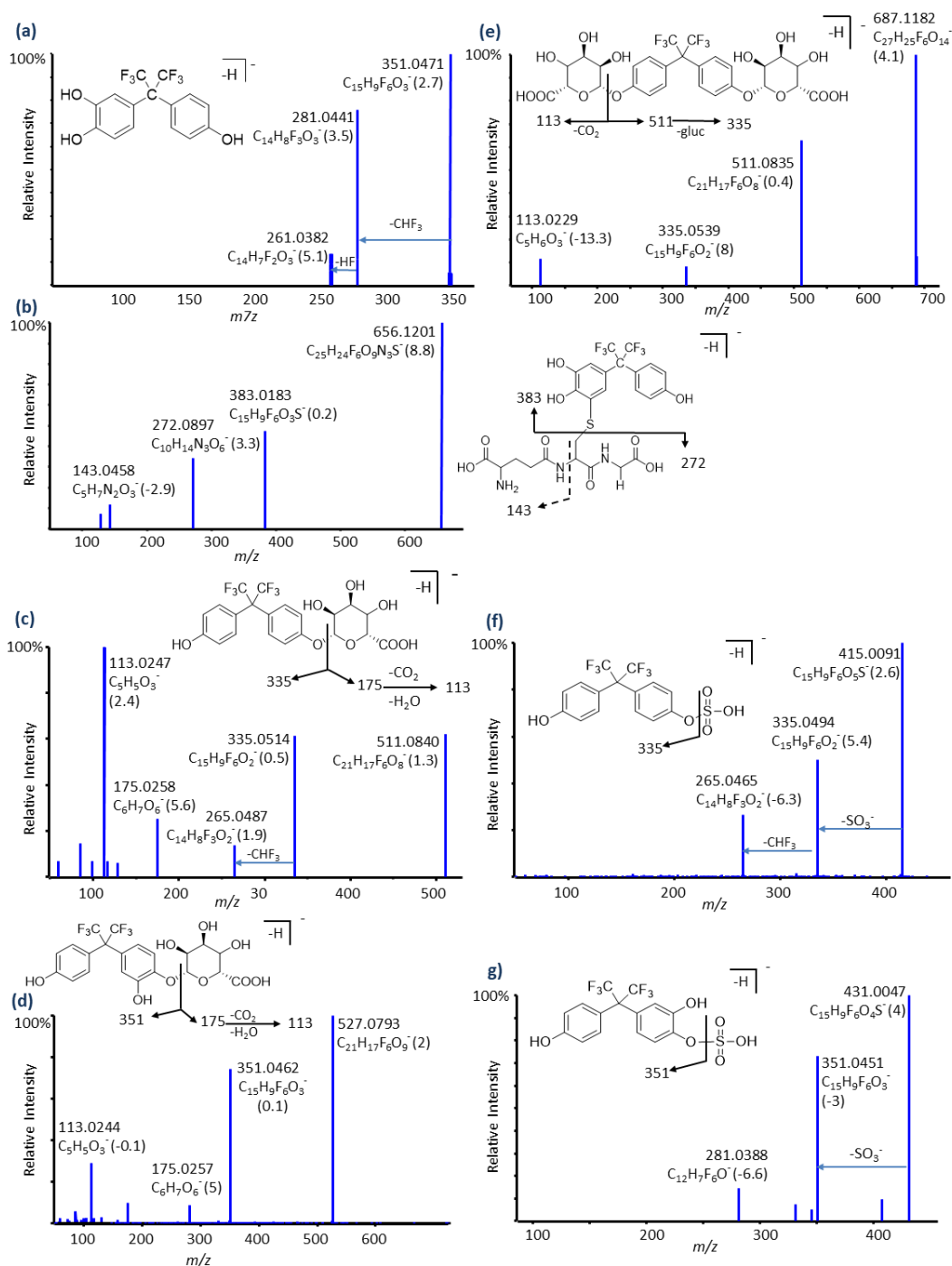


Figure 3.10 MS/MS spectra and proposed fragmentation for BPAF metabolites: (a) BPAF+O, (b) BPAF+O-2H+GSH, (c) BPAF+gluc, (d) BPAF+O+gluc, (e) BPAF+2gluc, (f) BPAF+SO₃, (g) BPAF+O+SO₃.

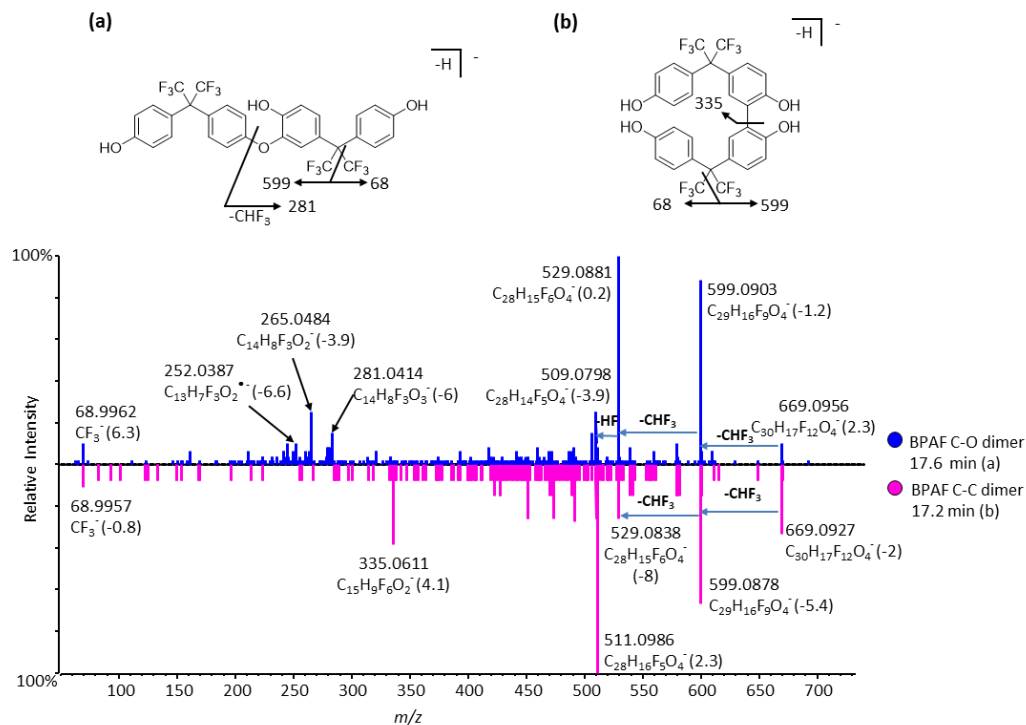
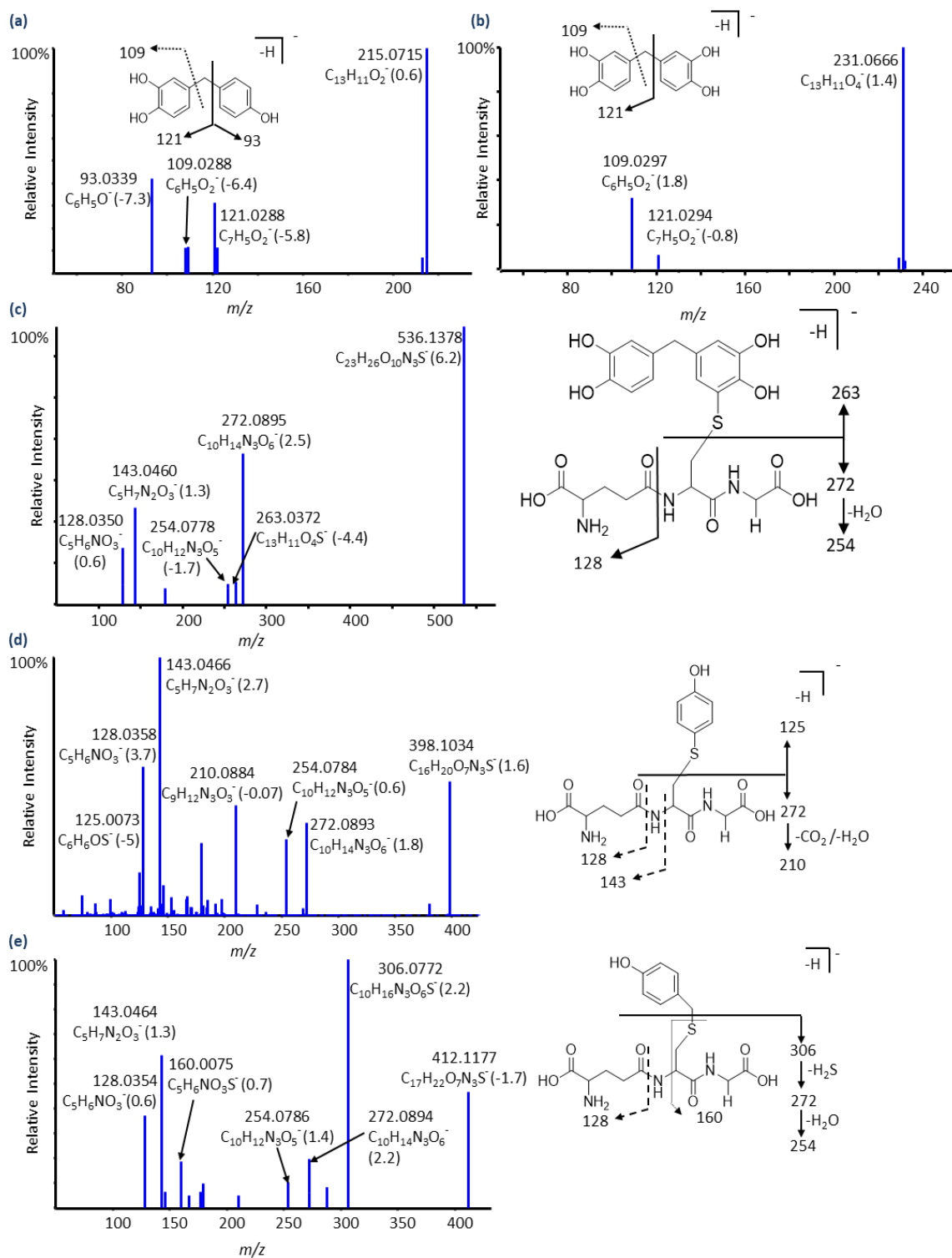


Figure 3.11 Mirror plot of BPAF dimers with proposed routes of fragmentation (CE 70 V), (a) C-O dimer and (b) C-C dimer.



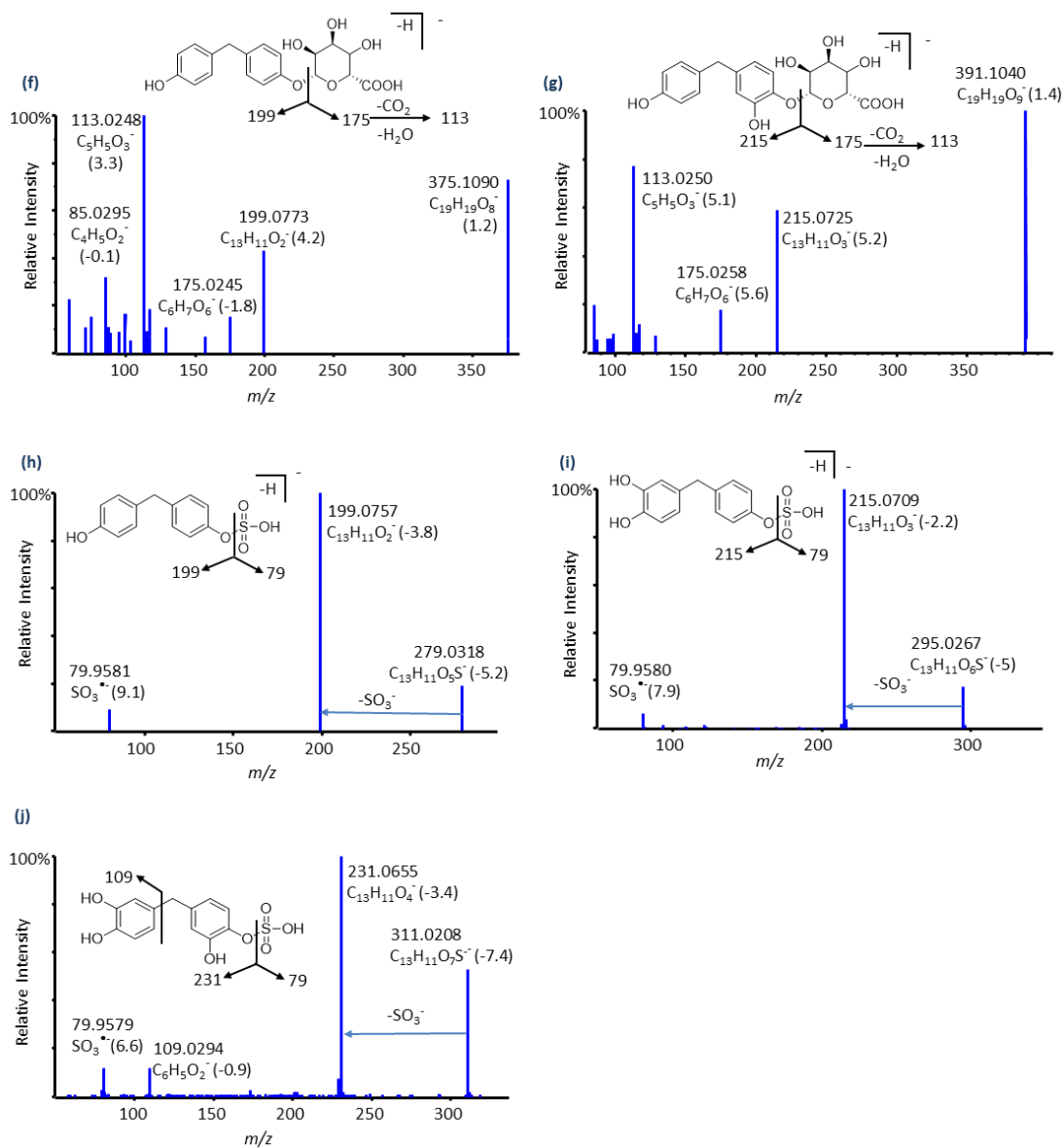


Figure 3.12 MS/MS spectra and proposed fragmentation for BPF metabolites (a) BPF+O, (b) BPF+2O, (c) phenol-2H+GSH, (d) methylphenol-2H+GSH, (e) BPF+2O-2H+GSH, (f) BPF+gluc, (g) BPF+O+gluc, (h) BPF+SO₃, (i) BPF+O+SO₃, (j) BPF+2O+SO₃.

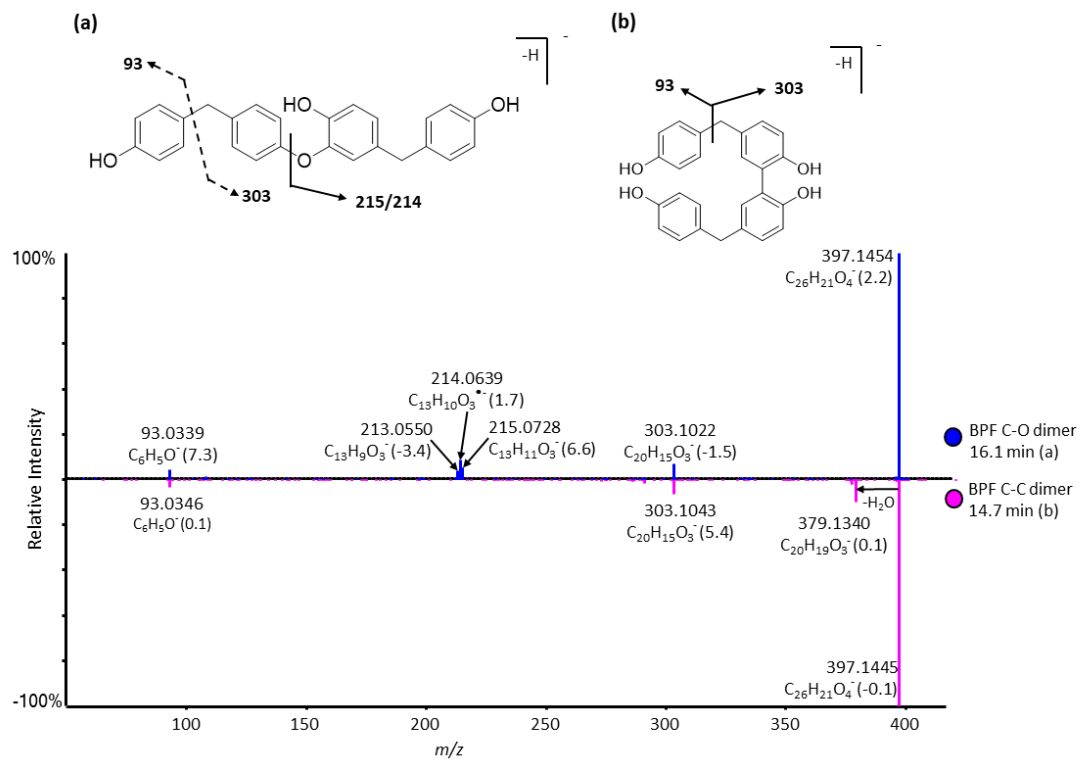
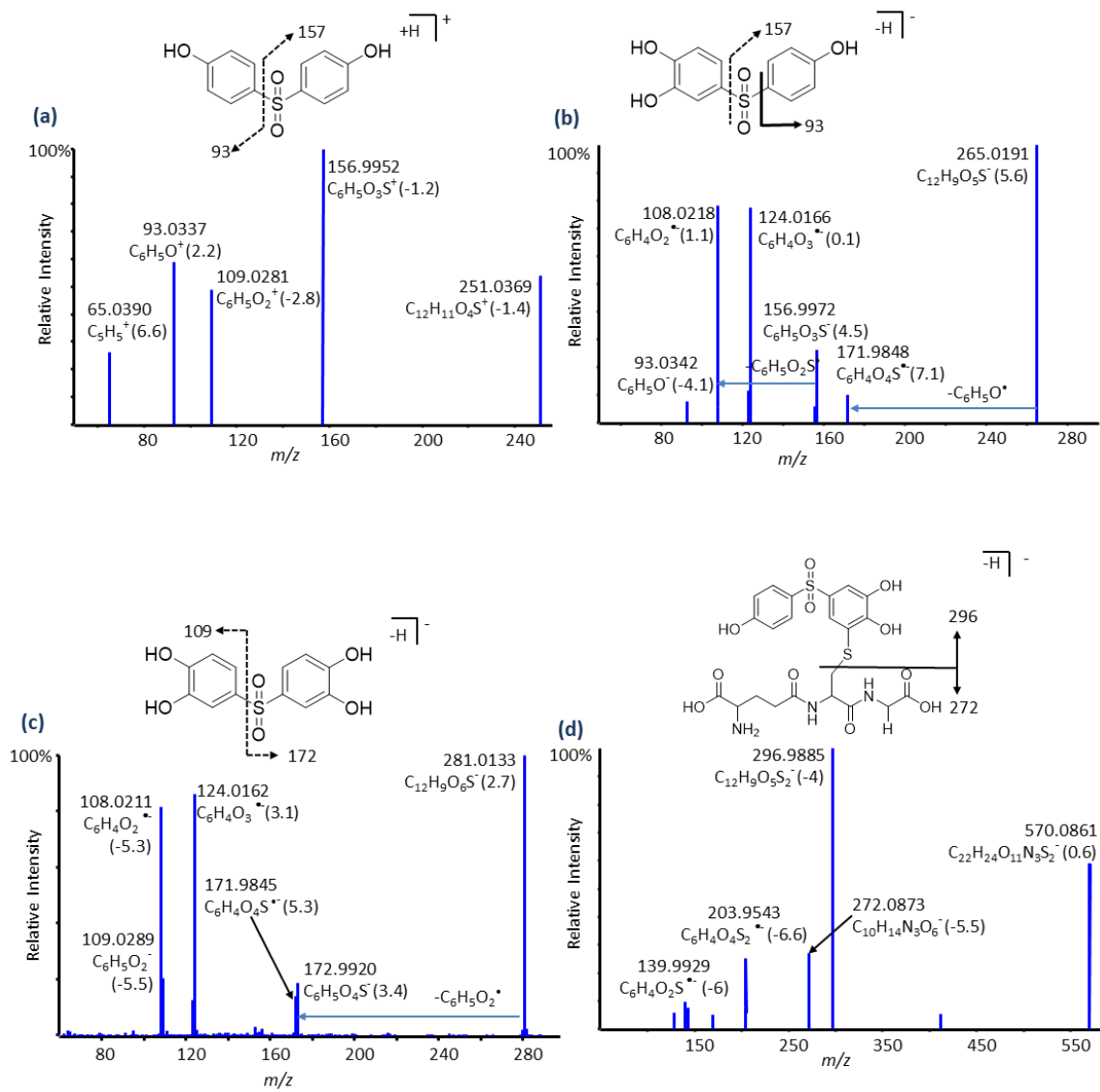


Figure 3.13 Mirror plot of BPF dimers with proposed routes of fragmentation (CE 30 V); (a) C-O dimer and (b) C-C dimer.



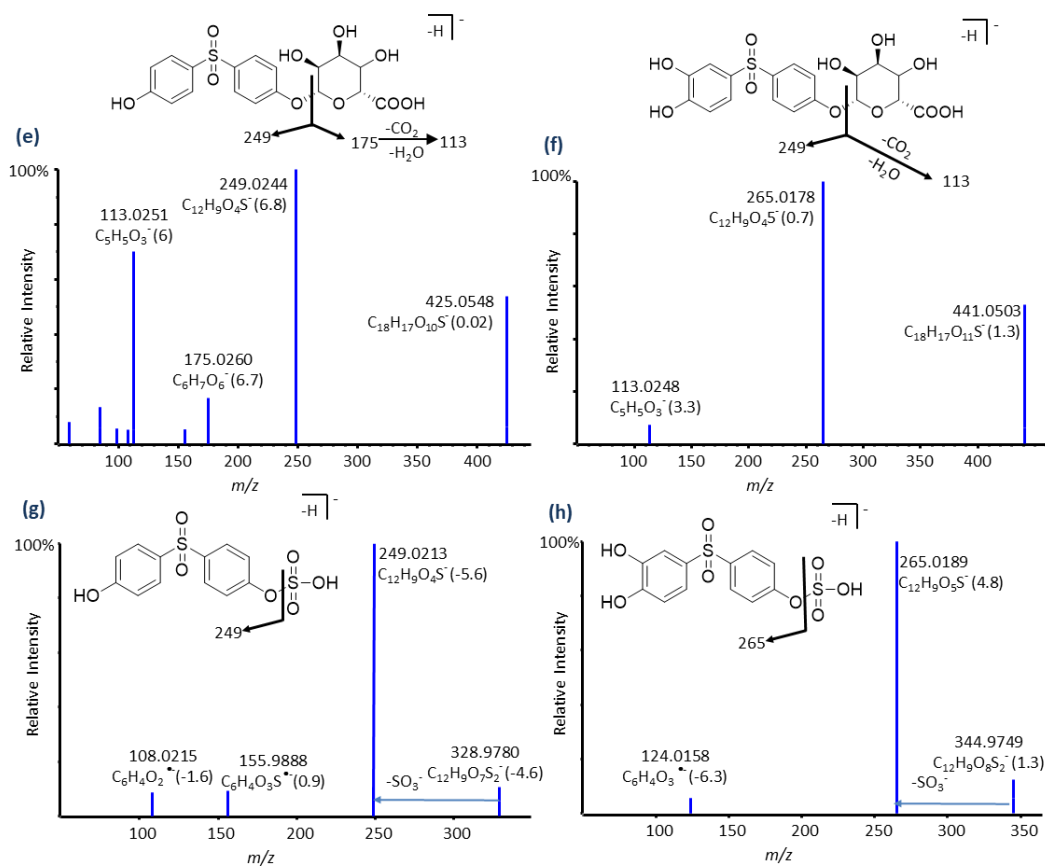


Figure 3.14 MS/MS spectra and proposed fragmentation for BPS and its metabolites: (a) BPS in positive mode, (b) BPS+O, (c) BPS+2O, (d) BPS+O-2H+GSH, (e) BPS+gluc, (f) BPS+O+gluc, (g) BPS+SO₃, (h) BPS+O+SO₃.

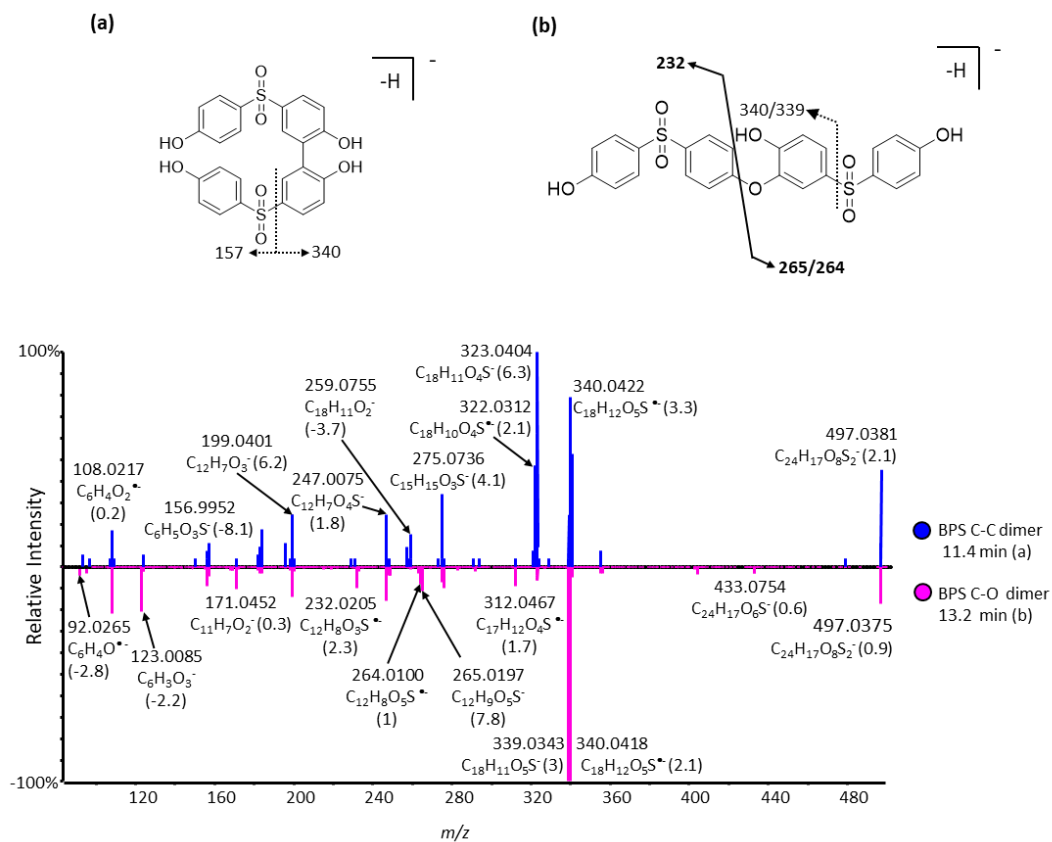
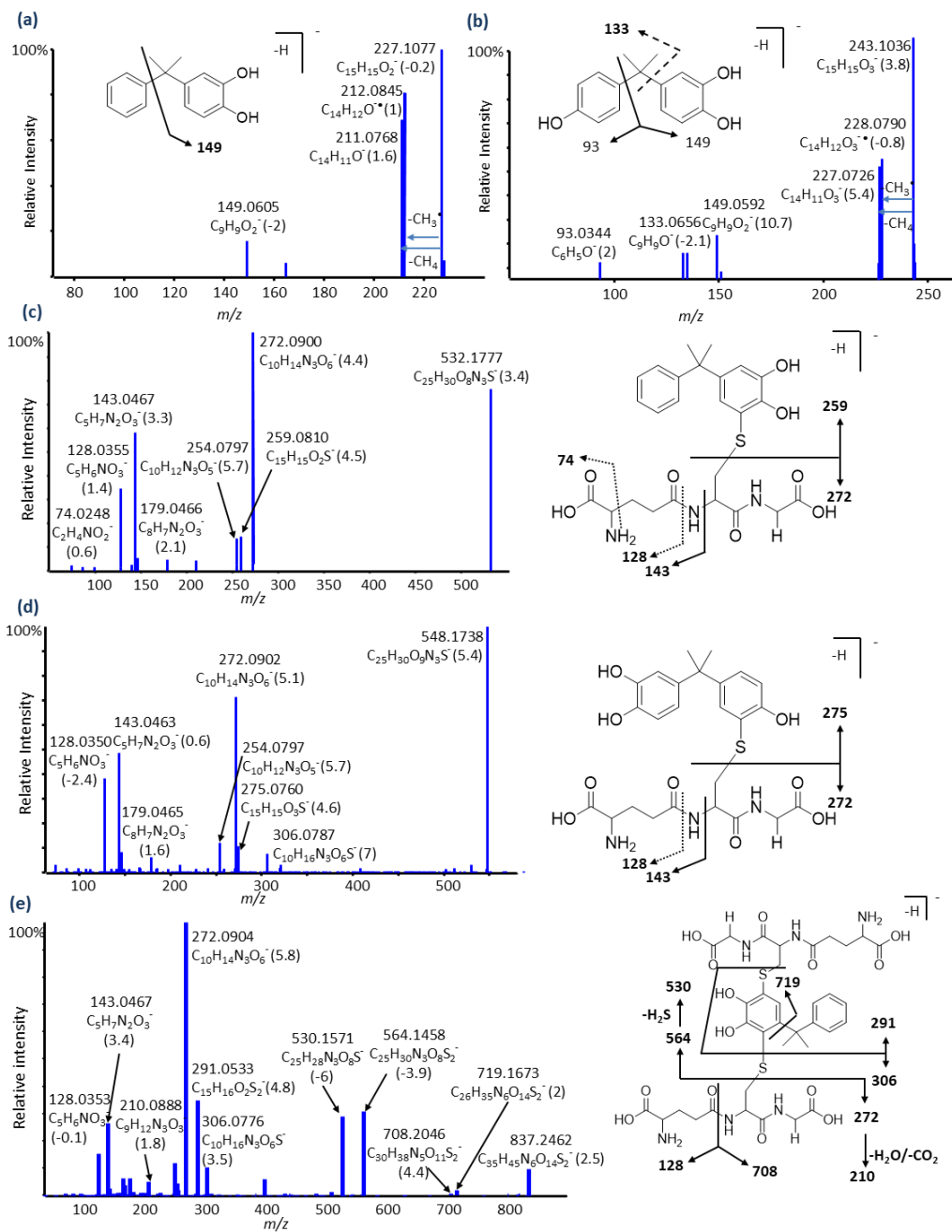
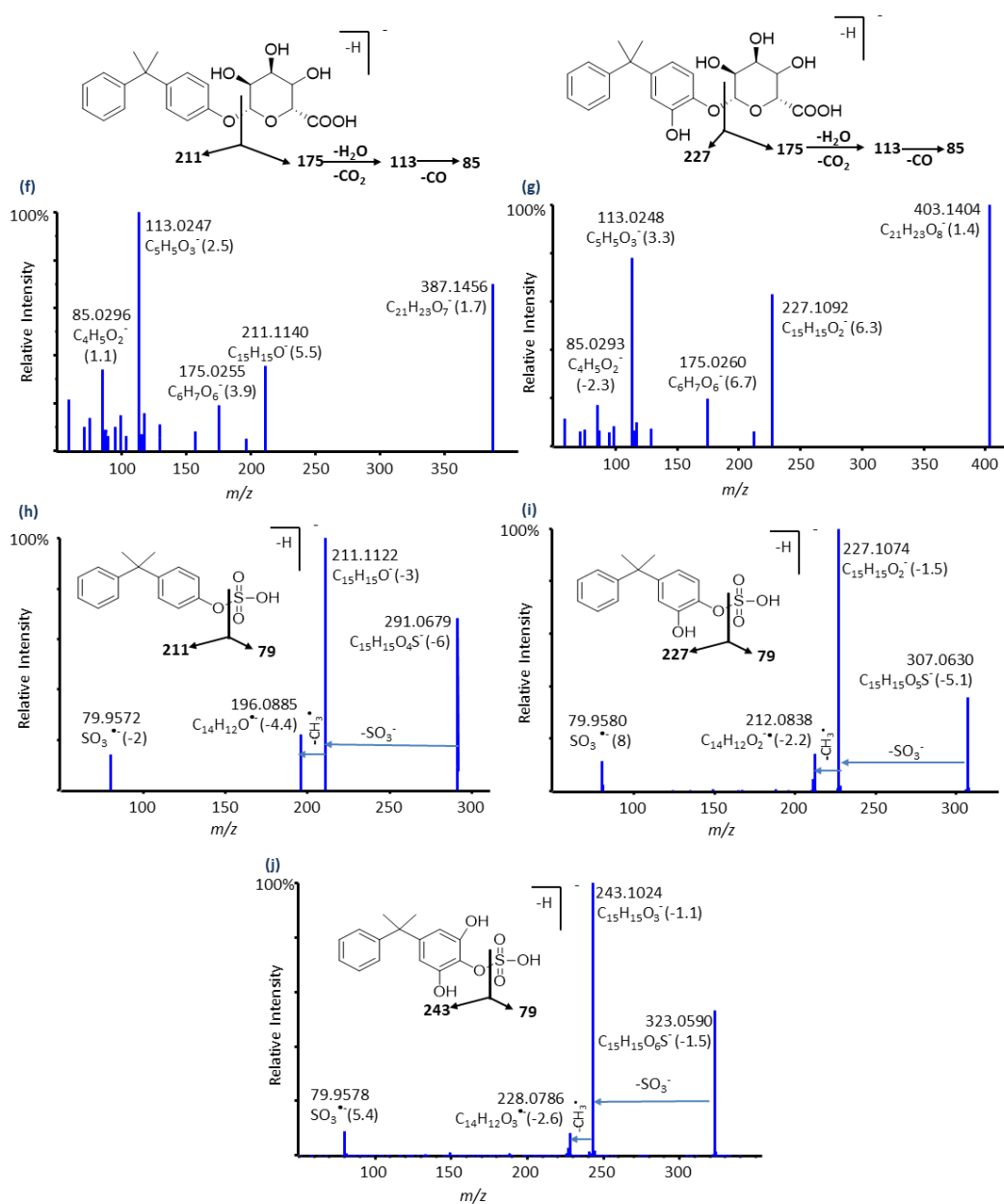


Figure 3.15 Mirror plot of BPS dimers with proposed routes of fragmentation (CE 50 V); (a) C-C dimer and (b) C-O dimer.





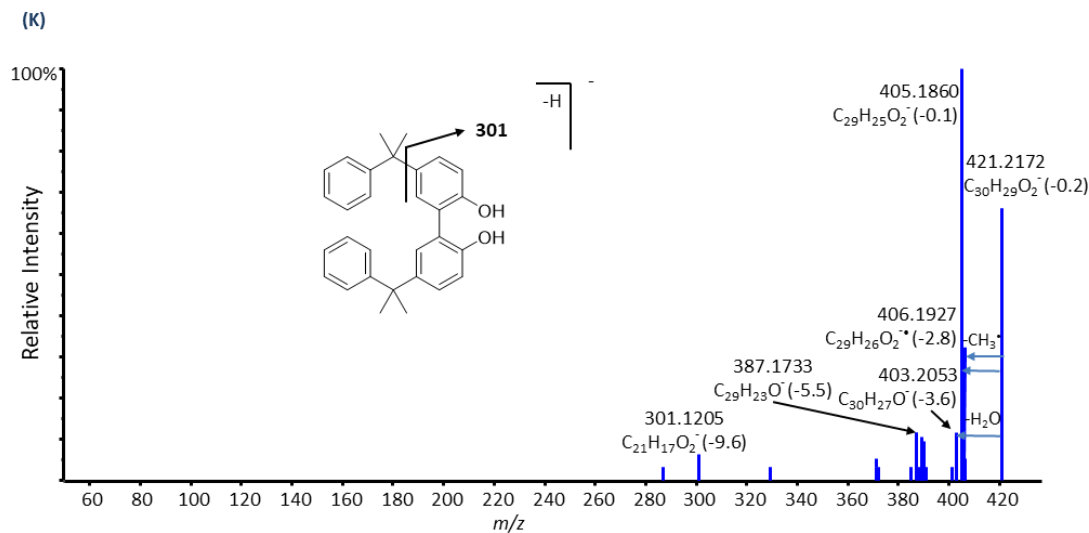


Figure 3.16 MS/MS spectra and proposed fragmentation for CUMY metabolites (a) CUMY+O, (b) CUMY+2O, (c) CUMY+O-2H+GSH, (d) CUMY+2O-2H+GSH, (e) CUMY+O-4H+2GSH, (f) CUMY+gluc, (g) CUMY+O+gluc, (h) CUMY+SO₃, (i) CUMY+O+SO₃, (j) CUMY+2O+SO₃, (k) CUMY C-C dimer (CE 50 V)

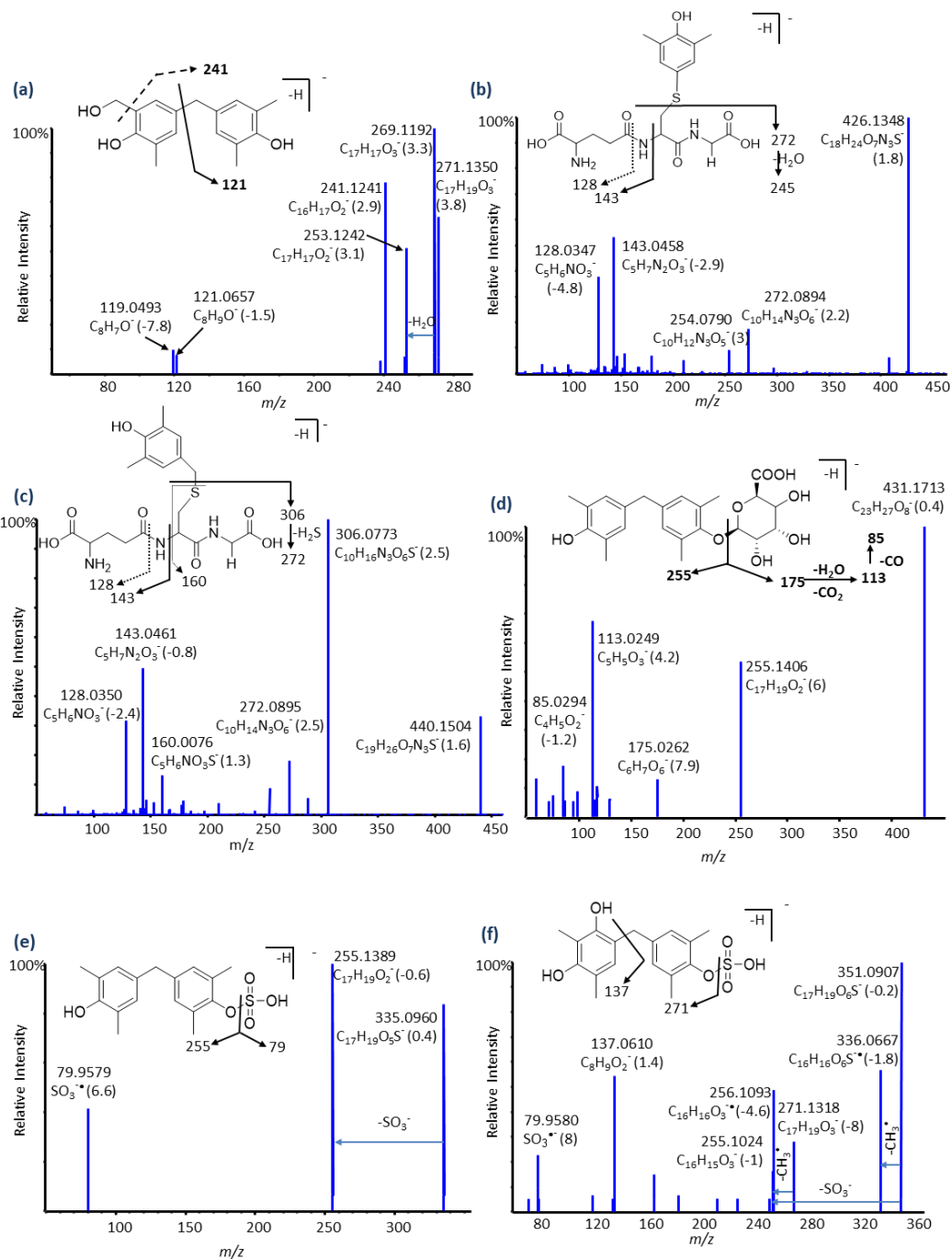


Figure 3.17 MS/MS spectra and proposed fragmentation for TMBPF metabolites (a) TMBPF+O, (b) dimethylphenol-2H+GSH, (c) trimethylphenol-2H+GSH, (d) TMBPF+gluc, (e) TMBPF+SO₃, (f) TMBPF+O+SO₃

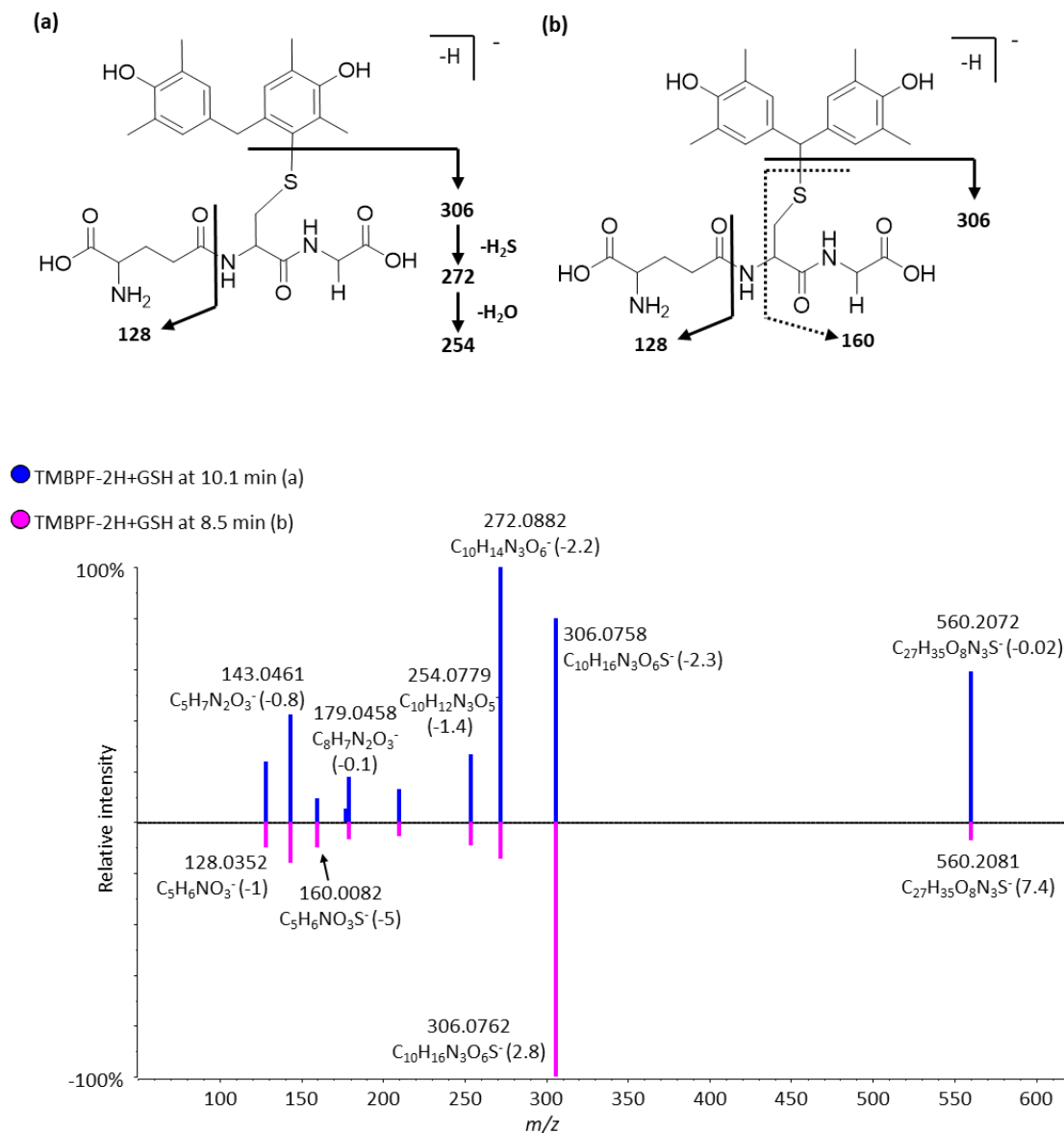


Figure 3.18 Mirror plot of TMBPF-2H+GSH isomers with proposed routes of fragmentation in negative mode (a) TMBPF-2H+GSH at 10.1 min and (b) TMBPF-2H+GSH at 8.5 min

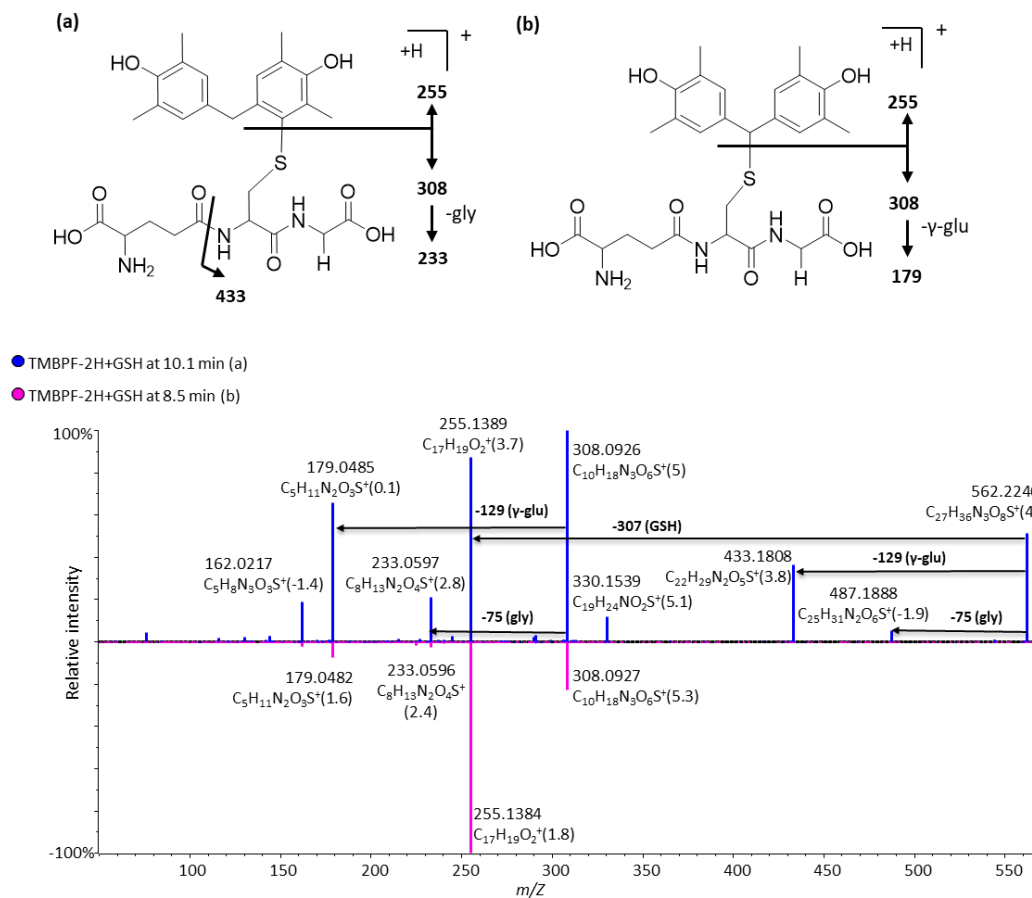


Figure 3.19 Mirror plot of TMBPF-2H+GSH isomers with proposed routes of fragmentation in positive mode (a) TMBPF-2H+GSH at 10.1 min and (b) TMBPF-2H+GSH at 8.5 min

Table 3.2 Summary of LC-MS/MS data for BPA analogs GSH adducts (positive mode)

Metabolite	Formula	m/z [M+H] ⁺	ppm	MS/MS fragments ^a
BPAF	+O-2H+GSH	C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₉ F ₆ S	658.1297	1.3 583.0983, 576.1992, 529.0861, 512.0601, 426.0588, 130.0479
BPF	-2H+GSH	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₈ S	506.1598	1.4 308.0915, 291.0655, 245.0588, 233.0589, <u>199.0747</u> , 179.0476, 162.0208, 76.0195
	-2H+GSH (2)	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₈ S	506.1605	2.7 431.1284, 377.1174, 360.0914, 274.0900, 266.0489, <u>231.0474</u> , 130.0488, 107.0478
	+O-2H+GSH	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₉ S	522.1558	3.3 447.1227, 393,1113, 376.0856, 290.0846, 282.0435, 247.0422, 179.0158, 176.0156, 130.0487, 107.0478
	+2O-2H+GSH	C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₁₀ S	538.1494	0.8 463.1171, <u>409.1057</u> , 392.0798, 306.0792, 282.0434, 263.0371, 167.0150, 130.0483, 123.0428
	phenol-2H+GSH	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₇ S	400.1169	-0.9 325.0835, 271.0730, 254.0466, 168.0463, 151.0198, 130.0482, 125.0042, 112.0381, 840434
	methylphenol-2H +GSH	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₇ S	414.1315	-3.5 308.0915, 285.0904, 245.0590, 233.0587, 182.0621, <u>179.0476</u> , 162.0210, 130.0485, 107.0474, 76.0197
	+O-4H+2GSH	C ₃₃ H ₄₂ N ₆ O ₁₅ S ₂	827.2226	0.5 623.1476, 569.1381, 552,1114, 414.1152, 349.5946, 320.0418, 303.0151, 298.0805, 276.994, 244.0192, <u>130.0490</u> , 84.0433, 76.0381
BPS	+O-2H+GSH	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₁₁ S ₂	572.1018	2.6 497.0700, <u>443.0591</u> , 426.0329, 380.0275, 340.0325, 296.9901, 176.0157, 130.0487
CUMY	+O-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₈ S	534.1923	3.6 459.1595, 405.1490, 388.1228, <u>302.1217</u> , 220.0448, 259.0792, 226.0993, 130.0492, 119.0845
	+2O-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₉ S	550.1866	2.2 421.1447, 275.0737, 274.1043, 255.0923, 199.0713, 177.0336, <u>145.0600</u> , 130.0491
	+O-4H+2GSH	C ₃₅ H ₄₆ N ₆ O ₁₄ S ₂	839.2609	2.8 635.1875, 581.1766, 564.1489, 489.1173, 435.1070, 420.1347, 355.6129, 332.0790, 315.0525, 289.0373, 258.0718, 243.0481, 323.0522, <u>130.0490</u> , 119.0851, 84.0434, 76,0382
TMBPF	-2H+GSH (1)	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₈ S	562.2223	1.0 487.1888, 433.1808, 330.1539, <u>308.0926</u> , 291.0662, 255.1389, 233.0597, 179.0485, 162.0217, 144.0111, 76.0201
	-2H+GSH (2)	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₈ S	562.2233	2.8 <u>308.0927</u> , 255.1384, 233.0596, 179.0482
	dimethylphenol-2H +GSH	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₇ S	428.1499	3.2 299.1068, 282.0799, 196.0787, 179.0517, 153.0360, <u>130.0489</u>
	trimethylphenol-2H +GSH	C ₁₉ H ₂₇ N ₃ O ₇ S	442.1656	3.2 <u>308.0919</u> , 233.0590, 179.0480, 162.0214, 135. 0795, 76.0202

a: fragment ions of >10% intensity relative to base peak are listed here, base peak in each spectrum is underline

CHAPITRE IV

ARTICLE 3

IDENTIFICATION OF *IN VITRO* METABOLITES OF
SYNTHETIC PHENOLIC ANTIOXIDANTS BHT, BHA AND
TBHQ BY LC-HRMS/MS

Ons Ousji and Lekha Sleno

Université du Québec à Montréal, Chemistry Department P.O. Box 8888, Downtown
Station, Montréal, QC, Canada

Article publié dans la revue *scientifique International Journal of Molecular
Sciences*, 2020, 21(24), 9525; dans l'édition spéciale : Identification of Metabolites of
Xenobiotics

DOI: 10.3390/ijms21249525

Contribution des auteurs :

Ons Ousji et Lekha Sleno sont les co-auteurs de ce manuscrit. Ons Ousji a mené la recherche bibliographique, préparé les protocoles expérimentaux, réalisé les expériences, traité les données et préparé le manuscrit. Lekha Sleno a été responsable de la conception et supervision du projet, ainsi que la correction de la version finale du manuscrit.

4.1 Résumé

L'hydroxytoluène butylé (BHT) et ses analogues, l'hydroxyanisole butylé (BHA) et la tert-butyl-hydroquinone (TBHQ), sont des conservateurs synthétiques largement utilisés pour inhiber l'oxydation des lipides dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Malgré leur utilisation répandue, on a peu de données sur leur exposition humaine et les produits de biotransformation associés. Le métabolisme de ces composés a été étudié en utilisant des incubations *in vitro* avec des fractions de foie humain et de rat. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem à haute résolution a été utilisée pour détecter et caractériser les espèces stables et réactives formées par le métabolisme oxydatif, ainsi que les conjugués de phase II. Plusieurs métabolites oxydatifs ont été détectés, ainsi que des conjugués glutathion, glucuronide et sulfate, dont beaucoup n'avaient pas été étudiés auparavant. Une combinaison de mesures de masse exactes, de fragmentation MS/MS et d'études de marquage isotopique a été utilisée pour élucider les structures des métabolites.

4.2 Abstract

Butylated hydroxytoluene (BHT) and its analogs, butylated hydroxyanisole (BHA) and tert-butyl-hydroquinone (TBHQ), are widely used synthetic preservatives to inhibit lipid oxidation in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Despite their widespread use, little is known on their human exposure and related biotransformation products. The metabolism of these compounds was investigated using *in vitro* incubations with human and rat liver fractions. Liquid chromatography coupled to high-resolution tandem mass spectrometry was employed to detect and characterize stable and reactive species formed via oxidative metabolism, as well as phase II conjugates. Several oxidative metabolites have been detected, as well as glutathione, glucuronide and sulfate conjugates, many of which were not previously reported. A combination of accurate mass measurements, MS/MS fragmentation behavior and isotope-labeling studies were used to elucidate metabolite structures.

4.3 Introduction

Synthetic phenolic antioxidants were developed in the late 1940s (Nieva-Echevarría *et al.*, 2015). They have been used in food, pharmaceuticals, cosmetic and petrochemical industries to increase shelf life and to improve the quality, freshness, taste and texture of consumer products (Tortosa *et al.*, 2020). They are widely used to trap free radicals and to delay lipid oxidation in various products (Nieva-Echevarría *et al.*, 2015). Despite their widespread use, very little is known about human exposure or environmental emissions, which has led to public concern about their health effects and environmental contamination (Liu et Mabury, 2019). BHT, BHA and TBHQ are among the most used synthetic phenolic antioxidants (Saad *et al.*, 2007).

BHT, the most frequently used synthetic phenolic antioxidant, is added to food, pharmaceuticals and cosmetics, as well as an additive in rubber, plastics, mineral oil and printing inks (Lanigan et Yamarik, 2002; Liu et Mabury, 2018). Reports on BHT toxicity and side effects have been somewhat contradictory. Some studies have shown positive effects of BHT, such as enhancing the intracellular levels of glutathione and related enzymes in rat (Ahmad *et al.*, 1992), protecting against cancer due to its antioxidant activity (Botterweck *et al.*, 2000), and having tumor reducing effects (Lanigan et Yamarik, 2002). On the other hand, it has been shown to cause renal and hepatic damage in rats, increase liver weight, decrease the activities of several hepatic enzymes and exhibit toxic effects in lung tissue (Lanigan et Yamarik, 2002). BHT toxicity has been mainly attributed to its metabolites. For instance, Nagai *et al.* reported that BHT-quinone, one of the major metabolites of BHT, cleaves DNA strands (Nagai *et al.*, 1993). Moreover, Kupfer *et al.* (Kupfer *et al.*, 2002) demonstrated lung toxicity and tumor production caused by hydroxylated metabolites of BHT.

BHA, a close analog of BHT, is usually found as an isomeric mixture, containing the major 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (3-BHA) (90%) and the minor 2-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (2-BHA) (10%) (Sun *et al.*, 2019). It has been used as a food additive

since the late 1950s (Goodman *et al.*, 1990). It is also used in animal feed, cosmetics, pharmaceuticals, rubber, biodiesel and petroleum products (IARC, 1986). Some studies on BHA have revealed beneficial effects, with anti-tumor and nephroprotective potential (Ansar et Iqbal, 2016; Singh *et al.*, 2009). Nevertheless, BHA has been shown to be an endocrine disrupter and a carcinogen in rats (Ito *et al.*, 1985; Pop *et al.*, 2013). It can also perturb adipogenesis and increase the incidence of obesity (Pop *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2019). The effects of BHT and BHA on various organs (liver, lung, kidney, blood system and reproductive system) have been reviewed (Choe et Yang, 1982).

TBHQ is also added to a wide range of foods, such as unsaturated vegetable oils, residual frying oils, lard, and infant formula, as well as in biodiesel (Almeida *et al.*, 2011; Gharavi *et al.*, 2007). Several studies documented the chemoprotective effects of TBHQ. However, other *in vitro* studies, indicated that it can cause DNA damage and *in vivo* tests suggest it may be carcinogenic, cytotoxic and genotoxic (Gharavi *et al.*, 2007; van Esch, 1986). TBHQ is a major metabolite of BHA resulting from a demethylation reaction (Li *et al.*, 2019), and it has been suggested to contribute to the carcinogenicity of BHA (Gharavi *et al.*, 2007).

Despite the large number of scientific papers describing the controversial effects of BHT and its analogs using *in vitro* and *in vivo* animal models, only very few studies have described these synthetic antioxidants in human (Liu et Mabury, 2018; Nieva-Echevarría *et al.*, 2015; Wang et Kannan, 2019; Zhang *et al.*, 2018). BHT and BHA have been banned in Japan since 1958 and have use restrictions in infant formulas in the UK. However, BHT, BHA and TBHQ are currently allowed in Canada, United States, Korea and certain countries within the European union (Liu et Mabury, 2019; Nieva-Echevarría *et al.*, 2015; Suh *et al.*, 2005). They are categorized as “generally recognized as safe” (GRAS) by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and safe to use in cosmetics by the Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel (2020; Lanigan et Yamarik, 2002; Nieva-Echevarría *et al.*, 2015; Tortosa *et al.*, 2020), while

the International Agency for Research on Cancer (IARC) classifies BHT as non-carcinogenic (based on limited evidence), BHA as reasonably anticipated to be a human carcinogen and TBHQ as not carcinogenic (IARC, 1986; Ito *et al.*, 1985; Suh *et al.*, 2005).

The metabolism of BHT and analogs has been studied by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) (Fries et Puttmann, 2002; Nieva-Echevarría *et al.*, 2015; Wang et Kannan, 2019), and by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Lanigan et Yamarik, 2002). The tissue distribution, excretion, and metabolism of BHT in mice was recently investigated using HPLC- MS/MS and GC-MS (Zhang *et al.*, 2020).

The potential for human exposure of BHT and its analogs, as well as the lack of information surrounding this exposure, support the need to study their biotransformation reactions, especially concerning the formation of reactive metabolites.

In this study, the metabolism of BHT, BHA and TBHQ was evaluated using liver microsomes and subcellular (S9) fractions from human and rat. Oxidative metabolites, glutathione (GSH) adducts, glucuronides and sulfate conjugates have been characterized by liquid chromatography coupled to a quadrupole-time-of-flight high-resolution tandem mass spectrometer. Isotope-labeled BHT analogs were employed to aid in the structural elucidation of metabolites. Two metabolites of BHT, DBP and BHT-acid, were also purchased to confirm their presence in BHT incubations. The metabolism of these two compounds was also studied to confirming metabolic pathways.

4.4 Results and Discussion

4.4.1. Metabolism of BHT

For the purpose of studying the various metabolic routes of BHT, an LC-MS/MS method was optimized. A biphenyl solid-core column using 5 mM ammonium acetate and acetonitrile as mobile phases A and B, respectively, yielded significant signal increase over using formic acid as an additive, as well as ameliorating peak shapes for many of the metabolites found in this study. BHT eluted with a retention time of 14.3 min with our optimized gradient (Table 4.1). The high-resolution MS/MS spectrum of deprotonated BHT (m/z 219.1760) at collision energy of 30V, presented in Figure 4.1, exhibits only one major fragment ion at m/z 203.1429 ($C_{14}H_{19}O^-$), via the loss of neutral CH_4 . Otherwise, this molecule is quite resistant to fragmentation, and when collision energy is increased to form other structurally characteristic fragments, most of the signal was lost and no clear product ions were observed.

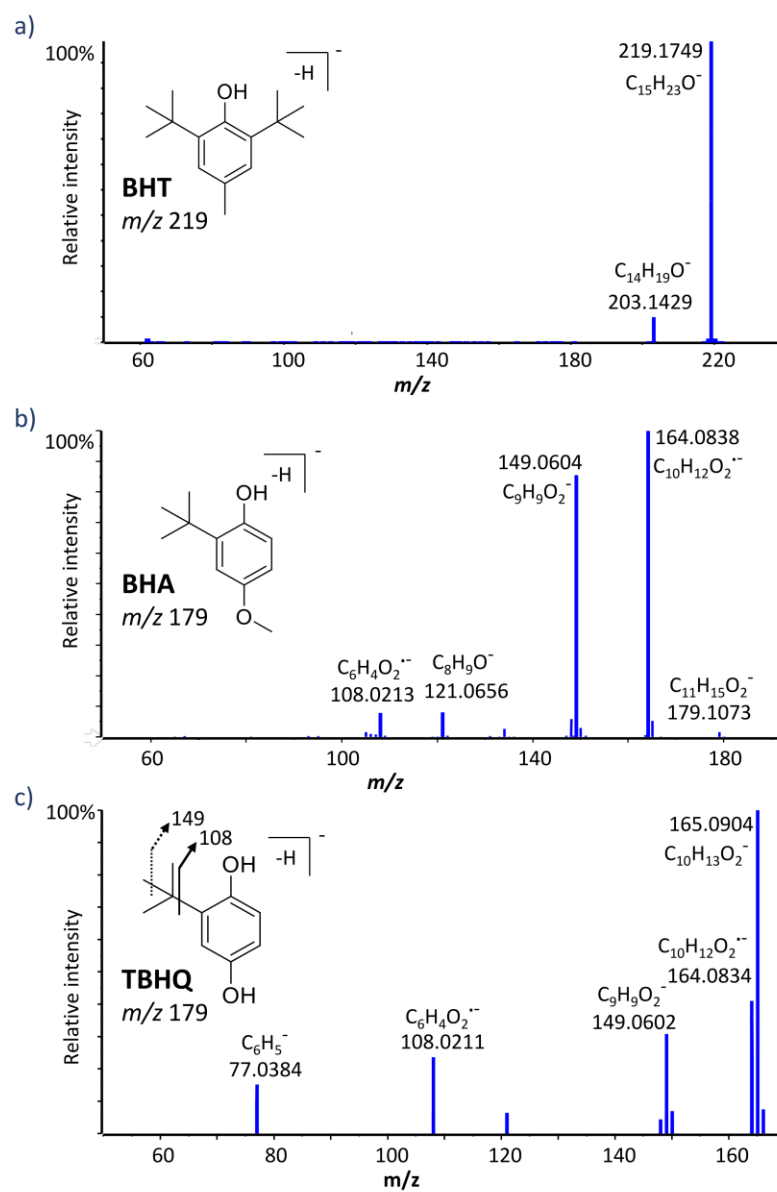


Figure 4.1 High-resolution MS/MS spectra for deprotonated BHT (a), BHA (b), and TBHQ (c).

Both human and rat microsomes yielded similar metabolic profiles for all tested compounds and incubations conditions. Throughout the manuscript, representative chromatograms from the human incubations are shown. All metabolites were confirmed with accurate mass measurements within 5 ppm of the theoretical exact masses. When BHT was incubated under oxidative conditions, several metabolites were detected, as shown in Figure 4.2. Two hydroxylated BHT metabolites (BHT+O) were detected, eluting at 13.4 and 14.1 min (Table 4.1). The comparison of their HRMS/MS spectra showed a common water loss at m/z 217.159 confirming that, in both cases, the oxygen is not added to the aromatic ring. To investigate whether the oxygen is added to the *para*-methyl or on a *t*-butyl group, isotope-labeled BHTs were also incubated (Table 4.2). Using BHT- d_3 and BHT- d_{20} , the BHT+O peak at 13.4 min, was shifted from m/z 235.1708 to 237.1834 and 255.2967, respectively (Table 4.2), indicating that the oxidation occurs on the methyl group. While for the isomer at 14.1 min, it was shifted from m/z 235.1705 to 238.1893 and 254.2903, respectively (Table 4.2), proving that the oxidation occurs on a *t*-butyl group. Di-hydroxylated BHT was also detected at 11.9 min (Figure 4.2) with m/z 251.1660 ($C_{15}H_{23}O_3^-$, 2.9 ppm), and its MS/MS spectrum showed two water losses (Table 4.1). Both BHT- d_3 and BHT- d_{20} analogs lost one deuterium atom, therefore one oxygen is added on the methyl group and the second one is on the *t*-butyl, in accordance with the two BHT+O isomers mentioned above. BHT-aldehyde via the oxidation of the *p*-methyl group was also detected at 14.0 min (Table 1) (Lanigan et Yamarik, 2002), confirmed by the fact that BHT- d_3 lost all three labels during this metabolic transformation, while BHT- d_{20} did not lose any.

Table 4.1. Summary of MS/MS data for BHT and metabolites in negative ion mode.

Metabolite	Formula	m/z [M-H] ⁻	ppm	RT (min)	Selected MS/MS fragments [*]
BHT	C ₁₅ H ₂₄ O	219.1760	2.7	14.3	203.1439
BHT+O (1)	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	235.1708	2.1	13.4	<u>217.1598</u> , 160.0895 , 145.0657
BHT+O (2)	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	235.1705	0.8	14.1	217.1597, <u>205.1597</u>
BHT+2O	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	251.1660	2.9	11.9	233.1547 , 221.1557, 203.1444 , 160.0893, 146.0746
BHT-aldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	233.1552	2.2	14.0	217.1234
BHT-acid	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	249.1501	2.2	9.8	<u>205.1592</u>
BHT-aldehyde+O	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	249.1503	3.0	13.5	231.1400, 219.1399
DBP	C ₁₄ H ₂₂ O	205.1600	1.2	14.2	189.1289
BHQ	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	221.1549	0.9	8.3	164.0848, 149.0601
BHT-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₇ S	524.2436	0.1	8.5	<u>306.0772</u> , 272.0892, 254.0788, 160.0078, 143.0463 , 128.0353
BHT+O-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₈ S	540.2381	-0.7	7.6	<u>306.0758</u> , 288.0646, 272.0882, 254.0778, 160.0078, 143.0465 , 128.0348
DBP-2H+GSH	C ₂₄ H ₃₇ N ₃ O ₇ S	510.2287	1.5	8.2	492.2179, 272.0886, 254.0793, 237.1316, 143.0462, 128.0353
DBP+gluc	C ₂₀ H ₃₀ O ₇	381.1924	1.4	8.7	205.1595 , 175.0247, 113.0240 , 85.0291
BHT+O+gluc	C ₂₁ H ₃₂ O ₈	411.2026	0.5	8.8	193.0360, 131.0341, 113.0244, 85.0289
BHT-acid+gluc	C ₂₁ H ₃₀ O ₉	425.1820	0.9	8.3	249.1491, <u>193.0354</u> , 175.0247 , 131.0344 , 113.0239 , 72.9929
BHQ+gluc	C ₂₀ H ₃₀ O ₈	397.1864	-1.0	7.1	221.1537, 175.0135, 113.0242, 85.0290
BHQ+SO₃	C ₁₄ H ₂₂ O ₅ S	301.1117	0.8	9.0	221.1539 , 164.0844, 80.9645, 79.9576

*fragments of >20% relative intensity are listed in bold, base peak is underlined

Another two oxidative metabolites were detected at 9.8 and 13.5 min, both corresponding to C₁₅H₂₁O₃⁻ (m/z 249.150). The isomer eluting at 9.8 min showed a characteristic fragment at m/z 205.1592 corresponding to the loss of CO₂ (Table 4.1) and lost the three labels from BHT-d₃ (Table 4.2), proving it to be BHT-acid, where the methyl group is oxidized to a carboxylic acid. To further confirm this, the commercial standard of BHT-acid was purchased and showed the same retention time (Figure 4.5) and MS/MS fragmentation behavior. The second isomer (Table 4.1), at 13.5 min, presented a water loss consistent with an oxidation on a methyl group, as well as the loss of CH₂O. The analogous metabolite from BHT-d₂₀ had lost one deuterium (m/z 268.2689), while BHT-d₃ lost its three labels (m/z 249.1504). Taken together, these results confirm this isomer as hydroxylated BHT-aldehyde (BHT-aldehyde+O).

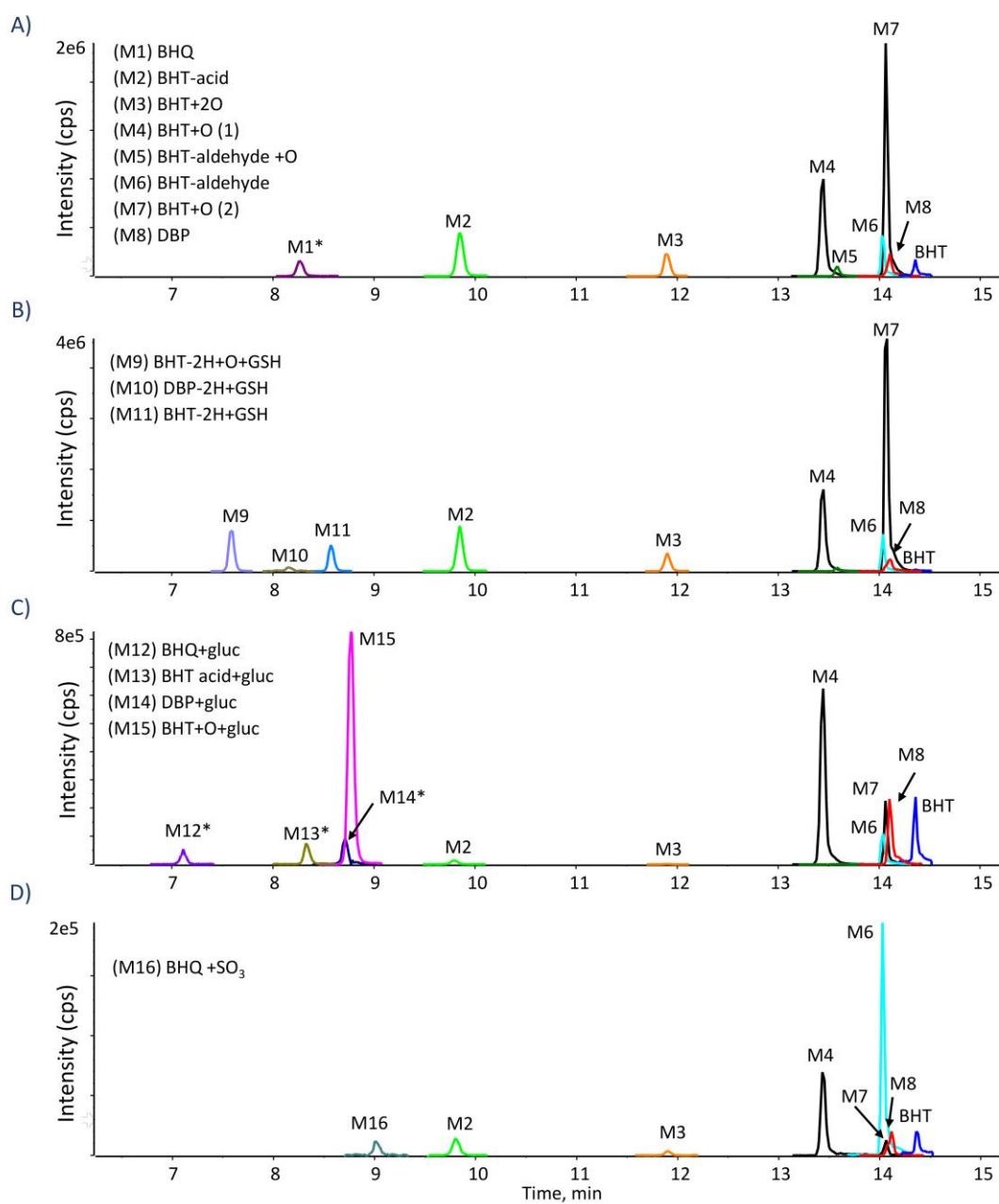


Figure 4.2 Extracted ion chromatograms of BHT metabolites formed in (A) HLM with NADPH; (B) HLM with NADPH and GSH; (C) HLM with NADPH and UDPGA; (D) Human S9 fraction with NADPH and PAPS; Peaks with * were increased by 10x.

Table 4.2. High-resolution mass spectrometry data using isotope-labeled BHT analogs.

Metabolite	BHT-d ₃ Formula <i>m/z</i> (ppm)	BHT-d ₂₀ Formula <i>m/z</i> (ppm)	Comments
BHT+O (1)	C ₁₅ D ₂ H ₂₂ O ₂ 237.1834 (2.1)	C ₁₅ D ₂₀ H ₄ O ₂ 255.2967 (3.2)	O added on <i>p</i> -CH ₃
BHT+O (2)	C ₁₅ D ₃ H ₂₁ O ₂ 238.1893 (0.7)	C ₁₅ D ₁₉ H ₄ O ₂ 254.2903 (2.6)	O added on <i>t</i> -butyl
BHT+2O	C ₁₅ D ₂ H ₂₂ O ₃ 238.1893 (0.7)	C ₁₅ D ₁₉ H ₄ O ₃ 270.2855 (3.6)	O added on <i>p</i> -CH ₃ and <i>t</i> -butyl
BHT-aldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O ₂ 233.1553 (2.5)	C ₁₅ D ₂₀ H ₂ O ₂ 253.2811 (3.4)	Aldehyde in <i>para</i> position
BHT-acid	C ₁₅ H ₂₂ O ₃ 249.1505 (3.5)	C ₁₅ D ₂₀ H ₂ O ₃ 269.2757 (2)	Carboxylic acid in <i>para</i> position
BHT-aldehyde+O	C ₁₅ H ₂₂ O ₃ 249.1504 (3.1)	C ₁₅ D ₁₉ H ₂ O ₃ 268.2689 (0.1)	CHO on <i>p</i> -methyl, OH on <i>t</i> -butyl
DBP	C ₁₄ H ₂₂ O 205.1607 (4.4)	C ₁₄ D ₂₀ H ₂ O 225.2861 (3.4)	DBP structure
BHQ	C ₁₄ H ₂₂ O ₂ 221.1548 (0.4)	C ₁₄ D ₂₀ H ₂ O ₂ 241.2797 (-2.2)	O added to DBP in <i>para</i> position
BHT-2H+GSH	C ₂₅ D ₂ H ₃₇ N ₃ O ₇ S 526.2560 (-0.2)	C ₂₅ D ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₇ S 544.3691 (-0.1)	SG group added to <i>p</i> -CH ₃
BHT+O-2H+GSH	C ₂₅ D ₂ H ₃₇ N ₃ O ₈ S 542.2508 (-0.4)	C ₂₅ D ₁₉ H ₂₀ N ₃ O ₈ S 559.3588 (1.8)	SG added to <i>p</i> -CH ₃ and O on <i>t</i> -butyl
DBP-2H +GSH	C ₂₄ H ₃₇ N ₃ O ₇ S 510.2274 (-1.1)	C ₂₄ D ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₇ S 530.3541 (1.2)	SG added to ring in <i>para</i> position
DBP+gluc	C ₂₀ H ₃₀ O ₇ 381.1924 (1.4)	C ₂₀ D ₂₀ H ₁₀ O ₇ 401.3184 (2.5)	Glucuronide on hydroxyl of DBP
BHT+O+gluc	C ₂₁ D ₃ H ₂₉ O ₈ 414.2222 (2.2)	C ₂₁ D ₁₉ H ₁₃ O ₈ 430.3218 (0.2)	Glucuronide on O added on <i>t</i> -butyl
BHT-acid+gluc	C ₂₁ H ₃₀ O ₉ 425.1821 (0.9)	C ₂₁ D ₂₀ H ₁₀ O ₉ 445.3068 (-1.0)	Glucuronide on carboxylic acid
BHQ+gluc	C ₂₀ H ₃₀ O ₈ 397.1877 (2.3)	C ₂₀ D ₂₀ H ₁₀ O ₈ 417.3120 (0.8)	Glucuronide added to <i>para</i> -OH
BHQ+SO ₃	C ₁₄ H ₂₂ O ₅ S 301.1116 (0.5)	C ₁₄ D ₂₀ H ₁₀ O ₉ 321.2369 (-0.4)	SO ₃ attached to BHQ

DBP (2,6-di-tert-butylphenol) is a known metabolite of BHT. It is also used as a synthetic phenolic antioxidant in plastics and food packaging (Yang *et al.*, 2016). DBP was detected in oxidative incubations at 14.2 min with m/z 205.1600 (Table 4.1, Figure 4.2). This metabolite has been confirmed by the synthetic DBP standard, which was also incubated under oxidative conditions (Figure 4.5). Further oxidation of DBP can form BHT-hydroquinone (BHQ), which was also detected in BHT incubations at 8.3 min (Table 4.1, Figure 4.2). The loss of all three deuterium labels from BHT-d₃ and none from BHT-d₂₀ confirm the *para*-hydroquinone structure (Table 4.2) of BHQ.

Numerous metabolites of BHT have been described and metabolic pathways proposed (Lanigan et Yamarik, 2002; Pont, 2004). A major metabolic pathway is initiated by the oxidation of the *p*-methyl group, leading to the formation BHT-aldehyde and BHT-acid by stepwise oxidation. The acidic form is decarboxylated to DBP, from which BHQ is likely formed. Another metabolic pathway is initiated by the oxidation of the *t*-butyl group. The double oxidation forms BHT+2O, being further oxidized into hydroxylated BHT-aldehyde (BHT-aldehyde+O) (Figure 4.3). Thompson *et al.* (Thompson *et al.*, 1987) studied the oxidative metabolism of BHT by hepatic and pulmonary rodent microsomes and identified several of these metabolites by LC-UV, GC-MS and using radiolabeled BHT (¹⁴C-BHT). The oxidative pathways of BHT have also been studied *in vivo* in different species, including the oxidation of the *p*-methyl group as a major metabolic route in rat, rabbit, and monkey, while the oxidation of *t*-butyl groups has been described as the predominant pathway in human and mouse (Conning et Phillips, 1986). Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2020) reported that BHT and its metabolites, including BHT-acid, BHQ and BHT-aldehyde were present in metabolism-related organs (e.g., liver and kidney) in mouse.

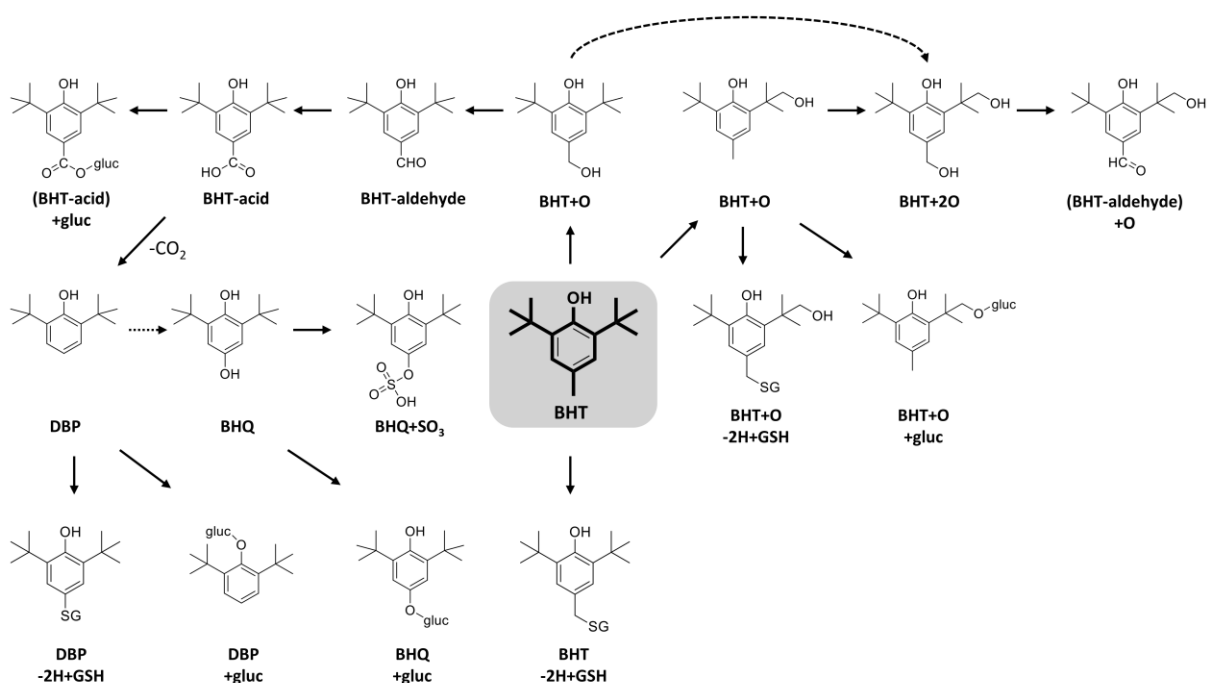


Figure 4.3 Proposed biotransformation reactions of BHT.

When GSH was added under oxidative conditions, three adducts were detected (Figure 4.2), corresponding to BHT-2H+GSH at 8.5 min, BHT+O-2H+GSH at 7.6 min and DBP-2H+GSH at 8.2 min. HRMS/MS spectra for these adducts were dominated by characteristic peaks from the GSH moiety (m/z 306.077, 272.089, 254.078, 160.007, 143.046 and 128.035) (Table 4.1). The most prominent fragment ion for BHT-2H+GSH and BHT+O-2H+GSH was m/z 306.07 (Table 4.1), corresponding to deprotonated GSH. These two metabolites are proposed to result from the formation of the quinone methide intermediate followed by the addition of GSH on the methylene carbon. This hypothesis is supported by results from incubations with isotope-labeled BHT analogs. For BHT-2H+GSH, BHT- d_3 lost one deuterium and none were lost from BHT- d_{20} . Tajima *et al.* (Tajima *et al.*, 1983) had also identified this metabolite by ^{13}C -NMR in rat bile. For BHT+O-2H+GSH, both BHT- d_3 and BHT- d_{20} lost one deuterium, confirming the same mechanism as above with the *t*-butyl being hydroxylated as well.

This GSH adduct was also described by Madsen *et al.* where they compared electrochemical and enzymatic formation of several reactive metabolites (Madsen *et al.*, 2007).

The deprotonated ion of DBP-2H+GSH did not form m/z 306 upon CID and instead had a unique fragment ion at m/z 237.1316, assigned as deprotonated DBP with the sulfur of GSH still attached. The HR-MS spectra of isotope labeled analogs showed the loss of the three labels from BHT-d₃, while none were lost from BHT-d₂₀ (Table 4.2). This supports the structure where the SG group replaces the methyl group. The formation of this metabolite is explained by a radical pathway, initiated by the decarboxylation of BHT-acid to form DBP[•], followed by GSH trapping. Glutathione is able to scavenge radicals by its electron donating ability, enabling it to neutralize such reactive species. This GSH adduct had not been described in previous studies.

Several glucuronide conjugates were detected, including hydroxy-BHT glucuronide (BHT+O+gluc) at 8.8 min, BHT-acid glucuronide (BHT-acid+gluc) at 8.3 min, DBP glucuronide (DBP+gluc) at 8.7 min, and BHQ glucuronide (BHQ+gluc) at 7.1 min (Figure 4.2, Table 4.1). The MS/MS spectra of these conjugates were dominated by characteristic peaks from the glucuronide moiety, at m/z 175, m/z 113, and m/z 85, as well as the neutral loss of C₆H₈O₆ (Table 4.1).

The only sulfate metabolite detected could be assigned as BHQ+SO₃, eluting at 9.0 min (Figure 4.2). Its HRMS/MS spectra presented characteristic peaks of the sulfate conjugates at m/z 80.9645, m/z 79.9576 and m/z 221.1539 corresponding to the HSO₃⁻ ion, the sulfonate radical ion (SO₃^{•-}) and the neutral loss of the SO₃ radical. This sulfated metabolite had not been reported previously.

4.4.2 Metabolism of BHA and TBHQ

BHA is an analog of BHT and has been used in different industries alone or in combination with BHT and other antioxidants. TBHQ is a metabolite of BHA through

O-demethylation and a powerful synthetic phenolic antioxidant. BHA and TBHQ were also incubated under the same conditions studied for BHT. Table 4.3 summarizes LC-HRMS/MS results for BHA and all detected metabolites. The deprotonated molecules $[M-H]^-$ of BHA and TBHQ were detected at m/z 179.1084 and m/z 165.0921, with retention times at 12.7 and 9.6 min, respectively. Their MS/MS spectra (Figure 4.1) yielded common product ions at m/z 149.060 and 108.021, assigned as $C_9H_9O_2^-$ and $C_6H_4O_2^-$, respectively.

Table 4.3. Summary of MS/MS data for BHA metabolites in negative ion mode.

Metabolite	Formula	m/z [M-H] ⁻	ppm	RT (min)	Selected MS/MS fragments [*]
BHA	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	179.1084	3.6	12.7	<u>164.0838</u> , <u>149.0604</u> , 121.0656, 108.0213
BHA+O (1)	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	195.1027	2.3	11.8	<u>180.0795</u> , <u>165.0560</u> , 137.0609
BHA+O (2)	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	195.1031	2.4	11.4	<u>180.0784</u> , <u>165.0552</u>
BHA dimer	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	357.2076	1.5	14.4	<u>342.1831</u> , <u>327.1608</u>
BHA-2H+GSH	C ₂₁ H ₃₁ N ₃ O ₈ S	484.1760	0.2	5.8	<u>272.0898</u> , <u>254.0791</u> , <u>211.0810</u> , 210.0884, 179.0456, <u>143.0461</u> , <u>128.0345</u> <u>306.0759</u> , 272.0864, 254.0750,
BHA+O-2H+GSH	C ₂₁ H ₃₁ N ₃ O ₉ S	500.1709	0.3	5.0	210.0892, 179.0450, 160.0056, 143.0470, 128.0371 <u>272.0924</u> , <u>254.0822</u> , <u>210.0916</u> ,
TBHQ-2H+GSH (1)	C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₈ S	470.1602	-0.1	5.1	<u>197.0660</u> , <u>179.0479</u> , 146.0468, <u>143.0471</u> , <u>128.0358</u> <u>272.0925</u> , <u>254.0821</u> , 210.0911,
TBHQ-2H+GSH (2)	C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₈ S	470.1675	2.3	5.4	<u>197.0662</u> , 185.0586, 179.0476, 166.0998, 146.0462, <u>143.0466</u> , <u>128.0358</u> 339.1025, <u>272.0930</u> , 254.0811, 210.0896, <u>197.0657</u> , <u>195.0503</u> ,
TBHQ-4H+GSH	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₈ S	468.1446	0.6	6.4	<u>192.1049</u> , 179.0465, 146.0442, <u>143.0466</u> , <u>128.0353</u> 646.1861, <u>502.1334</u> , 468.1445, 306.0769, 272.0890, 254.0790, 229.0358, 195.0488, 143.0463
TBHQ-4H+2GSH	C ₃₀ H ₄₄ N ₆ O ₁₄ S ₂	775.2288	0.6	1.7	337.1300, 179.1082, <u>175.0252</u> , <u>164.0845</u> , 117.0196, <u>113.0243</u> , 85.0296, 75.0090, 59.0139
BHA+gluc	C ₁₇ H ₂₄ O ₈	355.1401	0.9	5.6	353.1259, 265.1083, <u>195.1035</u> , <u>180.0800</u> , 175.0254, 113.0245, 85.0293, 75.0080, 59.0135
BHA+O+gluc (1)	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	371.1351	1	5.7	<u>195.1027</u> , <u>180.0792</u> , 175.0242, 113.0237, 85.0287
BHA+O+gluc (2)	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	371.1357	2.6	6.6	175.0253, <u>165.0920</u> , <u>113.0247</u> , 85.0295, 59.0137
TBHQ+gluc	C ₁₆ H ₂₂ O ₈	341.1240	-0.4	3.4	244.0405, 179.1070, <u>164.0842</u> , 149.0606, <u>70.9571</u> 239.0718, <u>179.1077</u> , <u>164.0844</u> , 149.0635, <u>79.9571</u>
BHA+SO₃ (1)	C ₁₁ H ₁₆ O ₅ S	259.0647	4.7	8.3	<u>195.1032</u> , <u>180.0794</u> , 165.0559, 79.9574 165.0923, 149.0607, 108.0213, 80.9651, 79.9572
BHA+SO₃ (2)	C ₁₁ H ₁₆ O ₅ S	259.0645	0.4	7.2	
BHA+O+SO₃	C ₁₁ H ₁₆ O ₆ S	275.0597	0.8	8.4	
TBHQ+SO₃	C ₁₀ H ₁₄ O ₅ S	245.0489	1.4	5.7	

*fragment ions of >20% intensity relative to base peak are listed here in bold, base peak in each spectrum in underlined.

Two hydroxylated BHA metabolites (BHA+O) were detected (Figure 4.6) at 11.4 and 11.8 min (Table 4.3). No significant differences were seen in their MS/MS spectra. These hydroxylated BHA isomers were attributed to the fact that BHA is a mixture of two isomers, 2-BHA (10%) and 3-BHA (90%). Armstrong *et al.* (Armstrong et Wattenberg, 1985) were the first to identify 3-BHA+O by incubating pure 3-BHA (99.5%) with RLM under oxidative conditions, using $^1\text{H-NMR}$. Hydroxylated TBHQ (TBHQ+O) were also detected (Figure 4.7) at 8.2 min.

A BHA dimer ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_4$) was detected at 14.4 min (Figure 4.6), with m/z 357.2076 (1.5 ppm). Armstrong *et al.* (Armstrong et Wattenberg, 1985) also described a di-BHA metabolite (Armstrong et Wattenberg, 1985). BHA dimer was also found to form in rat intestine and by incubating BHA with rat intestine peroxidase, as well as horseradish peroxidase (Sgaragli *et al.*, 1980). No dimer was detected for TBHQ under our conditions, which may be explained by its preference to form the quinone reactive metabolite.

Identical GSH adducts were detected for BHA and TBHQ, namely two isomers of TBHQ-2H+GSH (at 5.1 and 5.4 min), TBHQ-4H+GSH (at 6.4 min) and a di-glutathione adduct, TBHQ-4H+2GSH (at 1.7 min) (Figure 4.6 and 4.7). The HRMS/MS spectra from these GSH adducts were dominated by characteristic fragment ions of deprotonated GSH (m/z 272, 254, 210, 179, 166, 143 and 128), with the exception of m/z 197.066 ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_2\text{S}^-$) for the two isomers, where the sulfur atom of GSH is still bound to deprotonated TBHQ (Table 4.3). These GSH adducts were also detected in rat bile and urine following TBHQ administration (Peters *et al.*, 1996). Peters *et al.* (Peters *et al.*, 1996) reported three GSH conjugates of TBHQ *in vivo*, including 5-(GS)-TBHQ, 6-(GS)TBHQ, and 3,6-(GS)₂-TBHQ by LC-MS and $^1\text{H-NMR}$. They also suggested that these conjugates could represent nephrotoxic metabolites, and may be responsible for the tumor promoting effects of TBHQ and BHA (Peters *et al.*, 1996). Two novel BHA glutathione adducts have been detected

here, namely BHA-2H+GSH (at 5.8 min) and BHA+O-2H+GSH (at 5.0 min) (Figure 4.6). The first is suggested to be formed via the formation of an epoxide followed by GSH addition and loss of a water molecule, while the second is likely formed via the *ortho*-quinone reactive metabolite.

Four BHA glucuronide conjugates were detected, namely TBHQ+gluc, BHA+gluc, and two isomers of BHA+O+gluc (at 3.4, 5.6, 5.7, and 6.6 min, respectively) (Table 4.3). By comparing the MS/MS spectra of the two BHA+O+gluc isomers at 5.7 min showed a water loss at m/z 353.1259 ($C_{17}H_{20}O_7^-$, 2.1 ppm) proving that the oxygen is added to the *tert*-butyl group and not in the ring as for the isomer detected at 6.6 min. These two novel metabolites have not been previously characterized. TBHQ also formed the same glucuronide conjugate as BHA (TBHQ+gluc) at 3.4 min (m/z 341.1240) with fragment ions mostly from the glucuronide moiety.

Several sulfate conjugates were detected for BHA, including two isomers corresponding to BHA+SO₃ at 7.2 and 8.3 min. Their MS/MS spectra yielded very similar fragments suggesting that one is 3-BHA+SO₃ and the other 2-BHA+SO₃ (Table 4.3). One peak corresponding to BHA+O+SO₃ was detected at 8.4 min. Additionally, a common sulfate conjugate between BHA and TBHQ (TBHQ+SO₃) was detected at 5.7 min. These same sulfate conjugates were previously detected in human urine using GC-MS (El-Rashidy et Niazi, 1983). The proposed biotransformation products of BHA and TBHQ are summarized in Figure 4.4.

The major metabolic pathway for BHA is reported to be via the conjugation of the free hydroxyl group with both glucuronic acid and sulfate (El-Rashidy et Niazi, 1983). Conning *et al.* (Conning et Phillips, 1986) reported that glucuronide conjugation predominates in rat, rabbit and human, whereas sulfation is the major phase II reaction in dog. The major TBHQ metabolites found in rat bile and urine were TBHQ-glucuronide and TBHQ-sulfate (Peters *et al.*, 1996).

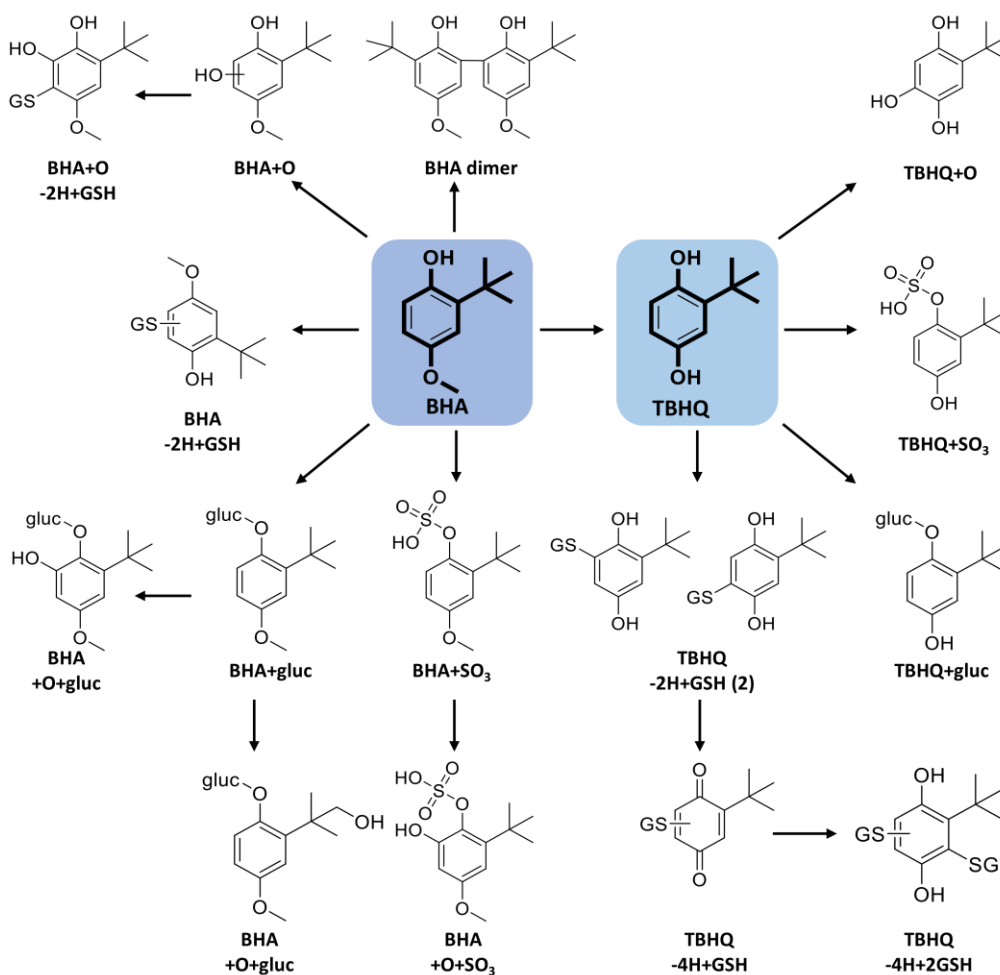


Figure 4.4 Proposed biotransformation reactions of BHA and TBHQ.

4.4.3 Metabolism of DBP and BHT acid

DBP and BHT acid standards were used to confirm the two metabolites of BHT, as mentioned above. The oxidative metabolism for these two compounds was also studied to help support the complex metabolic pathway proposed for BHT.

Under oxidative conditions, DBP formed previously uncharacterized oxidative metabolites, including a major metabolite hydroxylated of the *t*-butyl group (DBP+O),

as well as two di-hydroxylated forms and a carboxylic acid metabolite (DBP+2O-2H). Figure 4.5 shows the extracted ion chromatograms for DBP and BHT-acid oxidative metabolites, as well as a proposed scheme for their formation, supported by high-resolution MS/MS spectra for each metabolite.

The BHT-acid standard confirmed this BHT metabolite and helped distinguish it from the novel (BHT-aldehyde)+O. BHT-acid incubations showed that the formation of DBP and BHQ was non-enzymatic and allowed a novel hydroxylated (BHT-acid+O) metabolite to be characterized (Figure 4.5).

By compiling the results from *in vitro* biotransformations of BHT, BHA, TBHQ, DBP and BHT-acid, comprehensive schemes of the many metabolic transformation for these small synthetic antioxidants have been proposed. Using an untargeted high-resolution tandem mass spectrometry approach to decipher the metabolism of analogous compounds, while incorporating isotope labeling, proved to be a powerful method to elucidate structures of all detected metabolites.

4.5 Methods

4.5.1 Chemicals

Butylated hydroxytoluene [BHT, 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol,], butylated hydroxyanisole [BHA, 2(3)-tert-butyl-4-methoxyphenol (90%/10%)], tert-butylhydroquinone [TBHQ, 2-tert-butylbenzene-1,4-diol,], 2,6-di-tert-butylphenol [DBP, 2,6-bis(tert-butyl)phenol], BHT acid [3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzoic acid], glutathione (GSH), uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGA), 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), glucose-6-phosphate, MgCl₂ and glucose-6-phosphate dehydrogenase, as well as HPLC-grade acetonitrile (ACN), methanol and formic acid were all purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). BHT-d₃ [2,6-di-tert-butyl-4-methyl-d₃-phenol] and BHT-d₂₁ [2,6-di-(tert-butyl-d₉)-4-methylphenol-3,5-

d₂,OD] were purchased from CDN Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada). BHT-d₂₀ was created by heating the BHT-d₂₁ for 2 hours at 60 °C. Human and rat liver microsomes (HLM and RLM) and human and rat liver S9 (HS9 and RS9) fractions were purchased from Corning (Corning, NY). Ultrapure water was from a Millipore Synergy UV system (Billerica, MA).

4.5.2 *In vitro* incubations

4.5.2.1 Oxidative metabolites and GSH adducts

BHT and analogs were incubated at 20 µM with human and rat liver microsomes (1mg/mL protein) containing 5 mM GSH, NADPH-regenerating system: 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 10 mM glucose-6-phosphate and 2 units/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase at 37°C for 1h in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. Control samples were prepared without NADPH regenerating system and/or without GSH. Adding an equal volume of cold acetonitrile quenched the reaction. Incubation mixtures were centrifuged for 8 minutes at 14000 rpm, at 4°C. The supernatants were diluted (1:1) in water prior to LC-MS/MS analysis.

4.5.2.2 Phase II metabolism - Glucuronidation and Sulfation

To study the glucuronide conjugates, all compounds (20 µM) were incubated with HLM and RLM (1 mg/ml protein), NADPH-regenerating system (as above) and 5 mM UDPGA at 37°C for 1h. Each compound (20 µM) was also incubated with human and rat S9 fractions (2 mg/ml) in phosphate buffer, containing 1 mM of PAPS and NADPH-regenerating system to study the formation of sulfates conjugates. All samples were incubated at 37°C for 1h, quenched and centrifuged as above. Supernatants (diluted as above) were subjected to LC-MS/MS analysis.

4.5.3 LC-HRMS/MS analysis and data processing

LC-MS/MS analyses were performed using a Shimadzu Nexera HPLC coupled to a Sciex 5600 TripleTOF® (quadrupole-time-of-flight) system (Concord, ON, Canada), in negative electrospray mode.

Chromatographic separation was performed using a Phenomenex Kinetex biphenyl (100 x 2.1 mm, 2.6 µm) column, using mobile phases of 5 mM ammonium acetate in water and 100% ACN, at 0.25 ml/min and a column temperature of 40°C. The injection volume was 25 µl. The HPLC gradient was as follows: 5% B held for 0.5 min, linearly increased to 30% at 8 min, up to 50% at 12 min and 90% at 13 min, held for an additional 2 minutes.

Ion source parameters were as follows: ionization voltage at 5000 V, curtain gas of 35 psi, drying and nebulizer gases each at 50 psi, source temperature of 450°C and declustering potential of 60 V. TOF-MS spectra were acquired (with 250 ms accumulation time), followed by MS/MS in information-dependent acquisition (IDA) mode on the 5 most intense ions using dynamic background subtraction. Nitrogen was used as collision gas and collision energy was 30 ± 10 V (175 ms each). For metabolites that did not acquire high quality MS/MS in IDA mode, targeted MS/MS mode was used in a second injection.

MetabolitePilot 2.0 (Sciex) software was employed to screen samples for potential metabolites using a set of known biotransformation including oxidative reactions, GSH, glucuronide and sulfate conjugates. PeakView 2.2 and MasterView 1.1 (Sciex) were also used for processing LC-MS/MS data to confirm and expand the list of features based on mass accuracy, isotope pattern and MS/MS analysis.

4.6 Conclusion

The metabolism of BHT and several analogs was investigated *in vitro* using human and rat liver microsomes and S9 fractions. Many oxidative metabolites, GSH adducts, glucuronide and sulfate conjugates were detected with excellent mass accuracy, some of which had not been previously reported. Structures of biotransformation products were elucidated by HRMS/MS data and supported using isotope labeled analogs. These results have enabled many biotransformation products to be determined, which are potentially involved in the toxicity of these compounds. Knowledge of all these possible metabolites would be useful in assessing environmental exposure to these compounds.

4.7 Supplemental information

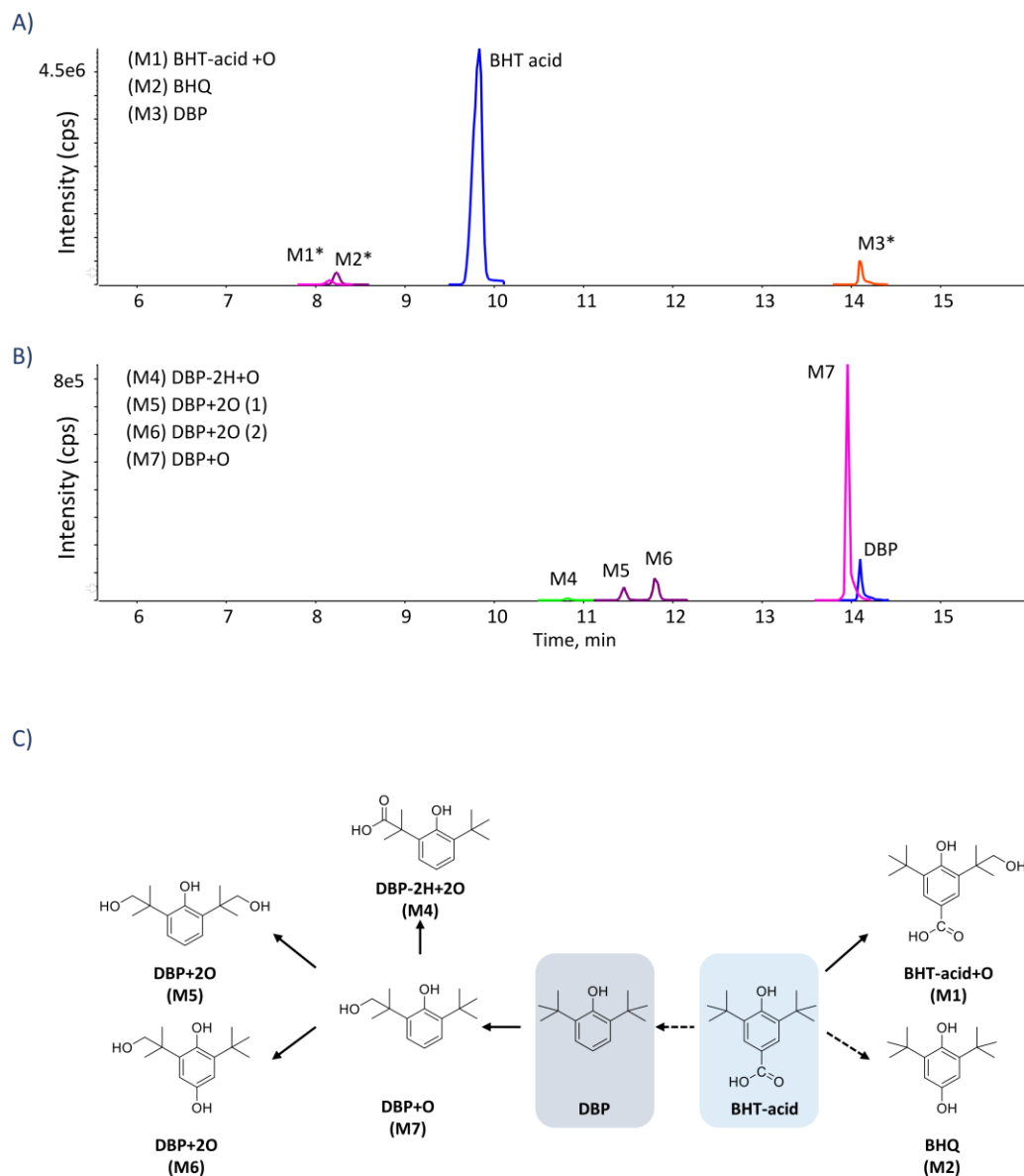


Figure 4.5 Extracted ion chromatograms of oxidative metabolites formed when BHT-acid (A) and DBP (B) were incubated with HLM and NADPH; Peaks with * were increased by 5x. (C) Proposed biotransformation of DBP and BHT-acid; dotted arrows refer to non-enzymatic reactions (peaks found in control without incubation time, quenched at 0 min)

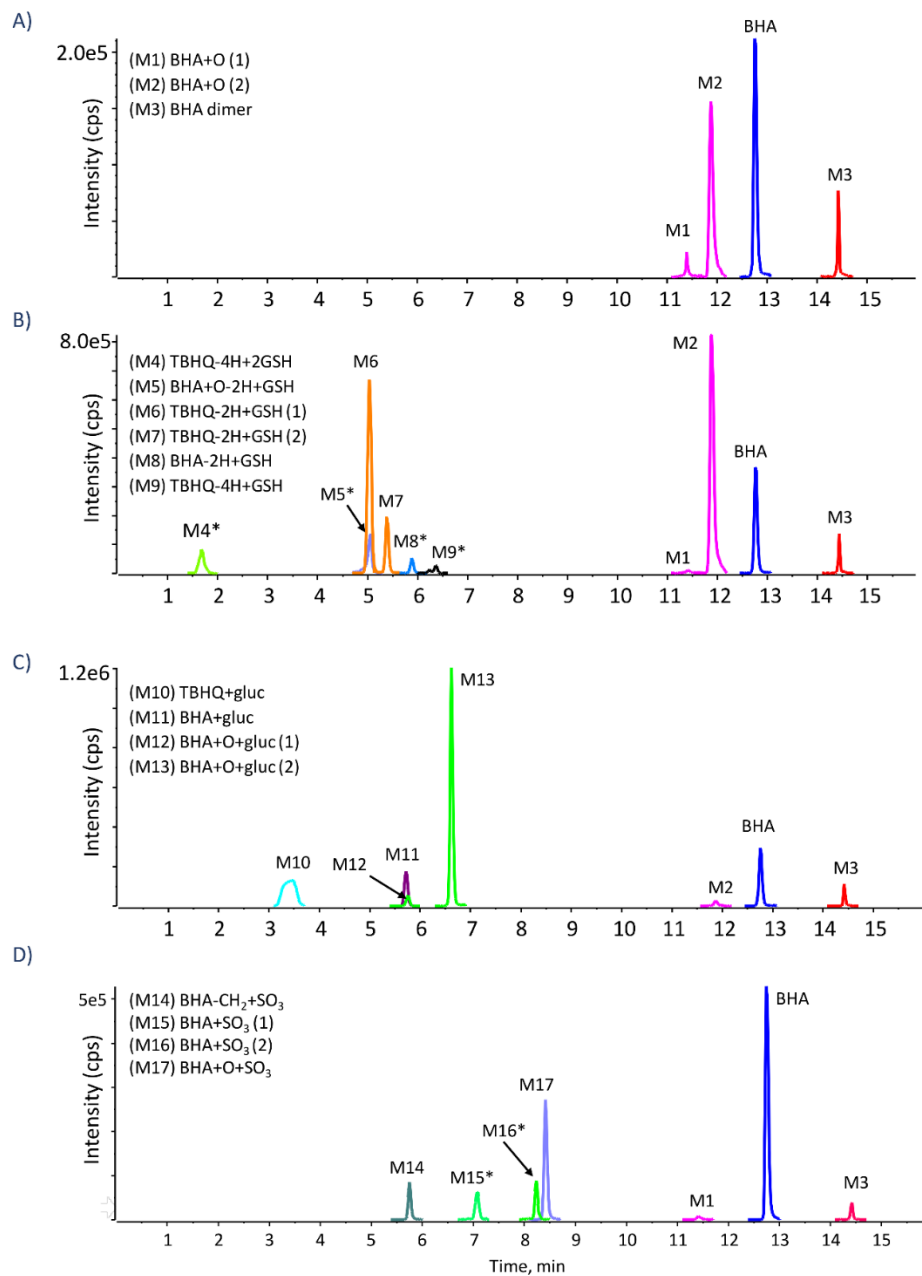


Figure 4.6 Extracted ion chromatograms of BHA metabolites formed in HLM with added (A) NADPH, (B) NADPH and GSH, (C) NADPH and UDPGA, and (D) Human S9 fraction with NADPH and PAPS. Peaks with * were increased by 10x.

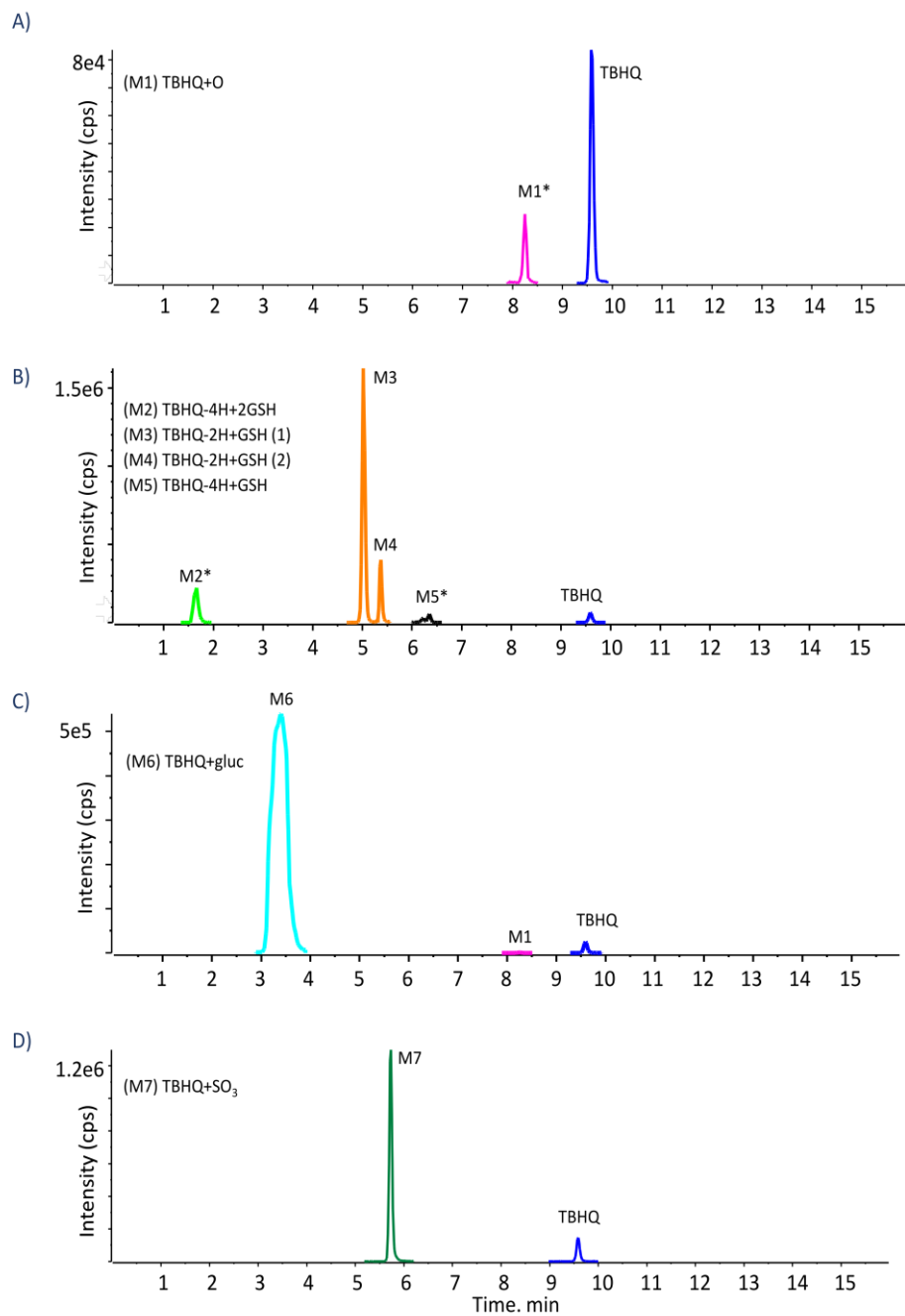


Figure 4.7 Extracted ion chromatograms of TBHQ metabolites formed in (A) HLM with NADPH; (B) HLM with NADPH and GSH; (C) HLM with NADPH and UDPGA; (D) Human S9 with NADPH and PAPS; Peaks with * increased by 10x.

CHAPITRE V

ARTICLE 4

STRUCTURAL ELUCIDATION OF NOVEL STABLE AND REACTIVE METABOLITES OF GREEN TEA CATECHINS AND ALKYL GALLATES BY LC-MS/MS

Ons Ousji and Lekha Sleno

Université du Québec à Montréal, Chemistry Department P.O. Box 8888, Downtown
Station, Montréal, QC, Canada

Article publié dans la revue scientifique *Antioxidants*, 2022, 11(9), 1635 ; dans la
section : Natural and Synthetic Antioxidants

DOI : 10.3390/antiox11091635

Contribution des auteurs :

Ons Ousji et Lekha Sleno sont les co-auteurs de ce manuscrit. Ons Ousji a mené la recherche bibliographique, préparé les protocoles expérimentaux, réalisé les expériences, traité les données et préparé le manuscrit. Lekha Sleno a supervisé le projet, vérifié l'analyse des données et l'interprétation des résultats, révisé et finalisé le manuscrit.

5.1 Résumé

Les dérivés synthétiques de l'acide gallique sont utilisés comme additifs dans les aliments, les produits de soins personnels et les formulations pharmaceutiques. Malgré leur utilisation répandue, leur exposition humaine, leurs effets sur la santé et leur métabolisme sont encore peu étudiés. Les catéchines du thé vert sont des antioxydants naturels, connus pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé, et sont également utilisés comme additifs alimentaires ou dans les produits de soins personnels. L'objectif de cette étude était d'établir les voies métaboliques impliquées dans la biotransformation des catéchines du thé vert et des esters gallates synthétiques. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem à haute résolution (LC-HRMS/MS) a été utilisée pour élucider les métabolites oxydatifs et méthylés, en plus des conjugués du glutathion, formés *in vitro* en utilisant des incubations de microsomes de foie humain. La méthode développée a été appliquée à 14 composés parents différents avec une large gamme de polarités, pour l'élucidation structurelle de nombreux métabolites connus et nouveaux. Ces résultats servent à informer sur la grande variété de métabolites possibles formés lors de l'exposition à ces composés.

5.2 Abstract

Synthetic gallic acid derivatives are employed as additives in food, personal care products, and pharmaceutical formulations. Despite their widespread use, little is known about their human exposure, health effects, and metabolism. Green tea catechins are natural antioxidants, known for their health-promoting properties, and are also employed as food additives or in personal care products. The objective of this study was to establish metabolic pathways involved in the biotransformation of green tea catechins and synthetic gallate esters. Liquid chromatography coupled with high-resolution tandem mass spectrometry (LC-HRMS/MS) was used to elucidate oxidative and methylated metabolites, in addition to glutathione conjugates, formed *in vitro* using human liver microsomal incubations. The developed method was applied to 14 different parent compounds with a wide range of polarities, for the structural elucidation of many known and novel metabolites. These results serve to inform about the wide variety of possible metabolites formed upon exposure to these compounds.

5.3 Introduction

Lipid peroxidation is the primary cause of the formation of undesired byproducts in food, cosmetics, pharmaceuticals, and petrochemicals (Brewer, 2011). The addition of antioxidants is commonly used to inhibit or slow this process, to increase shelf life, and to maintain freshness and texture of consumer products (Mitterer-daltoé, 2021; Viana da Silva *et al.*, 2021). These compounds can inhibit free radical formation and thus interrupt autoxidation (Brewer, 2011). Synthetic antioxidants present many advantages, including low cost, ease of synthesis, and high efficiency (Pokorný, 2007; Sindhi *et al.*, 2013). However, as a result of the global movement toward using natural ingredients in food products, medications, and personal care products, natural antioxidants are gaining interest (Khanam et Prakash, 2021). These antioxidants include vitamins (C and E), herbs and spices, and natural products from plants (Brewer, 2011; Khanam et Prakash, 2021). They are used as preservatives and bioactive molecules for prevention against diseases such as cancer (Basati *et al.*, 2020), obesity (Perez-Torres *et al.*, 2021), neurological disorders (Floyd, 1999), aging (Hano et Tungmunnithum, 2020), and cardiovascular diseases (Hrelia et Angeloni, 2020). They are often considered a healthier alternative to synthetic antioxidants (Mitterer-daltoé, 2021).

Plant extracts such as green and black teas have been widely studied for their antioxidant activities (Hano et Tungmunnithum, 2020). Green tea extracts have the highest total phenolic content, 94% of which are flavonoids (catechins) and phenolic acids (e.g., gallic acid (GA)) (Brewer, 2011; Sindhi *et al.*, 2013). Flavonoids consist of a flavan-3-ol unit, including catechin (C), epicatechin (EC), galocatechin (GC), and epigallocatechin (EGC), in addition to galloylated catechins, in the case of catechin gallate (CG), epicatechin gallate (ECG), galocatechin gallate (GCG), and epigallocatechin gallate (EGCG) (Du *et al.*, 2012). These tea polyphenols have gained special attention due to their numerous beneficial effects (antioxidant (Sugimoto *et al.*, 2021), antimicrobial (Wu et Brown, 2021), antiviral (Park *et al.*, 2021), and antifungal

effects (Murtiastutik *et al.*, 2021), in addition to protective effects against different cancers (Du *et al.*, 2012; Dufresne et Farnworth, 2001)). The relative effectiveness of different catechins is related to their structure (for example, the number of hydroxyl groups and their positions, and the accessibility of active groups), concentration, and stability (Velayutham *et al.*, 2008).

The structure–activity relationships of tea polyphenols on cancer chemoprevention have been studied (Du *et al.*, 2012; Sicard *et al.*, 2021), indicating that the galloyl moiety is a specific structural feature for the chemopreventive (Sicard *et al.*, 2021), weight reducing (Kajimoto *et al.*, 2005), and potential anti-HIV (Zhao *et al.*, 2012) properties of catechins. Despite all these advantages, the development of catechins as natural antioxidants and therapeutic agents faces several challenges, including low bioavailability and rapid degradation (Wu et Brown, 2021). Polyphenols consumed in the diet are readily accepted by consumers, even if they can present stability issues and lower antioxidant activity, thus needing to be consumed in larger amounts (Pokorný, 2007). However, it is not clear what deleterious effects could be related to consuming them at very high concentrations.

These challenges related to natural polyphenols have inspired the synthesis of several gallate esters, such as ethyl gallate (EG), propyl gallate (PG), butyl gallate (BG), octyl gallate (OG), lauryl gallate (LG), hexadecyl gallate (HG), and octadecyl gallate (SG) (Zhao *et al.*, 2021). These molecules differ by the length of their alkyl side chains, ranging from 2 to 18 carbons, thus having widely different polarities. GA alkyl esters with medium chain lengths have demonstrated very high antioxidant activities and the hydrophobic moiety contributes to the increased bioavailability of these compounds (Wang *et al.*, 2021a; Zhao *et al.*, 2021). These molecules are primarily used as food additives and antibacterial agents (Wang *et al.*, 2021a). Some studies have supported their classification as “healthy” ingredients (Wang *et al.*, 2021a), while in contract, their cytotoxicity has been demonstrated in rat hepatocytes (Nakagawa et Tayama, 1995).

The data available on the biotransformation of tea catechins and synthetic gallate esters is limited and studies have concentrated mainly on EGCG or several of its analogs (Lambert *et al.*, 2007). The major biotransformation reactions described in literature for tea catechins include methylation, glucuronidation, and sulfation (Crespy *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2003). Methylation is the primary metabolic route for these molecules performed by the enzyme catechol-*O*-methyltransferase (COMT) (Lu *et al.*, 2003). The occurrence of methylated metabolites of tea catechins has been reported (Lu *et al.*, 2003; Okushio *et al.*, 1999a; Okushio *et al.*, 1999b). Crespy *et al.* (Crespy *et al.*, 2004) investigated the glucuronidation of some catechins by hepatic and intestinal microsomes. They identified four major glucuronide conjugates of EGCG and EGC by tandem mass spectrometry (MS/MS) and NMR spectroscopy. The sulfation of catechins via sulfotransferases has also been reported (Vaidyanathan *et al.*, 2002). However, the formation of reactive metabolites of tea catechins and synthetic gallate esters via the detection of glutathione conjugates has not been extensively studied-

The *in vitro* metabolism of eight major green tea catechins (C, EC, GC, EGC, CG, ECG, GCG, and EGCG), gallic acid (GA), and five synthetic gallate esters (EG, PG, BG, OG, and LG) has been investigated using liquid chromatography coupled with a quadrupole-time-of-flight high-resolution tandem mass spectrometer. Oxidative metabolites, glutathione adducts and methylated metabolites of these 14 compounds were studied using human liver microsomal incubations. The developed analytical approach achieved the structural characterization of over 100 metabolites.

5.4 Materials and Methods

5.4.1 Chemicals

Green tea catechins [(+)-catechin (C), (-)-epicatechin (EC), (-)-catechin gallate (CG), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-gallocatechin (GC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-gallocatechin gallate (GCG)], synthetic gallate esters [ethyl gallate (EG), propyl gallate (PG), butyl gallate (BG), octyl gallate (OG) and lauryl gallate (LG)], gallic acid (GA), reduced *L*-glutathione (GSH), *S*-(5'-adenosyl)-*L*-methionine (SAM), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), glucose-6-phosphate, magnesium chloride and glucose-6-phosphate dehydrogenase, potassium (mono- and di-basic) phosphate, in addition to HPLC-grade acetonitrile (ACN), methanol, and acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Human liver microsomes (HLM, pooled from 50 donors) were purchased from Corning (Corning, NY, USA). Ultrapure water was obtained from a Millipore Synergy UV system (Billerica, MA, USA).

5.4.2. *In Vitro* Incubations

All catechins and galloylated compounds were incubated at 20 μ M with human liver microsomes (1 mg/mL protein), a NADPH-regenerating system (5 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 10 mM glucose-6-phosphate and 2 units/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase), with and without 5 mM GSH and 1 mM SAM at 37 °C for 1 h in 100 mM phosphate buffer, at a pH of 7.4. Control samples were prepared without NADPH and/or without GSH or SAM. An equal volume of cold acetonitrile was added to quench the reaction, followed by centrifuging for 8 min at 14,000 rpm, at 4 °C. The supernatants were then evaporated and reconstituted in 10% acetonitrile back at original incubation concentrations prior to LC-MS/MS analysis.

5.4.3 LC-HRMS/MS Analysis and Data Processing

LC-MS/MS analysis were performed using a Shimadzu Nexera HPLC coupled to a Sciex 5600 TripleTOF[®] (quadrupole-time-of-flight) system (Concord, ON, Canada), in negative ion electrospray mode, equipped with a DuoSpray source. Chromatographic separation was achieved using a Phenomenex Kinetex[®] biphenyl (100 × 2.1 mm, 2.6 μm) column, with mobile phases of water (A) and methanol (B), both containing 0.1% acetic acid, at 0.25 mL/min and a column temperature of 40 °C. The injection volume was 25 μL. The HPLC gradient was as follows: 5% B held for 0.5 min, linearly increased to 50% at 15 min, up to 95% at 18 min, and held for an additional 3 min. For gallic acid incubations, a slower gradient was used as follows: 3% B held for 1 min, linearly increased to 30% at 15 min, up to 85% at 18 min.

Ion source parameters included ionization voltage of 5000 V, curtain gas of 35 psi, drying and nebulizer gases at 50 psi, source temperature of 450 °C, and declustering potential of 60 V. TOF-MS spectra were acquired (with 250 ms accumulation time), followed by MS/MS in information-dependent acquisition (IDA) mode on the 5 most intense ions using dynamic background subtraction (175 ms each). Targeted MS/MS analyses were performed when necessary for better spectral quality of metabolites which were not triggered by IDA method. Collision-induced dissociation was performed with 30 ± 10 V collision offset-voltage. Nitrogen was used as collision gas, and collision energy was 30 ± 10 V. MetabolitePilot 2.0 (Sciex) software was employed to screen samples for potential metabolites using a set of known biotransformation reactions, including oxidative reactions, GSH conjugation and methylation, and combinations thereof. PeakView 2.2 and MasterView 1.1 (Sciex) were also used for processing LC-MS/MS data to confirm and expand the list of detected metabolites based on mass accuracies (all within 5 ppm), isotope patterns, and MS/MS analyses.

5.5 Results

5.5.1 LC-MS Method Development and MS/MS Fragmentation of Catechins and Gallate Esters

The metabolism of eight green tea catechins, gallic acid and five analogs of synthetic gallate esters (Figure 5.1) was studied by LC-HRMS/MS using human liver microsomal incubations to form oxidative and methylated metabolites, in addition to glutathione conjugates.

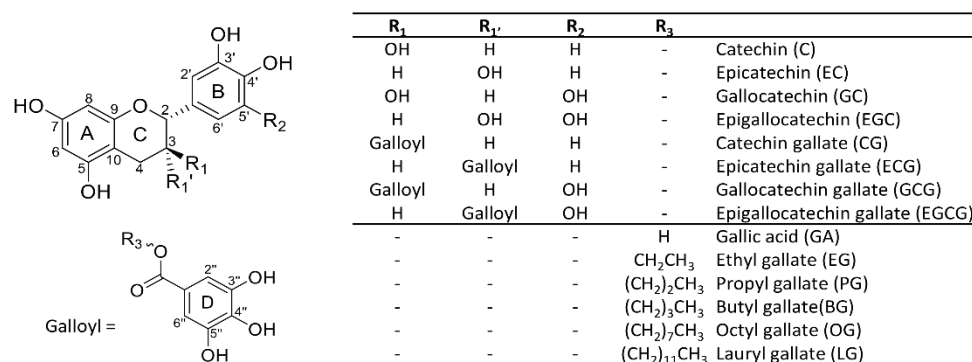


Figure 5.1 Chemical structures of studied natural and synthetic antioxidants.

A robust chromatographic method was developed to separate all studied compounds, a biphenyl column using water and methanol, both containing 0.1% acetic acid as mobile phases. This method allowed for good separation between all catechins, including epimeric species (Figure 5.2a) with increased resolution and shorter run times than reported previously (Rha *et al.*, 2021). The optimized gradient allowed the detection of highly polar gallic acid as well as the most hydrophobic lauryl gallate ester in one method (Figure 5.2b).

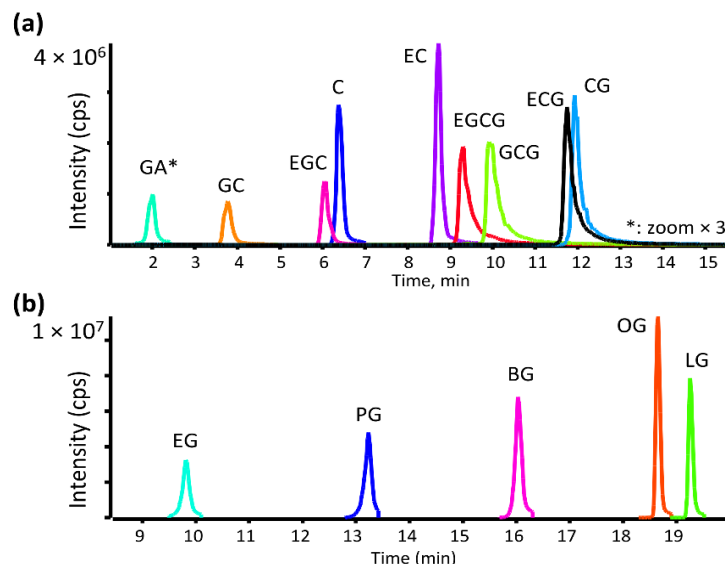


Figure 5.2 Overlaid LC-TOF-MS extracted ion chromatograms of deprotonated molecules from natural (a) and synthetic (b) antioxidants from control HLM incubations. GA peak (*) was increased by 3 \times for clarity.

The MS/MS spectra and fragmentation behavior of green tea catechins, gallic acid, and ethyl gallate are presented in Figure 5.3a–f. For the catechins, epimers indicated very similar fragmentation. Both EGCG and GCG, for example, fragment to form an ion at m/z 331.04, indicating the presence of an unmodified galloyl ester moiety, with a base peak at m/z 169.013, corresponding to deprotonated gallic acid. This product ion is also observed for ECG/CG, however, it is absent in spectra of catechins lacking the gallic acid ester function, such as EC/C and EGC/GC. ECG/CG spectra exhibit a fragment ion at m/z 289.07 corresponding to $[M-H-152]^-$, following cleavage at the ester bond. EC and C exhibit different fragmentation from other catechins, with a base peak at m/z 109.03 corresponding to the $C_6H_5O_2^-$ ion. The ion m/z 125.02 is observed for all catechins, while its intensity varies from 100% for EGC/GC to 20% for EGCG/GCG. It is not affected by the presence of an additional phenolic hydroxyl group, or by the presence of the pyrogalloylated moiety. Similar results were observed by Miketova *et al.* (Miketova *et al.*, 2000) and this ion was proposed as the unmodified A ring (Miketova *et al.*, 2000). Deprotonated gallic acid also forms a predominant peak

at m/z 125.02 upon fragmentation, corresponding to the pyrogallol moiety. All gallate esters fragment similarly, with common peaks at m/z 169.01, 168.01, 125.02, 124.02, and 78.01, corresponding to loss of the side chain, $C_7H_4O_5^-$, pyrogallol moiety, $C_6H_4O_3^-$, and $C_5H_2O^-$, respectively.

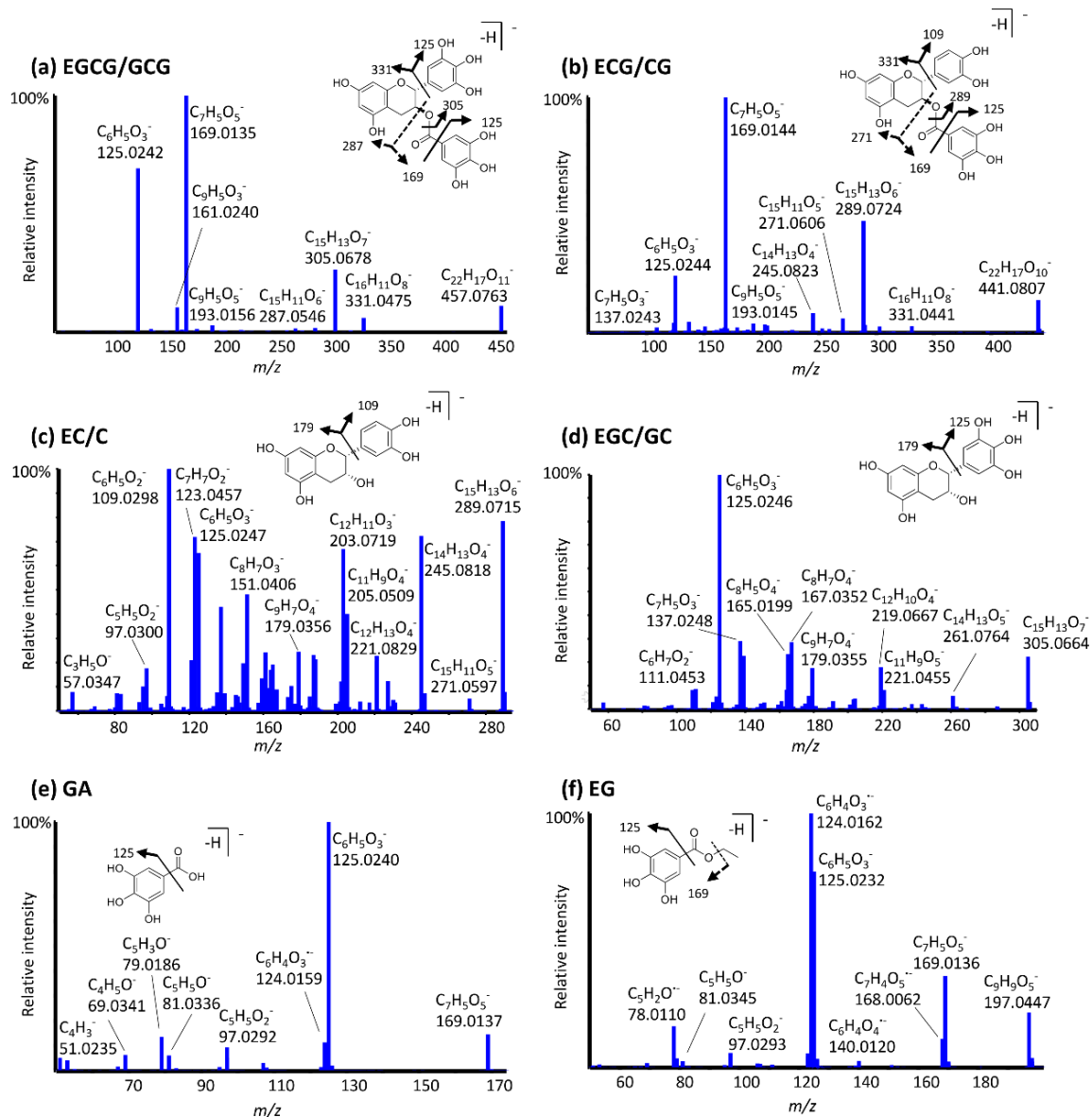


Figure 5.3 High-resolution MS/MS spectra for deprotonated EGCG/GCG (a), ECG/CG (b), EC/C (c), EGC/GC (d), GA (e), and EG (f).

5.5.2 Metabolite Identification

The metabolism of major green tea catechins (C, EC, GC, EGC, CG, ECG, GCG, and EGCG), gallic acid (GA) and synthetic gallate esters (EG, PG, BG, OG, and LG) was studied to elucidate biotransformation reactions. Tables 5.1 and 5.2 summarize the results for all detected metabolites of natural catechin antioxidants and gallic acid esters, respectively. More detailed information of these compounds and their metabolites, including MS/MS fragmentation results, can be found in Supplemental Information Tables 5.3 and 5.4.

Table 5.1 Summary of detected metabolites from studied natural antioxidants.

Biotransformation	Formula	RT (min)	<i>m/z</i> (ppm)	RT (min)	<i>m/z</i> (ppm)
C/EC		C		EC	
Parent	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	6.5	289.0722 (1.5)	8.8	289.0720 (0.8)
+CH ₂	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	10.1	303.0879 (1.6)	11.6	303.0877 (1)
		11.3	303.0878 (1.3)	13.0	303.0876 (0.6)
+2CH ₂	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	13.0	317.1030 (-0.2)	14.1	317.1032 (0.4)
-2H+GSH	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₁₂ S	5.8	594.1403 (0.6)	5.1	594.1400 (0.1)
		6.7	594.1400 (0.1)	8.7	594.1404 (0.8)
+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₁₂ S	7.4	608.1531 (-4.1)	9.0	608.1548 (-1.3)
		8.0	608.1554 (-0.3)	10.1	608.1549 (-1.1)
GC/EGC		GC		EGC	
Parent	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	3.8	305.0673 (2)	6.0	305.0669 (0.7)
+CH ₂	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	6.9	319.0829 (1.8)	9.1	319.0829 (1.8)
		7.8	319.0835 (3.7)	9.8	319.0827 (1.2)
+2CH ₂	C ₁₇ H ₁₈ O ₇	10.9	333.0989 (2.8)	13.2	333.0985 (1.6)
		11.9	333.0979 (-0.2)	11.5	333.0983 (-1.1)
-2H+GSH	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₁₃ S	2.5	610.1346 (-0.4)	4.6	610.1342 (-1)
		3.4	610.1350 (0.3)	5.8	610.1345 (-0.5)
-4H+2GSH	C ₃₅ H ₄₄ N ₆ O ₁₉ S ₂	3.6	457.0982 * (0.7)	5.5	457.0983 * (1)
+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₁₃ S	5.9	624.1509 (0.7)	7.1	624.1501 (-0.6)
		6.9	624.1498 (-1.1)	7.9	624.1503 (-0.3)
CG/ECG		CG		ECG	
Parent	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	11.9	441.0824 (-0.7)	11.7	441.0824 (-0.7)
+CH ₂	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₀	14.1	455.0988 (0.9)	12.7	455.0978 (1.1)
		14.6	455.0983 (-0.2)	13.3	455.0985 (-0.3)
+2CH ₂	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₀	16.4	469.1142 (0.4)	15.7	469.1143 (-0.6)
-2H+GSH	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₆ S	10.4	746.1476 (-4.4)	8.4	746.1514 (0.7)
		11.1	746.1504 (-0.6)	10.1	746.1512 (0.4)
		11.4	746.1491 (-2.4)	11.2	746.1514 (0.7)
-4H+2GSH	C ₄₂ H ₄₈ N ₆ O ₂₂ S ₂	10.7	525.1049* (-1.9)	10.0	525.1061 * (0.4)
+CH ₂ -2H+GSH	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₆ S	11.5	760.1648 (-2.3)	11.3	760.1672 (0.9)
		11.9	760.1633 (-4.2)	11.7	760.1670 (0.6)
GCG/EGCG		GCG		EGCG	
Parent	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	9.9	457.0775 (-0.3)	9.3	457.0772 (-1)
+CH ₂	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁	12.3	471.0937 (0.9)	11.2	471.0929 (-0.8)
		12.7	471.0937 (0.9)	11.8	471.0938 (1.1)
+2CH ₂	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₁	14.2	485.1091 (0.3)	13.5	485.1085 (-0.9)
		14.8	485.1094 (0.9)	14.6	485.1093 (0.7)
-2H+GSH	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₇ S	7.9	762.1434 (-3.1)	7.6	762.1451 (-0.9)
		8.6	762.1432 (-3.4)	8.8	762.1469 (1.5)
-4H+2GSH	C ₄₂ H ₄₈ N ₆ O ₂₃ S ₂	6.6	533.1026* (-1.4)	7.3	533.1033* (-0.1)
+CH ₂ -2H+GSH	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₇ S	9.6	776.1592 (-2.9)	9.5	776.1610 (-0.6)
		10.2	776.1606 (-1.1)	10.2	776.1607 (-1)

Table 5.2 Summary of detected metabolites from gallic acid and gallate ester analogs.

Biotransformation	Formula	RT (min)	m/z (ppm)
GA^a (Parent)	C ₇ H ₆ O ₅	3.5	169.0142 (-0.3)
+CH ₂	C ₈ H ₈ O ₅	7.2	183.0302 (1.6)
		6.5	183.0298 (-0.5)
+2CH ₂	C ₉ H ₁₀ O ₅	11.3	197.0459 (1.8)
-2H+GSH	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₁₁ S	3.1	474.0828 (0.8)
+CH ₂ -2H+GSH	C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₁₁ S	4.2	488.0980 (-0.1)
EG (Parent)	C ₉ H ₁₀ O ₅	9.8	197.0460 (-2.4)
+CH ₂	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	13.2	211.0617 (-2.7)
		14.4	211.0620 (-3.9)
-2H+GSH	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₁₁ S	8.1	502.1133 (0.7)
+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₁₁ S	10.4	516.1296 (-0.6)
		11.5	516.1298 (-1)
PG (Parent)	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	13.2	211.0612 (-0.2)
+CH ₂	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	15.9	225.0770 (-0.9)
		16.9	225.0768 (-0.2)
-2H+GSH	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₁₁ S	10.9	516.1283 (1.9)
+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₁₁ S	12.9	530.1452 (-0.5)
		13.9	530.1441 (1.5)
		14.4	530.1446 (0.7)
-4H+2GSH	C ₃₀ H ₄₂ N ₆ O ₁₇ S ₂	10.1	410.0951 * (-0.1)
BG (Parent)	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	16.0	225.0775 (-3.2)
+CH ₂	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	17.5	239.0928 (-1.6)
		17.8	239.0929 (-1.7)
+O	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	8.4	241.0725 (-3.2)
		8.6	241.0724 (-3)
+O+CH ₂	C ₁₂ H ₁₆ O ₆	11.6	255.0880 (-2.4)
-2H+GSH	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₁₁ S	13.5	530.1436 (2.6)
+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₂ H ₃₁ N ₃ O ₁₁ S	15.2	544.1587 (3.5)
		16.2	544.1590 (3)
-4H+2GSH	C ₃₁ H ₄₄ N ₆ O ₁₇ S ₂	12.2	417.1032 * (-0.6)
OG (Parent)	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	18.6	281.1394 (-0.1)
+CH ₂	C ₁₆ H ₂₄ O ₅	18.8	295.1544 (2.3)
		19.0	295.1544 (2.3)
+O	C ₁₅ H ₂₂ O ₆	17.1	297.1345 (-0.7)
		17.3	297.1340 (1)
+O+CH ₂	C ₁₆ H ₂₄ O ₆	17.8	311.1499 (0.4)
+2O	C ₁₅ H ₂₂ O ₇	14.2	313.1291 (-0.4)
OG aldehyde (+O-2H)	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	17.4	295.1190 (-1)
OG acid (+2O-2H)	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	17.2	311.1139 (-1)
-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₁₁ S	18.1	586.2066 (1.7)
+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₆ H ₃₉ N ₃ O ₁₁ S	18.4	600.2228 (0.7)
+O-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₁₂ S	15.5	602.2018 (1.1)
		15.1	602.2025 (0.4)
+O+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₆ H ₃₉ N ₃ O ₁₂ S	16.9	616.2180 (0.1)
LG (Parent)	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	19.2	337.2017 (1)
+CH ₂	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	19.3	351.2177 (-0.1)
		19.4	351.2172 (1.4)
+O	C ₁₉ H ₃₀ O ₆	18.5	353.1981 (3.5)
		18.7	353.1966 (0.9)
LG aldehyde (+O-2H)	C ₁₉ H ₂₈ O ₆	18.8	351.1811 (0.6)
LG acid (+2O-2H)	C ₁₉ H ₂₈ O ₇	18.6	367.1759 (0.7)
-2H+GSH	C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₁₁ S	18.9	642.2707 (-0.8)
+CH ₂ -2H+GSH	C ₃₀ H ₄₇ N ₃ O ₁₁ S	19.0	656.2857 (-1.4)
+O-2H+GSH	C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₁₂ S	18.2	658.2657 (-0.9)

*: doubly charged ion [M-2H]²⁻; ^a GA incubations were analyzed with a slower gradient

5.5.2.1 Oxidative Metabolites

Of all the tested compounds, only BG, OG, and LG produced hydroxylated metabolites, corresponding to two monohydroxylated isomers each for butyl, octyl, and lauryl gallate, in addition to a di-hydroxy octyl gallate (Table 5.2). All detected oxidative metabolites and parent compounds demonstrated common fragment ions at m/z 169.01, 125.02, and 124.01, from the intact gallic acid, the pyrogallol moiety, and radical ion $C_6H_4O_3^{\bullet-}$, respectively. These results together with the absence of m/z 185 prove that the oxidation is happening in the side chain and not in the gallic acid moiety. Under these conditions, OG and LG is also observed to form aldehyde metabolites. For example, the MS/MS spectrum of OG aldehyde ($-2H+O$) demonstrated a peak at 267.1227, corresponding to the loss of CO from the terminal carbon where the aldehyde is formed. OG and LG aldehydes can be further oxidized to the corresponding carboxylic acids (Figure 5.9). Both acids ($-2H+2O$) exhibit a loss of water and CO_2 upon fragmentation, placing the carboxylic acid on the terminal methyl.

5.5.2.2 Methylated Metabolites

When SAM was added to the incubations as a cofactor, all 14 studied compounds produced two mono-methylated metabolites (Figure 5.4, Tables 5.1 and 5.2). For instance, both EC and C formed two mono-methylated isomers, having four different retention times, indicating four unique structures. In theory, these catechins can be either methylated on the A or B-ring, and their MS/MS fragmentation unfortunately does not allow us to differentiate between these two possibilities (Table 5.4). Conversely, the MS/MS spectra of both MeEGCG isomers (compared in Figure 5.5) allow us to pinpoint when the D ring is methylated. The isomer at 11.8 min has two unique fragment peaks at m/z 305.0676 and 183.0306, corresponding to $C_{15}H_{13}O_7^-$ and $C_8H_7O_5^-$ (methylated gallic acid), respectively, proving that the methyl is added on the D ring. The isomer at 11.2 min exhibits fragments at m/z 319.0818, 169.0142, and 139.0398, from $C_{16}H_{15}O_7^-$, deprotonated gallic acid and methylated pyrogallol, respectively, corresponding to a methylated A or B ring. Lu et al. (Lu *et al.*, 2003)

compared the methylation of EGCG and EGC in humans, mice, and rats, indicating that O-methylation occurs mainly at the 4'-position of the B-ring in EGC and the 4''-position (of the D-ring) in EGCG (Lu *et al.*, 2003). For catechins lacking a D-ring, such as EGC, two methylated isomers and one di-methylated metabolite were detected (Table 5.1). Comparison of their MS/MS fragmentation (Table 5.3) demonstrated that EGC can be methylated in the B-ring (isomer detected with higher intensity) and the A-ring. Meng *et al.* (Meng *et al.*, 2001) identified one O-methylated EGC in human urine and blood samples and elucidated its structure as 4'-O-MeEGC by NMR.

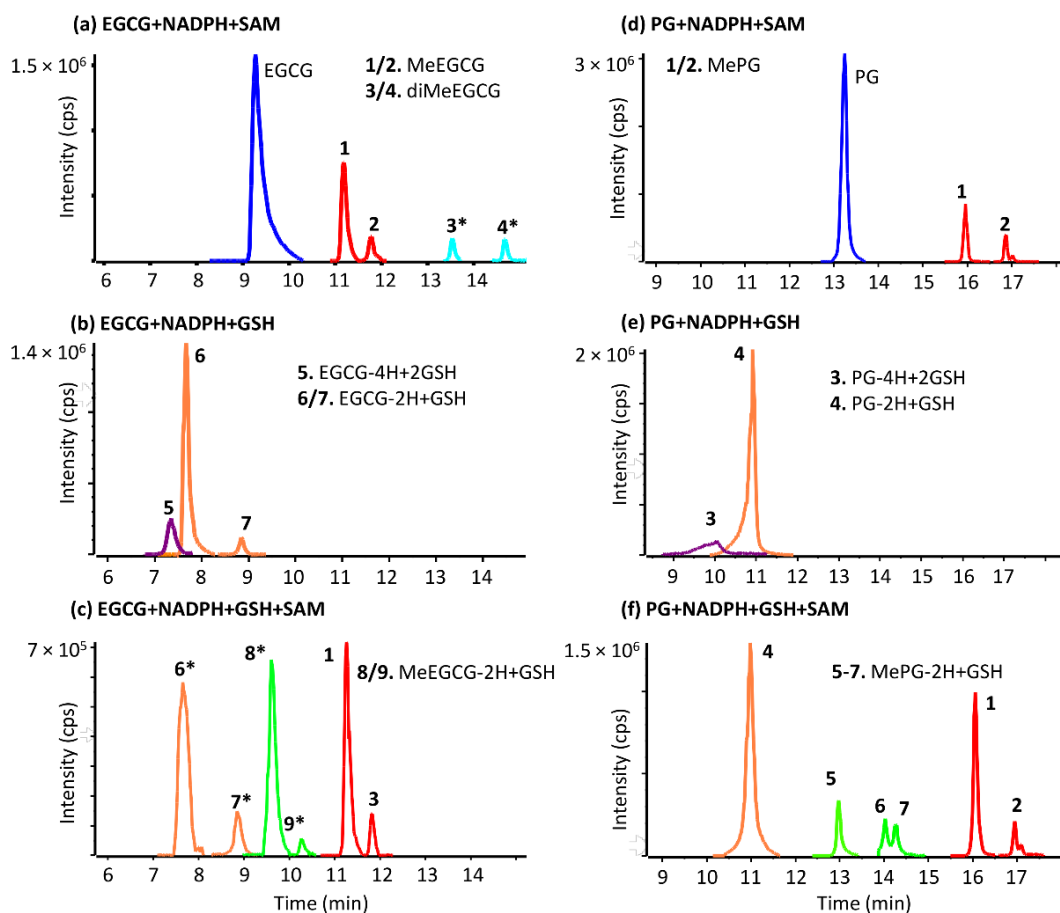


Figure 5.4 Overlaid extracted ion chromatograms of EGCG (a–c) and PG (d–f) metabolites formed in HLM incubations. Peaks with asterisk (*) were increased by 10× for clarity.

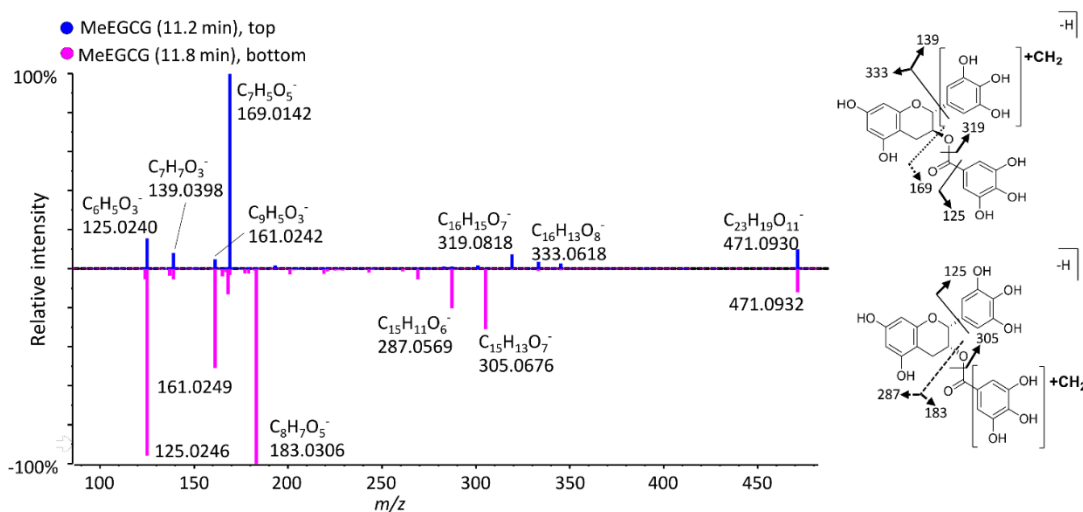


Figure 5.5 Mirror plot of MS/MS spectra for two MeEGCG isomers with proposed structures supported by diagnostic fragment ions.

As a representative example of gallate esters, in Figure 5.4, two well separated mono-methylated metabolites are seen for propyl gallate. Both isomers have identical MS/MS spectra, with ions at m/z 139.004 and 183.030, consistent with the added methyl on the pyrogallol group at two different positions. For gallic acid, one dimethylated metabolite was detected. For BG and OG, an oxidized methylated metabolite ($+O+CH_2$) was also formed. All octyl gallate metabolites characterized in this work are represented in extracted ion chromatograms in Figure 5.9.

5.5.2.3 GSH Adducts

GSH is commonly used as a trapping agent of unstable reactive metabolites, and GSH adducts were detected for all examined compounds (Tables 5.1 and 5.2). When EGCG was investigated, (Figure 5.4) two glutathionylated isomers of EGCG-2H+GSH and a di-GSH adduct were detected. The MS/MS spectra of the two mono-glutathionylated adducts are compared in Figure 5.6. The adduct at 7.6 min forms fragment ions at m/z 169.0142, 592.1232, and 610.1336, corresponding to a gallic acid moiety, $[M-H-170]$ (neutral loss of GA), and the ion $C_{25}H_{28}N_3O_{13}S^-$ (loss of $C_7H_5O_4$), proving that the D-ring remains intact, and that GS binds to the B-ring. However, the

isomer at 8.8 min has unique peaks at m/z 474.0809 and 200.9862, corresponding to GSH binding to the gallic acid moiety and the ion $C_7H_5O_5S^-$ (gallic acid with the sulfur from GSH still attached), respectively, therefore, glutathione binds to the D-ring. Muzolf-Panek et al. (Muzolf-Panek et al., 2008) previously identified 2'-glutathionyl-EGCG and 2',6'-diglutathionyl-EGCG when EGCG was incubated on the presence of GSH and tyrosinase.

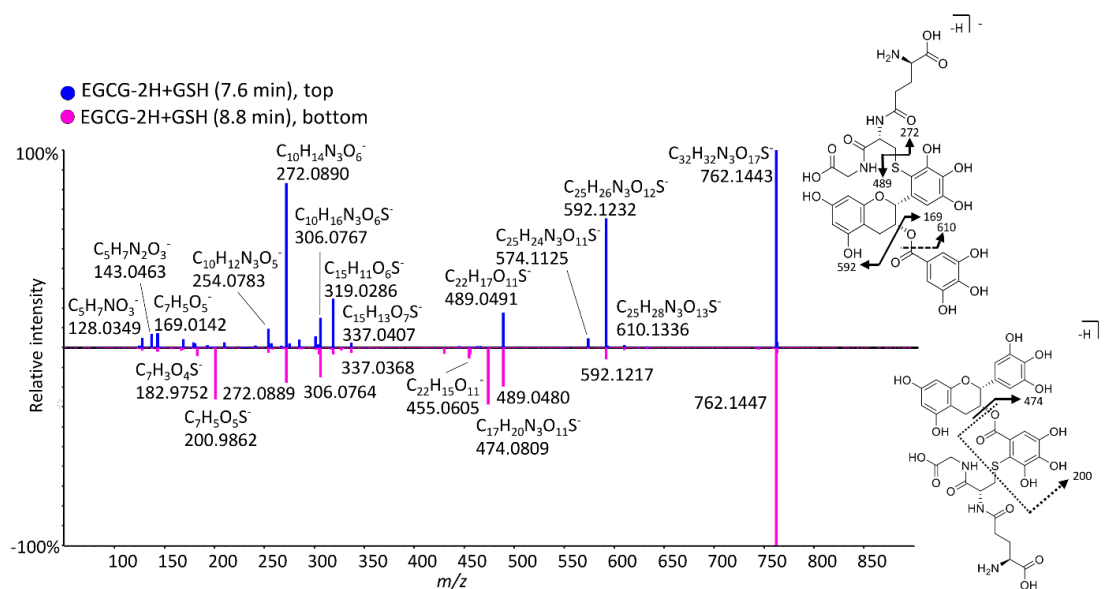


Figure 5.6 Mirror plot of MS/MS spectra for two EGCG-2H+GSH adducts with proposed fragmentation pathways for distinguishing structures.

The studied natural antioxidants containing a pyrogallol and/or a galloyl moiety (GC, EGC, CG, ECG, GCG, and EGCG) all produced at least two mono-GSH adducts in addition to their methylated forms (Table 5.1). All except catechin and epicatechin also produced di-GSH adducts. Oxidation of catechins forming a catechol in the B-ring leads to the formation of a corresponding reactive o-quinone that reacts with the thiol group in GSH (Mori et al., 2010). The galloyl structure (having three hydroxy groups) on the B ring and the presence of the D ring increases the chance for the formation of a double GSH adduct. Two schemes summarizing the biotransformation pathways of catechins and of synthetic gallate are presented in Figures 5.7 and 5.8, respectively.

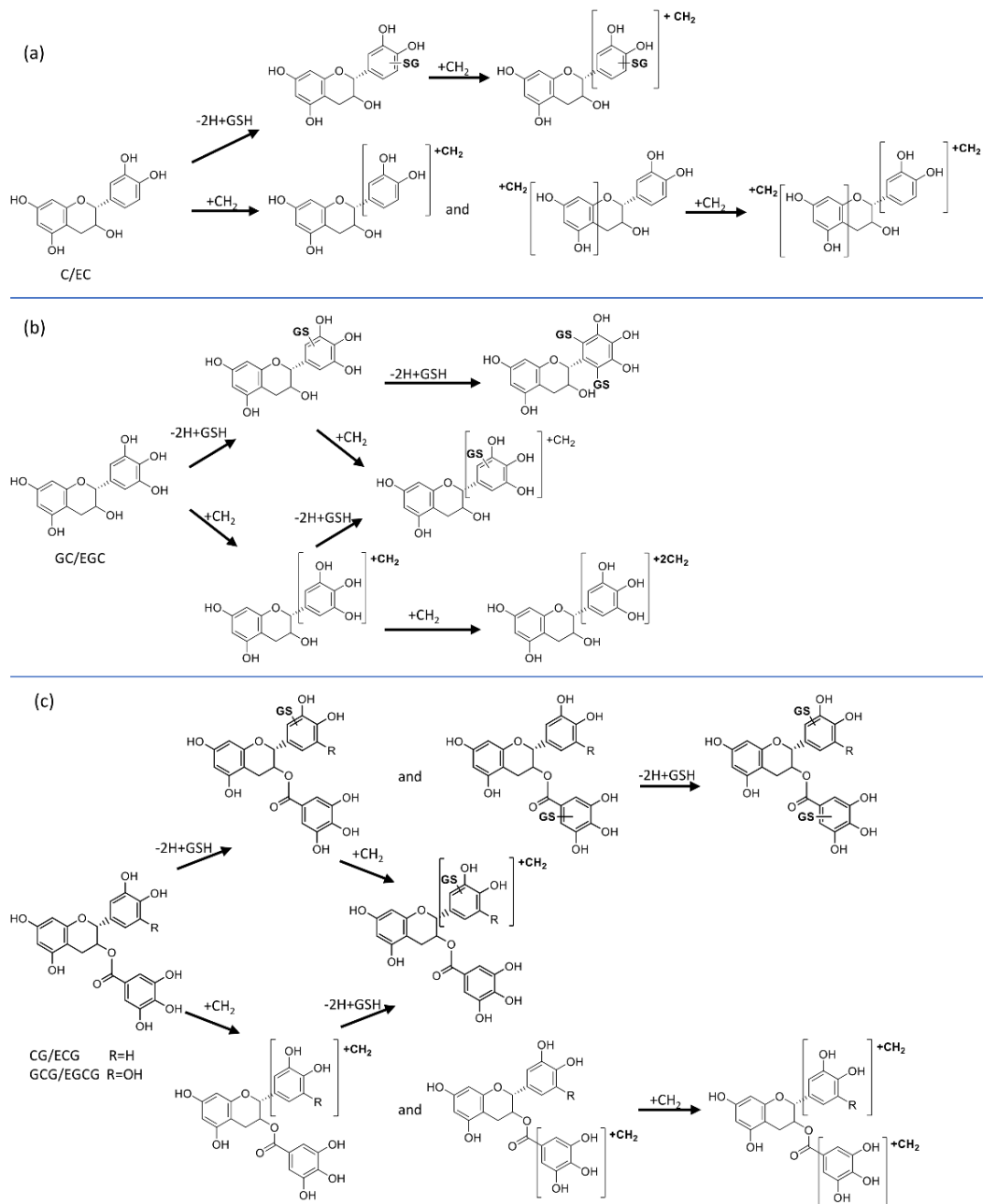


Figure 5.7 Proposed biotransformation pathways of catechins forming GSH adducts and methylated metabolites of (a) C/EC, (b) GC/EGC, and (c) CG/ECG and GCG/EGCG.

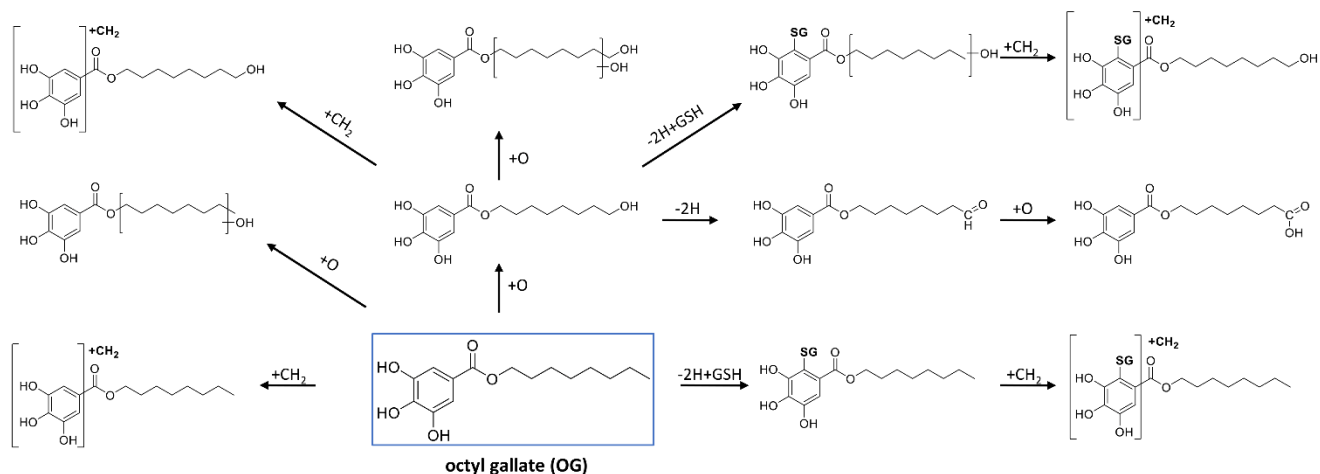


Figure 5.8 Proposed biotransformation pathways for the formation of metabolites and GSH adducts from octyl gallate.

Synthetic gallates also produced several GSH conjugates, including mono-GSH adducts in all cases, di-GSH adducts for PG and BG, and hydroxylated mono-GSH conjugates for OG and LG. For instance, PG produced one GSH adduct and one di-GSH conjugate and three methylated GSH adducts (Figure 5.4e-f). All detected conjugates formed common characteristic negative ion fragments from the GSH moiety (306.07, 272.08, 254.07, 210.08, 143.04, and 128.03) (Table 5.4) (*Xie et al., 2013b*). As a representative example, Figure 5.8 presents the biotransformation pathways of octyl gallate.

5.5.2.4 Methylated GSH Adducts

All studied compounds produced GSH adducts of mono-methylated metabolites. EGCG produced two MeEGCG-2H+GSH isomers (Figure 5.4c). These two metabolites shared the fragment ion at m/z 169.013 (deprotonated gallic acid), demonstrating that GSH conjugation and methylation did not occur in the D-ring. All synthetic gallates produced methylated GSH adducts, with several isomers for many of them (Figure 5.8). PG produced three separated isomers of MePG-2H+GSH (Figure 5.4f). These three isomers had different retention times from BG-2H+GSH, despite the same neutral formula. The presence of three hydroxy groups on the galloyl side of PG

that can be methylated and the binding of GSH could result in three different GSH conjugates methylated at different positions. This proves that methylation also occurs on the ring and not on the side chain. As the acyl chain increases in length, less methylation is seen.

5.6 Discussion

Since green tea is one of the most widely consumed beverages in the world (Velayutham *et al.*, 2008) and tea catechins have important antioxidant and anticancer properties (Basati *et al.*, 2020), it is imperative that we fully understand the potential metabolic pathways involved in the biotransformation of these substances. Once these metabolites are characterized, further studies can examine their individual bioactive properties or toxicological implications. In addition, certain catechins undergo epimerization during storage or thermal degradation, altering their absorption and metabolism (Šilarová *et al.*, 2017), therefore, a robust method is necessary to properly characterize these catechins and their epimers. Some previous studies have described analytical methods for the determination and characterization of green tea catechins and related compounds. Rha *et al.* (Rha *et al.*, 2021) developed a HPLC–UV–MS method to separate 19 phenolic compounds, including the eight catechins studied here. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled with quadrupole-time-of-flight was used to characterize flavan-3-ols (C, EC, GC, EGC, etc) and proanthocyanidins (Šilarová *et al.*, 2017), and LC–MS have also been employed in previous studies to monitor the stability of catechins compounds (Secretan *et al.*, 2021); however, previous high-resolution MS/MS analyses are limited (Li *et al.*, 2021).

5.6.1 Metabolism of Green Tea Catechins

EGCG is the most bioactive compound known in green tea, responsible for 32% of its antioxidant potential, while other catechins comprise only 5–12% (Moore *et al.*, 2009). This makes EGCG the most-studied green tea catechin. However, its analogs also have demonstrated important biological effects and sometimes greater stability,

hence the necessity of describing their metabolism to better understand their impact in the human body and the effect of the structural differences on their biotransformation.

Under *in vitro* oxidative conditions, EGCG, its analogs and GA did not form any hydroxylated metabolites. This could be explained by their highly hydroxylated structures and the fact that they have been proven to inhibit NADPH oxidase activation by reducing $O_2^{\bullet-}$ production and thus protecting against peroxynitrite formation from NO (Moore *et al.*, 2009; Nishikawa *et al.*, 2007).

When SAM was added to the incubation mixture, all catechins and GA formed mono-methylated and di-methylated metabolites (Figure 5.4 and Table 5.1). Methylation is a major biotransformation pathway for catechins (Lu *et al.*, 2003; OKusHio *et al.*, 1999b), and has been described previously from *in vitro* and in animal studies (Wang *et al.*, 2010) with the formation of 4'-O-methyl-EGC, 4'-O-methyl-EGCG, and 4''-O-methyl-EC being previously reported (OKusHio *et al.*, 1999b).

Although methylation is the primary metabolic pathway of these natural antioxidants, there are contradictory opinions in the literature about the role of methylation; with some considering that methylation can decrease the bioactivities, while others stating methylation improves the effectiveness of green tea catechins. For instance, Steffen *et al.* (Steffen *et al.*, 2008) indicated that methylation of EC at the 3' or 4' positions suppresses the superoxide ($O_2^{\bullet-}$) scavenging ability of the parent compound. Conversely, the major methylated tea catechins in oolong tea (MeEGCG and MeECG) demonstrated increased anti-adipogenic activity compared to EGCG and ECG (Yang *et al.*, 2015). Also, the Japanese green tea (*Camellia sinensis L.*) cultivar "Benifuuki," naturally rich with 3''-MeEGCG and 3''-MeECG, exhibits anti-allergic effects (Maeda-Yamamoto *et al.*, 2012; Maeda-Yamamoto *et al.*, 2011). Maeda-Yamamoto *et al.* (Maeda-Yamamoto *et al.*, 2012) demonstrated a higher potential of methylated catechins to inhibit histamine release than the non-methylated analogs. Given this contradiction in the literature, the effect of methylation of these molecules necessitates further study.

In the presence of NADPH and GSH, reactive quinone forms of catechins can react with glutathione. Sang et al. (Sang *et al.*, 2005) found that EGCG can also be oxidized by peroxidase and hydrogen peroxide and then react with cysteine or glutathione, however, studies involving the formation GSH adducts of green tea catechins are still limited. The formation of such adducts scavenges potentially toxic reactive metabolites and reduces their potential for binding to cellular macromolecules (Chelcheleh et Allameh, 1995; Wang *et al.*, 2021b). From the results presented here, GSH was proven to bind on EGCG and its analogs in the B-ring or D-rings (Figure 5.6). Until now, it has been difficult to understand whether the broad bioactivities of green tea catechins are due to its antioxidant activity or to its interactions with specific molecular targets (Negri *et al.*, 2018; Patra *et al.*, 2008).

When both SAM and GSH were added to incubations, methylated mono GSH adducts were formed (Table 5.1). The ability of tea catechins to oxidize is negated by COMT-mediated methylation due to masking of the catechol moiety, however, conjugation of quinones with GSH does not eliminate their reactivity to COMT (Butterworth *et al.*, 1996). This also explains why di-methylated metabolites are no longer detected under these conditions. The competition between *O*-methylation and oxidation coupled to GSH conjugation of green tea catechins may have important implications *in vivo*; therefore, characterizing these novel metabolites is significant.

5.6.2 Metabolism of Alkyl Gallates

GA and analogs are used as potent antioxidants in various applications; however, their metabolism has not been extensively studied until now. It has been reported that with increased hydrophobicity comes significant increased cytotoxicity, but also improved antioxidant activity (Wolf *et al.*, 2017). The more hydrophobic gallate esters (BG, OG, and LG) formed oxidative metabolites, unlike EG and PG (Table 5.2) with the oxidation occurring in the alkyl side chain. This could be explained by the specificity of microsomal cytochrome P450 enzymes, which is controlled by the lipophilicity of the substrate (Ortiz de Montellano, 2010). OG and LG can further

oxidize to the corresponding aldehyde and carboxylic acids, a common reaction in the biotransformation of xenobiotics catalyzed by cytochromes P450 (Goossen *et al.*, 2008). Methylation of gallate esters occurs on the hydroxy groups of galloyl moiety catalyzed by COMT (Nes *et al.*, 2003; Sadler *et al.*, 2017)

All studied synthetic gallate esters formed several GSH adducts, in addition to different combinations of oxidation and methylation. Like catechins, synthetic gallates also produced methylated GSH adducts. Additionally, OG and LG produced hydroxylated GSH adducts (+O-2H+GSH). Di-glutathione adducts were also observed for PG and BG.

5.7 Conclusions

By studying the human *in vitro* metabolism of eight naturally occurring catechins, five synthetic gallate esters, and gallic acid, this study was able to compare the effect of subtle structural differences on metabolism. A single chromatographic method was developed for the analysis of all parent compounds and their numerous biotransformation products, with high-resolution tandem mass spectrometry enabling accurate mass measurements for elucidating their structures (Tables 5.3 and 5.4). The only exception was that for gallic acid metabolites, a slower gradient was used to enable retention of highly polar species. HRMS/MS was used to differentiate between many isomeric structures. Several new metabolites have been described for the first time in this report, particularly those of synthetic gallates. The formation of glutathione conjugates of methylated metabolites of green tea catechins and synthetic galloylated compounds is a novel biotransformation pathway not previously described for these molecules. A total of 116 metabolites were characterized in this work, while pinpointing which moieties are susceptible to oxidation, methylation, and glutathione conjugation (Figures 5.7 and 5.8). The compilation of these results serves to increase our knowledge of different metabolic pathways potentially implicated *in vivo* when

studying the effect of these compounds separately and in combination. Of course, the biological relevance of these metabolites should be further studied *in vivo*.

5.8 Supplemental data

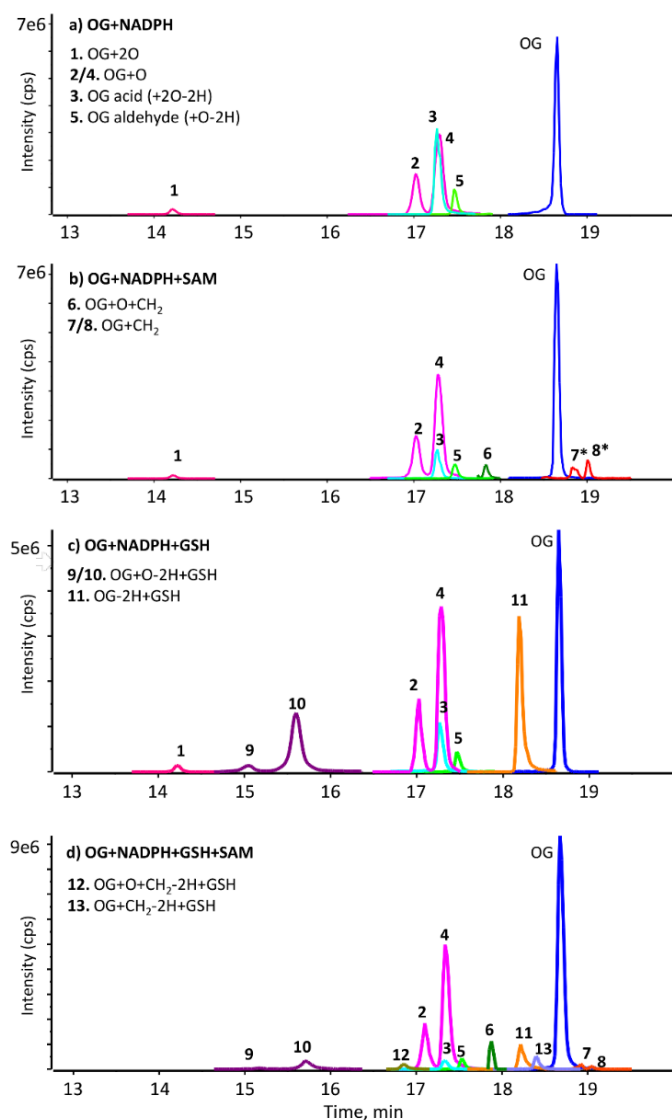


Figure 5.9 Overlaid extracted ion chromatograms of OG metabolites formed in HLM incubations. Peaks with asterisk (*) were increased by 10× for clarity.

Table 5.3 Summary of LC-HRMS/MS data of detected metabolites from studied natural antioxidants

Biotransformation	Formula	RT (min)	Measured m/z [M-H] ⁻ (ppm)	Selected MS/MS fragments
GA (Parent) +CH ₂	C ₇ H ₆ O ₅	3.5	169.0142 (-0.3)	125.0237 , 124.0163 , 107.0131, 97.0286, 81.0338, 79.0185 , 69.0341, 51.0235
	C ₈ H ₈ O ₅	7.2	183.0302 (1.6)	168.0058 , 139.0389, 124.0156 , 123.0081 , 95.0131
	C ₈ H ₈ O ₅	6.5	183.0298 (-0.5)	168.0057 , 139.0374, 124.0156 , 123.0079 , 95.0130
	C ₉ H ₁₀ O ₅	11.3	197.0459 (1.8)	182.0220 , 166.9983, 153.0558 , 138.0331 , 123.0088 , 95.0135, 79.0179, 51.0239
-2H+GSH	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₁₁ S	3.1	474.0828 (0.8)	430.0899, 306.0769, 272.0890 , 200.9861 , 182.9746 , 166.9987, 123.0077
	C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₁₁ S	4.2	488.0980 (-0.1)	272.0867 , 215.0024, 199.9783, 155.9885, 111.0198
C (Parent)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	6.5	289.0722 (1.5)	245.0820 , 221.0828 , 205.0503 , 203.0712 , 188.0475, 187.0401 , 179.0347 , 165.0191, 161.0600, 151.0397 , 149.0243, 137.0242 , 125.0239 , 123.0447 , 121.0291, 109.0287
	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	10.1	303.0879 (1.6)	285.0774 , 270.0542 , 259.0979, 244.0746 , 235.0982, 220.0748, 219.0666, 202.0641, 165.0556, 151.0404 , 137.0248 , 125.0245, 122.0376 , 109.0297, 97.0297
	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	11.3	303.0878 (1.3)	270.0537, 244.0745 , 220.0741, 202.0636, 165.0563 , 150.0317 , 151.0402 , 137.0249 , 125.0241, 122.0376 , 109.0299
	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	13.0	317.1030 (-0.2)	299.0919 , 273.1113, 258.0893 , 234.0905 , 219.0669, 179.0357 , 165.0569 , 151.0396 , 123.0462 , 122.0380 , 111.0450 , 97.0294
-2H+GSH	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₁₂ S	5.8	594.1403 (0.6)	456.1082, 321.0440 , 303.0337, 277.0535 , 272.0889, 254.0802, 210.0886, 183.0125, 167.0362, 137.0232, 128.0353
	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₁₂ S	6.7	594.1400 (0.1)	456.1081, 414.0055, 321.0441 , 272.0895 , 254.0795 , 210.0895, 179.0464, 143.0471 , 128.0364
+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₁₂ S	7.4	608.1531 (-4.1)	306.0764 , 301.0722, 288.0668, 272.0890 , 254.0812, 210.0885, 177.0358, 160.0072, 143.0464, 128.0352
	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₁₂ S	8.0	608.1554 (-0.3)	306.0763 , 301.0720, 288.0664, 272.0883 , 254.0786, 210.0897, 177.0335, 160.0072, 143.0459, 128.0353
EC (Parent)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	8.8	289.0720 (0.8)	245.0807 , 221.0815 , 205.0499 , 203.0706 , 188.0472, 187.0399 , 179.0342 , 165.0187, 161.0596, 151.0394 , 149.0239, 137.0239 , 125.0236 , 123.0445 , 121.0291, 109.0285
	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	11.6	303.0877 (1.0)	285.0774 , 270.0542 , 259.0979, 244.0746 , 235.0982, 220.0748, 219.0666, 202.0641, 165.0556, 151.0404 , 137.0248 , 125.0245, 122.0376 , 109.0297, 97.0297
	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	13.0	303.0876 (0.6)	270.0524, 244.0731 , 220.0735, 202.0625, 165.0545 , 150.0320 , 151.0391, 138.0307, 137.0240 , 125.0240 , 122.0376 , 109.0299, 83.0140
	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	14.1	317.1032 (0.4)	299.0921 , 284.0713, 273.1138, 258.0890, 234.9763 , 219.0673, 179.0356 , 175.9624, 165.0544, 152.0471, 151.0398, 123.0451 , 122.0366 , 111.0454
-2H+GSH	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₁₂ S	5.1	594.1400 (0.1)	398.0152, 321.0445 , 303.0334, 277.0561 , 272.0895, 254.0784, 210.0908, 183.0132, 143.0469, 125.0270
	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₁₂ S	8.7	594.1404 (0.8)	456.1086, 321.0442 , 272.0891 , 254.0790, 143.0464, 128.0357
+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₁₂ S	9.0	608.1548 (-1.3)	306.0750 , 301.0708, 288.0640, 272.0877 , 254.0762, 210.0873, 177.0326, 160.0051, 143.0444, 128.0346
	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₁₂ S	10.1	608.1549 (-1.1)	306.0753 , 301.0709, 288.0656, 272.0878 , 160.0070, 143.0463, 128.0344

Table 5.3 Summary of LC-HRMS/MS data of detected metabolites from studied natural antioxidants (continued)

Biotransformation	Formula	RT (min)	Measured m/z [M-H] ⁻ (ppm)	Selected MS/MS fragments
GCG (Parent)	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	9.9	457.0775 (-0.3)	331.0465, 305.0670, 287.0560, 269.0467, 219.0662, 193.0662, 169.0144 , 161.0246, 137.0244, 125.0244
+CH ₂	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁	12.3	471.0937 (0.9)	333.0625, 287.0568 , 269.0461, 243.0668, 183.0307 , 169.0147, 137.0249, 125.0246
	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁	12.7	471.0937 (0.9)	319.0828 , 305.0671 , 287.0568 , 269.0459, 183.0300 , 169.0143 , 161.0245 , 137.0245, 125.0243 , 124.0166
+2CH ₂	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₁	14.2	485.1091 (0.3)	301.0724 , 283.0619 , 268.0384 , 257.0817, 242.0481 , 215.0715 , 213.0559, 183.0311 , 168.0067 , 139.0396, 125.0246 , 124.0168
	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₁	14.8	485.1094 (0.9)	441.1175, 305.0669 , 301.0719 , 290.0451, 269.0457 , 251.0349 , 225.0559 , 183.0301, 168.0065, 137.0242, 125.0244, 124.0170
-2H+GSH	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₇ S	7.9	762.1434 (-3.1)	592.1192 , 574.1104 , 489.0456 , 337.0377, 319.0256 , 306.0742 , 272.0865 , 254.0765 , 210.0874, 179.0456, 169.0130 , 143.0458 , 128.0348
	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₇ S	8.6	762.1432 (-3.4)	489.0475 , 474.0795 , 455.0604 , 430.0906, 306.0756 , 272.0879 , 200.9858 , 182.9756
-4H+2GSH	C ₄₂ H ₄₈ N ₆ O ₂₃ S ₂	6.6	533.1026* (-1.4)	794.1126, 624.0934, 590.1053, 533.0994 , 498.0617, 350.9976, 317.0115 , 306.0753 , 272.0876, 254.0771 , 210.0874, 179.0451, 169.0132 , 143.0455 , 125.0238 , 128.0346
+CH ₂ -2H+GSH	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₇ S	9.6	776.1592 (-2.9)	471.0802 , 470.0784 , 469.0735 , 319.0708 , 318.0696 , 317.0656 , 308.0721 , 307.0782 , 306.0747 , 299.0540, 273.0769, 272.0871, 231.0656, 167.0345, 143.0451, 137.0240 , 128.0342, 125.0225
	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₇ S	10.2	776.1606 (-1.1)	471.0803 , 306.0774 , 301.0725 , 272.0893, 254.0768, 143.0457
EGCG (Parent)	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	9.3	457.0772 (-1)	331.0453, 305.0666 , 287.0555, 269.0461, 193.0142, 179.0352, 169.0137 , 165.0188, 125.0241
+CH ₂	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁	11.2	471.0929 (-0.8)	333.0618, 319.0818, 169.0142 , 161.0242, 139.0398, 125.0240
	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁	11.8	471.0938 (1.1)	305.0676 , 287.0569 , 183.0306 , 161.0249 , 125.0246
+2CH ₂	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₁	13.5	485.1085 (-0.9)	441.1190 , 305.0661 , 301.0712 , 283.0600 , 269.0454 , 251.0380 , 217.0025 , 183.0302 , 168.0059 , 141.0171 , 137.0249 , 125.0241
	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₁	14.6	485.1093 (0.7)	441.1176, 305.0670 , 301.0719 , 269.0456 , 251.0349 , 183.0301, 168.0065, 137.0242, 125.0244, 124.0170
-2H+GSH	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₇ S	7.6	762.1451 (-0.9)	610.1336, 592.1232 , 574.1125, 489.0491 , 337.0407, 319.0286 , 306.0767, 272.0890 , 254.0783, 169.0142, 143.0463, 128.0349
	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₇ S	8.8	762.1469 (1.5)	592.1217, 489.0480 , 474.0809 , 455.0605, 337.0368, 306.0764, 272.0889, 200.9862 , 182.9752
-4H+2GSH	C ₄₂ H ₄₈ N ₆ O ₂₃ S ₂	7.3	533.1033* (-0.1)	897.1959, 794.1186, 624.0964 , 533.1035 , 317.0130, 306.0770, 272.0891 , 254.0789 , 210.0886, 179.0466, 169.0145 , 143.0460, 128.0354 , 125.0242
+CH ₂ -2H+GSH	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₇ S	9.5	776.1610 (-0.6)	469.0777 , 317.0662 , 306.0763 , 299.0558, 272.0882, 231.0651, 169.0137
	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₇ S	10.2	776.1607 (-1)	469.0766 , 317.0666 , 306.0767 , 299.0559 , 272.0881, 231.0653, 169.0135

Table 5.3 Summary of LC-HRMS/MS data of detected metabolites from studied natural antioxidants (continued)

Biotransformation	Formula	RT (min)	Measured m/z [M-H] ⁻ (ppm)	Selected MS/MS fragments
CG (Parent)	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	11.9	441.0824 (-0.7)	331.0454, 303.0508, 289.0712 , 271.0611, 245.0816, 205.0506, 203.0719, 193.0147 , 169.0143 , 137.0249, 125.0244, 124.0170
+CH ₂	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₀	14.1	455.0988 (0.9)	411.1077, 317.0667, 305.0670 , 290.0439, 271.0611, 253.0512 , 227.0716, 183.0305 , 168.0070 , 159.0455, 145.0298 , 137.0246 , 125.0245
	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₀	14.6	455.0983 (-0.2)	303.0876 , 285.0773, 270.0537, 183.0302 , 169.0145 , 137.0246, 125.0244 , 124.0163
+2CH ₂	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₀	16.4	469.1142 (0.4)	305.0675 , 303.0869 , 285.0774 , 270.0533, 246.0536, 241.0869 , 226.035, 183.0297 , 165.0198, 149.0245, 137.0245, 124.0157
-2H+GSH	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₆ S	10.4	746.1476 (-4.4)	576.1255 , 473.0506 , 321.0426 , 303.0320 , 272.0877 , 254.0774, 169.0140 , 143.0458
	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₆ S	11.1	746.1504 (-0.6)	617.1034, 608.1144, 594.1350, 473.0500 , 335.0216, 321.0426 , 303.0329, 272.0876 , 254.0776, 169.0138 , 143.0457, 125.0243
	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₆ S	11.4	746.1491 (-2.4)	474.0791 , 473.0500 , 439.0642 , 306.0747 , 272.0875 , 254.0778, 200.9853 , 182.9754 , 143.0463
-4H+2GSH	C ₄₂ H ₄₈ N ₆ O ₂₂ S ₂	10.7	525.1049* (-1.9)	779.1352 , 778.1167 , 744.0863, 525.1016 , 505.0230 , 471.0357, 472.0620, 306.0751 , 289.0700 , 272.0876 , 254.0765 , 210.0872, 179.0452 , 143.0459 , 128.0349 , 125.0240
+CH ₂ -2H+GSH	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₆ S	11.5	760.1648 (-2.3)	453.0806 , 306.0760 , 301.0711 , 254.0778, 143.0465, 128.0352
	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₆ S	11.9	760.1633 (-4.2)	453.0802 , 306.0753 , 301.0706 , 272.0876, 254.0768, 215.0706, 143.0462
ECG (Parent)	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	11.7	441.0824 (-0.7)	331.0441, 303.0514, 289.0724 , 271.0606, 245.0823, 205.0509, 203.0716, 193.0145, 169.0144 , 137.0243, 125.0244, 124.0168
+CH ₂	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₀	12.7	455.0978 (1.1)	217.0663, 305.0661 , 271.0605 , 253.0504 , 227.0715, 183.0298 , 145.0293 , 137.0241 , 125.0239 , 124.0166
	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₀	13.3	455.0985 (-0.6)	305.0658, 289.0714 , 271.0612, 245.0816, 203.0714, 183.0298 , 168.0064, 125.0239
+2CH ₂	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₀	15.7	469.1143 (-0.3)	305.0669 , 303.0889 , 289.0735 , 285.0765 , 270.0544 , 246.0526, 241.0894, 183.0297 , 168.0064, 149.0236, 137.0241
-2H+GSH	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₆ S	8.4	746.1514 (0.7)	576.1310, 473.0547 , 321.0444 , 303.0337 , 272.0892 , 254.0785, 169.0143 , 143.0459
	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₆ S	10.1	746.1512 (0.4)	594.1399, 473.0532 , 321.0438, 272.0887 , 169.0143
	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₆ S	11.2	746.1514 (0.7)	474.0806 , 473.0543 , 439.0679, 306.0773 , 289.0726, 272.0894 , 200.9866 , 182.9764
-4H+2GSH	C ₄₂ H ₄₈ N ₆ O ₂₂ S ₂	10.0	525.1061*(0.4)	525.1081 , 506.0516 , 505.0263 , 488.0462, 471.0403, 462.0665, 306.0770 , 289.0731 , 272.0897 , 254.0781 , 232.9588, 214.9481 , 210.0893, 179.0461 , 143.0466 , 128.0356 , 125.0251
+CH ₂ -2H+GSH	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₆ S	11.3	760.1672 (0.9)	453.0819 , 306.0773 , 301.0730 , 272.0888, 254.0781, 143.0462
	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₆ S	11.7	760.1670 (0.6)	453.0829 , 306.0773 , 301.0725 , 272.0894, 254.0769, 143.0458

Table 5.3 Summary of LC-HRMS/MS data of detected metabolites from studied natural antioxidants (continued)

Biotransformation	Formula	RT (min)	Measured m/z [M-H] ⁻ (ppm)	Selected MS/MS fragments
GCG (Parent)	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	9.9	457.0775 (-0.3)	331.0465, 305.0670, 287.0560, 269.0467, 219.0662, 193.0662, <u>169.0144</u> , 161.0246, 137.0244, 125.0244
+CH ₂	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁	12.3	471.0937 (0.9)	333.0625, 287.0568 , 269.0461, 243.0668, 183.0307 , 169.0147, 137.0249, 125.0246
	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁	12.7	471.0937 (0.9)	319.0828 , 305.0671 , 287.0568 , 269.0459, 183.0300 , 169.0143 , 161.0245 , 137.0245, 125.0243 , 124.0166
+2CH ₂	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₁	14.2	485.1091 (0.3)	301.0724 , 283.0619 , 268.0384 , 257.0817, 242.0481 , 215.0715 , 213.0559, 183.0311 , 168.0067 , 139.0396, 125.0246 , 124.0168
	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₁	14.8	485.1094 (0.9)	441.1175, 305.0669 , 301.0719 , 290.0451, 269.0457 , 251.0349 , 225.0559 , 183.0301, 168.0065, 137.0242, 125.0244, 124.0170
-2H+GSH	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₇ S	7.9	762.1434 (-3.1)	592.1192 , 574.1104 , 489.0456 , 337.0377, 319.0256 , 306.0742 , 272.0865 , 254.0765 , 210.0874, 179.0456, 169.0130 , 143.0458 , 128.0348
	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₇ S	8.6	762.1432 (-3.4)	489.0475 , 474.0795 , 455.0604 , 430.0906, 306.0756 , 272.0879 , 200.9858 , 182.9756
-4H+2GSH	C ₄₂ H ₄₈ N ₆ O ₂₃ S ₂	6.6	533.1026* (-1.4)	794.1126, 624.0934, 590.1053, 533.0994 , 498.0617, 350.9976, 317.0115 , 306.0753 , 272.0876, 254.0771 , 210.0874, 179.0451, 169.0132 , 143.0455 , 125.0238 , 128.0346
+CH ₂ -2H+GSH	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₇ S	9.6	776.1592 (-2.9)	471.0802 , 470.0784 , 469.0735 , 319.0708 , 318.0696 , 317.0656 , 308.0721 , 307.0782 , 306.0747 , 299.0540, 273.0769, 272.0871, 231.0656, 167.0345, 143.0451, 137.0240 , 128.0342, 125.0225
	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₇ S	10.2	776.1606 (-1.1)	471.0803 , 306.0774 , 301.0725 , 272.0893, 254.0768, 143.0457
EGCG (Parent)	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	9.3	457.0772 (-1)	331.0453, 305.0666 , 287.0555, 269.0461, 193.0142, 179.0352, 169.0137 , 165.0188, 125.0241
+CH ₂	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁	11.2	471.0929 (-0.8)	333.0618, 319.0818, 169.0142 , 161.0242, 139.0398, 125.0240
	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁	11.8	471.0938 (1.1)	305.0676 , 287.0569 , 183.0306 , 161.0249 , 125.0246
+2CH ₂	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₁	13.5	485.1085 (-0.9)	441.1190 , 305.0661 , 301.0712 , 283.0600 , 269.0454 , 251.0380 , 217.0025 , 183.0302 , 168.0059 , 141.0171 , 137.0249 , 125.0241
	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₁	14.6	485.1093 (0.7)	441.1176, 305.0670 , 301.0719 , 269.0456 , 251.0349 , 183.0301, 168.0065, 137.0242, 125.0244, 124.0170
-2H+GSH	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₇ S	7.6	762.1451 (-0.9)	610.1336, 592.1232 , 574.1125, 489.0491 , 337.0407, 319.0286 , 306.0767, 272.0890 , 254.0783, 169.0142, 143.0463, 128.0349
	C ₃₂ H ₃₃ N ₃ O ₁₇ S	8.8	762.1469 (1.5)	592.1217, 489.0480 , 474.0809 , 455.0605, 337.0368, 306.0764, 272.0889, 200.9862 , 182.9752
-4H+2GSH	C ₄₂ H ₄₈ N ₆ O ₂₃ S ₂	7.3	533.1033* (-0.1)	897.1959, 794.1186, 624.0964 , 533.1035 , 317.0130, 306.0770, 272.0891 , 254.0789 , 210.0886, 179.0466, 169.0145 , 143.0460, 128.0354 , 125.0242
+CH ₂ -2H+GSH	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₇ S	9.5	776.1610 (-0.6)	469.0777 , 317.0662 , 306.0763 , 299.0558, 272.0882, 231.0651, 169.0137
	C ₃₃ H ₃₅ N ₃ O ₁₇ S	10.2	776.1607 (-1)	469.0766 , 317.0666 , 306.0767 , 299.0559 , 272.0881, 231.0653, 169.0135

*: doubly charged ions [M-2H]²⁻; Fragment ions with >20% relative intensity compared to base peak are listed in bold, base peaks are underlined. GA incubations were injected with a slower gradient.

Table 5.4 Summary of LC-HRMS/MS data of ester gallates analogs metabolites

Biotransformation	Formula	RT (min)	Measured m/z [M-H] ⁻ (ppm)	Selected MS/MS fragments
EG (Parent) +CH ₂	C ₉ H ₁₀ O ₅	9.8	197.0460 (-2.4)	169.0136, 168.0061, 125.0231, 124.0161, 78.011
	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	13.2	211.0617 (-2.7)	197.0421, 196.0377 , 168.0047, 166.9987 , 139.0038, 124.0149, 123.0087, 95.0137, 79.0188
	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	14.4	211.0620 (-3.9)	197.0410, 196.0376 , 168.0056, 183.0294, 166.9986 , 139.0040, 124.0144, 123.0088
-2H+GSH +CH ₂ -2H+GSH	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₁₁ S	8.1	502.1133 (0.7)	306.0769, 272.0882, 254.0782, 229.0178, 210.0883, 182.9761 , 179.0458, 143.0467, 128.0354
	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₁₁ S	10.4	516.1296 (-0.6)	272.0880 , 254.0787, 243.0328 , 228.0096, 210.0883, 179.0467, 143.0460, 128.0349
	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₁₁ S	11.5	516.1298 (-1)	306.0751, 272.0889 , 254.0782, 243.0348, 228.0106 , 210.0889, 196.9921, 179.0465, 143.0459, 128.0349
PG (Parent) +CH ₂	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	13.2	211.0612 (-0.2)	169.0139 , 168.0061, 125.0230, 124.0159 , 78.0109
	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	15.9	225.0770 (-0.9)	211.0577 , 210.0536, 168.0048, 166.9991 , 139.0037, 124.0226, 123.0088, 95.0139, 79.0190
	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	16.9	225.0768 (-0.2)	211.0585 , 210.0544, 183.0300, 168.0057, 166.9995 , 139.0043, 124.0142, 123.0093, 95.0139, 79.0193
-2H+GSH -4H+2GSH	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₁₁ S	10.9	516.1283 (1.9)	306.0765, 272.0888, 254.0778, 243.0328 , 210.0880, 182.9756 , 179.0460, 143.0461, 128.0348
	C ₃₀ H ₄₂ N ₆ O ₁₇ S ₂	10.1	410.0951* (-0.1)	548.1019, 410.0965, 350.0382 , 328.0613, 304.0594, 272.0890 , 254.0778 , 241.0171, 214.9478, 210.0876 , 209.0441, 179.0456, 143.0457, 128.0350
	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₁₁ S	12.9	530.1452 (-0.5)	306.0795, 273.0912, 272.0886, 257.0498, 254.0767 , 225.0246, 211.0929, 210.0909, 179.0460, 143.0461, 128.0351
+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₁₁ S	13.9	530.1441 (1.5)	306.0766, 272.0884, 257.0490, 254.0775 , 225.0222, 210.0886, 179.0459, 143.0457, 128.0351
	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₁₁ S	14.4	530.1446 (0.7)	448.0034, 306.0775, 272.0878, 257.0491, 254.0767 , 242.0263, 210.0877, 196.9906, 179.0447, 143.0462, 128.0354
BG (Parent) +O	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	16.0	225.0775 (-3.2)	169.0139, 168.0063, 125.0232, 124.0167, 78.0111
	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	8.4	241.0725 (-3.2)	169.0144 , 168.0065, 125.0239, 124.0165 , 78.0110, 59.0138
	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	8.6	241.0724 (-3)	169.0139 , 168.0054, 125.0238, 124.0163 , 59.0137
+CH ₂	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	17.5	239.0928 (-1.6)	225.0727, 224.0690, 166.9989 , 139.0050, 124.0140, 123.0088 , 95.0136, 79.0187
	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	17.8	239.0929 (-1.7)	225.0713 , 224.0685, 183.0298, 168.0047, 166.9985 , 138.0326, 124.0146, 123.0087, 95.0132, 79.0188
+O+CH ₂ -2H+GSH	C ₁₂ H ₁₆ O ₆	11.6	255.0880 (2.4)	241.0681, 2400644, 194.9384, 168.0045, 166.9985, 124.0144, 123.0090, 78.9582
	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O ₁₁ S	13.5	530.1436 (2.6)	306.0748, 272.0872, 257.0470, 254.0766 , 223.0616, 210.0879 , 197.0563, 182.9747, 179.0457, 146.0456, 143.0454, 128.0347
	C ₃₁ H ₄₄ N ₆ O ₁₇ S ₂	12.2	417.1032* (-0.6)	562.1161 , 417.1045, 304.0571, 289.0179, 272.0876, 255.0302, 254.0784, 214.9475 , 210.0867, 179.0462, 146.0456, 143.0464, 128.0358, 74.0249
-4H+2GSH +CH ₂ -2H+GSH	C ₂₂ H ₃₁ N ₃ O ₁₁ S	15.2	544.1587 (3.5)	462.0798, 380.0784, 272.0877, 271.0638, 256.0404 , 210.0886, 179.0466, 143.0463 , 128.0353, 99.0558, 74.0250
	C ₂₂ H ₃₁ N ₃ O ₁₁ S	16.2	544.1590 (3)	306.0767, 272.0886, 271.0631, 254.0789 , 225.0780, 210.0880, 196.9907, 179.0451, 143.0464, 128.0345

Table 5.4 Summary of LC-HRMS/MS data of ester gallates analogs metabolites (continued)

Biotransformation	Formula	RT (min)	Measured m/z [M-H] (ppm)	Selected MS/MS fragments
OG (Parent)	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	18.6	281.1394 (-0.1)	169.0124 , 168.0054 , 151.0035, 140.0110, 125.0221 , 124.0153 , 78.0105
+O	C ₁₅ H ₂₂ O ₆	17.1	297.1345 (-0.7)	279.1226 , 269.1410 , 253.1447 , 235.1349 , 169.0141 , 168.0063, 125.0235 , 124.0160
	C ₁₅ H ₂₂ O ₆	17.3	297.1340 (1)	279.1236 , 269.1419 , 253.1442 , 235.1390 , 169.0134 , 168.0060 , 151.0034, 125.0227 , 124.0154 , 78.0104
+2O	C ₁₅ H ₂₂ O ₇	14.2	313.1291 (-0.4)	169.0141 , 168.0063, 151.0039 , 125.0237 , 124.0163
+O-2H (aldehyde)	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	17.4	295.1190 (-1)	267.1227, 251.1284, 237.0794, 169.0137 , 168.0056, 125.0232 , 124.0156
+2O-2H (acid)	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	17.2	311.1139 (-1)	293.1024 , 267.1239, 169.0136 , 159.1018 , 151.0027 , 125.0232 , 124.0153 , 123.0079
+CH ₂	C ₁₆ H ₂₄ O ₅	18.8	295.1544 (2.3)	281.2162, 280.1312, 271.2162 , 169.1234, 166.9988, 139.0034, 124.0163, 123.0086
	C ₁₆ H ₂₄ O ₅	19.0	295.1544 (2.3)	281.1303, 280.1308, 277.2170, 251.2381, 197.1186, 169.1235, 166.9990, 139.0030, 124.0084
+O+CH ₂	C ₁₆ H ₂₄ O ₆	17.8	311.1499 (0.4)	296.1254 , 181.0131, 166.9979 , 124.0081, 123.0081
-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₁₁ S	18.1	586.2066 (1.7)	313.1105 , 306.0760 , 272.0882 , 254.0775 , 210.0886 , 182.9752 , 179.0465 , 143.0459 , 128.0351
+O-2H+GSH	C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₁₂ S	15.5	602.2018 (1.1)	329.1051 , 272.0874 , 254.0773 , 210.0881, 182.9754 , 143.0459 , 128.0351
	C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₁₂ S	15.1	602.2025 (0.4)	329.1073 , 306.0766 , 272.0890 , 254.0784 , 210.0873, 182.9762 , 143.0454 , 128.0351
+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₆ H ₃₉ N ₃ O ₁₁ S	18.4	600.2228 (0.7)	327.1270 , 272.0878 , 254.0781, 210.0883, 179.0463, 143.0466 , 128.0358
+O+CH ₂ -2H+GSH	C ₂₆ H ₃₉ N ₃ O ₁₂ S	16.9	616.2180 (0.1)	343.1223, 272.0883 , 254.0786, 210.0893, 143.0464, 128.0351
LG (Parent)	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	19.2	337.2017 (1)	169.0124 , 168.0051 , 151.0031, 140.0109, 125.0224 , 124.0150 , 78.0106
+O	C ₁₉ H ₃₀ O ₆	18.5	353.1981 (3.5)	335.2220, 223.1333, 169.0138, 168.0063, 125.0234, 124.0160
	C ₁₉ H ₃₀ O ₆	18.7	353.1966 (0.9)	309.2060, 169.0139 , 168.0062 , 151.0034, 140.0111, 125.0234 , 124.0159 , 78.0108
+2O-2H (acid)	C ₁₉ H ₂₈ O ₇	18.6	367.1759 (0.7)	349.1654, 323.1844, 215.1650 , 169.0141, 151.0035 , 125.0239, 124.0162, 123.0084
+O-2H (aldehyde)	C ₁₉ H ₂₈ O ₆	18.8	351.1811 (-0.6)	291.1927, 269.2106 , 169.0136, 124.0160
+CH ₂	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	19.3	351.2177 (-0.1)	337.1976, 336.1929 , 253.2166, 168.0052, 166.9981 , 152.0104, 139.0030, 124.0151, 123.0083
	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	19.4	351.2172 (1.4)	337.1978, 336.1934 , 183.0300, 168.0054, 166.9984 , 152.0104, 139.0034, 124.0152, 123.0083
-2H+GSH	C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₁₁ S	18.9	642.2707 (-0.8)	369.1723 , 306.0757 , 272.0879 , 254.0775 , 210.0878, 182.9753 , 143.0457 , 128.0346
+O-2H+GSH	C ₂₉ H ₄₅ N ₃ O ₁₂ S	18.2	658.2657 (-0.9)	385.1664 , 306.0748 , 272.0875 , 254.0765 , 182.9749 , 143.0456 , 128.0347
+CH ₂ -2H+GSH	C ₃₀ H ₄₇ N ₃ O ₁₁ S	19.0	656.2857 (-1.4)	383.1876 , 368.1650, 272.0874 , 254.0776, 210.0875, 179.0461, 143.0461 , 128.0354

*: doubly charged ions [M-2H]²⁻; Fragment ions with >20% relative intensity compared to base peaks are listed in bold, base peaks are underlined.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GÉNÉRALE

La synthèse et la diversification des produits chimiques fabriqués par l'homme au cours des dernières décennies ont augmenté de manière spectaculaire. On estime qu'environ 200 à 300 nouveaux xénobiotiques sont produits et commercialisés en quantités importantes chaque année (Sun *et al.*, 2022). En outre, les informations concernant l'impact de ces produits nouvellement introduits sur la santé humaine sont très limitées (Binetti *et al.*, 2008). L'essor de l'industrie chimique de synthèse a donné lieu à un cocktail de produits chimiques auxquels l'homme et d'autres organismes sont exposés quotidiennement, ce qui rend l'évaluation des risques de l'exposition totale plus nécessaire et plus difficile que jamais. La majorité des recherches actuelles se concentrent sur un seul groupe de composés chimiques, tout en négligeant les effets combinés et interactifs de l'exposition. Une approche plus systématique est donc nécessaire pour une évaluation plus complète des risques cumulatifs.

Tout au long des études présentées, une nouvelle stratégie a été développée dans le but de fournir plus de connaissance sur le métabolisme des xénobiotiques étudiés. Chaque étape a préalablement été optimisée afin d'assurer la qualité des résultats. Tout d'abord, la préparation des échantillons délicats a été optimisée pour permettre une récupération adéquate des métabolites peu abondants de plusieurs molécules sensibles. Ensuite, l'optimisation des paramètres de chromatographie liquide a été effectuée afin d'améliorer la séparation des différentes molécules ayant une vaste gamme de polarité et de sensibilité. Cela réduit la complexité des échantillons et permet d'avoir des signaux abondants. Suivi par la sélection des paramètres la méthode d'acquisition

MS/MS la plus appropriée. Finalement, l'analyse de l'ensemble des données complexes acquises a été optimisée pour une interprétation adéquate des résultats, la validation des données et la détermination des faux positifs.

Pour atteindre avec succès les objectifs ci-dessus, chaque étude a été conçue sur la base d'au moins un des aspects suivants : 1) l'amélioration de la préparation des échantillons pour différents xénobiotiques et de leur analyse LC-MS/MS et 2) une stratégie efficace pour le traitement des données complet afin de répondre à des questions biologiquement pertinentes. Ce chapitre discutera des résultats des études présentées, ainsi que des limites (Figure 6.1) et des améliorations possibles.

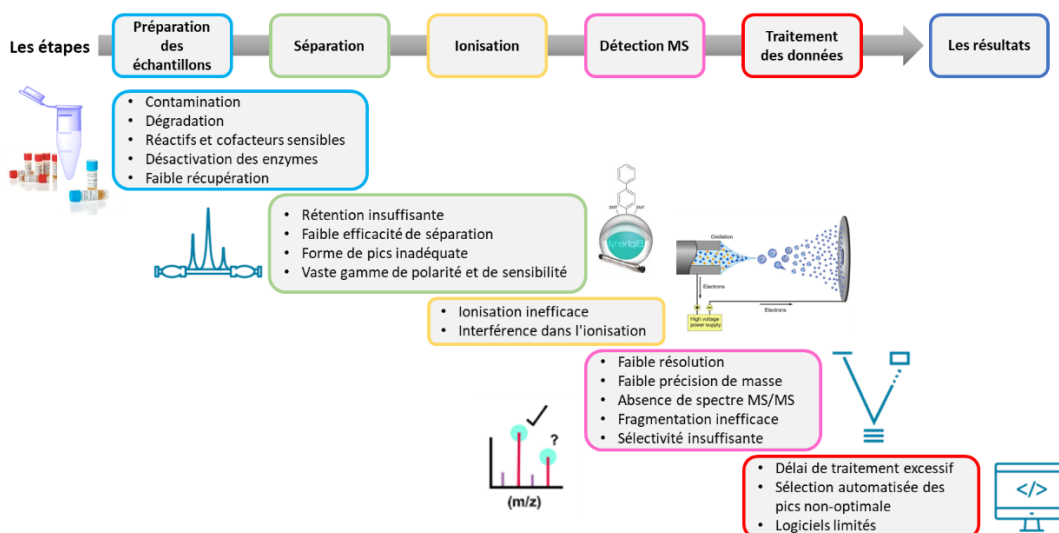


Figure 6.1 Les défis à relever dans le flux de travail

6.1 Les incubations *in vitro* des xénobiotiques

Les études *in vitro* du métabolisme des xénobiotiques sont peu coûteuses et faciles à réaliser. Elles constituent un mécanisme de criblage approprié pour caractériser les métabolites des xénobiotiques, élucider leurs voies de biotransformation et représente une étape préliminaire pour les tests *in vivo* ultérieurs. Dans cette étude, les incubations *in vitro* utilisaient le xénobiotique d'intérêt, les fractions hépatiques comportant les

enzymes de biotransformations, les cofacteurs (NADPH, UDPGA, PAPS et SAM) et l'agent de piégeage des métabolites réactifs (GSH).

6.1.1 Le xénobiotique d'intérêt

Dans cette thèse de recherche, le métabolisme *in vitro* des xénobiotiques de différentes familles a été étudié en détail. La majorité de ces molécules ont été bien étudiées dans des recherches antérieures, cependant, de nombreuses questions concernant leurs produits de biotransformation et surtout leurs métabolites réactifs doivent encore être évalués. En outre, les effets et la toxicité reliés à ces nombreux composés étudiés sont très différents. Les chapitres II, III et IV présentent l'analyse de métabolisme de contaminants environnementaux émergents (BPA, BHT et leurs analogues). Ces derniers manquent de directives normalisées et règlementées et de techniques d'analyse efficace. Cependant, le chapitre V présente une comparaison de métabolisme d'une différente famille de xénobiotiques, les métabolites secondaires de plantes (catéchines de thé vert), qui ont plusieurs effets bénéfiques, aux antioxydants synthétiques (gallates d'ester). Le but général de cette thèse a été de développer une approche qui permettra d'étudier le métabolisme de non seulement des 24 xénobiotiques présentés dans les chapitres précédents, mais de développer une méthode qui pourrait être appliquée aux autres xénobiotiques ayant des structures et utilisations semblables. Tous les standards des xénobiotiques étudiés avaient une pureté de $\geq 98\%$ (à l'exception de BHA qui avait une contribution de $\leq 10\%$ de l'isomère 2-BHA, avec $\geq 98\%$ considérant la somme des isomères).

6.1.2 Enzymes de biotransformation

Le foie est le principal site de métabolisme de nombreux xénobiotiques chez les mammifères. Par conséquent, les fractions subcellulaires du foie (microsomes et S9) et les hépatocytes contiennent une large gamme d'enzymes de biotransformation et sont couramment utilisées pour étudier le métabolisme *in vitro*. Il a été démontré que les trois systèmes prédisent correctement les profils des métabolites excrétés et circulants

chez l'homme (Lee et Zhu, 2011). Les avantages et les inconvénients des différents systèmes sont présentés dans le Tableau 1.3 les microsomes humains et du rat (HLM, RLM) ainsi que les Supersomes CYP3A4 ont été utilisés dans les études présentées ci-haut, avec les cofacteurs adéquats, pour l'étude des métabolites oxydatifs, méthylés, des adduits GSH et des conjugués glucuroniques. Cependant, les fractions S9 de l'homme et de rat (HS9 et RS9) ont été utilisées pour l'analyse des conjugués sulfatés vu que les SULTs sont présents dans le cytosol des hépatocytes.

Les métabolites *in vitro* sont très diversifiés et chaque classe peut contribuer différemment à l'interprétation des résultats de toxicité. Les principaux facteurs à prendre en compte pour l'analyse des métabolites sont la quantité relative (majeure ou mineure), l'activité pharmacologique du métabolite, ainsi que la probabilité que des métabolites soient formés par des intermédiaires réactifs, ou des métabolites stables. Les profils qualitatifs et quantitatifs des métabolites *in vitro* fournissent des informations utiles pour l'évaluation initiale fournissant des données comparatives au profil *in vivo* (Zhu et al., 2009). Les différences qualitatives du métabolisme entre l'homme et l'animal sont rares, mais une différence quantitative est fréquente (Lee et Zhu, 2011). Ceci a été montré dans les chapitres II, III et IV où les xénobiotiques étudiés ont été incubés avec des fractions hépatiques de rat et de l'humain. En général, nos résultats ont montré que les mêmes métabolites sont formés dans les deux espèces. Tant que les limites sont reconnues et que les précautions appropriées sont prises dans la conception et l'interprétation des études *in vitro*, elles représentent un outil viable pour l'évaluation comparative du métabolisme inter-espèces et pour les études de toxicité (Whalley *et al.*, 2017).

6.1.3 Les cofacteurs

Toutes nos études utilisent le système de régénération du NADPH (NRS) dans les incubations *in vitro* au lieu de l'ajout direct de NADPH commercial. Il s'agit de la régénération enzymatique du NADPH en utilisant la glucose-6-phosphate (G6P),

NADP⁺, MgCl₂ et l'enzyme glucose-6-phosphate-déhydrogénase (G6PDH) pour identifier les métabolites oxydatifs (Figure 6.2). L'utilisation du NRS est beaucoup plus économique, car le NADPH est une molécule métastable et coûteuse d'une part. Et d'autre part, le NRS favorise le métabolisme à long terme des xénobiotiques à tester en s'assurant que le NADPH n'est pas le réactif limitant. De plus, plusieurs études ont montré que l'utilisation du NADPH plutôt que du NRS peut sous-estimer les taux cinétiques des réactions de biotransformation et peut fausser l'évaluation des taux de déplétion *in vitro* mesurés pour un xénobiotique (Barroso *et al.*, 1999; Mazur *et al.*, 2009)

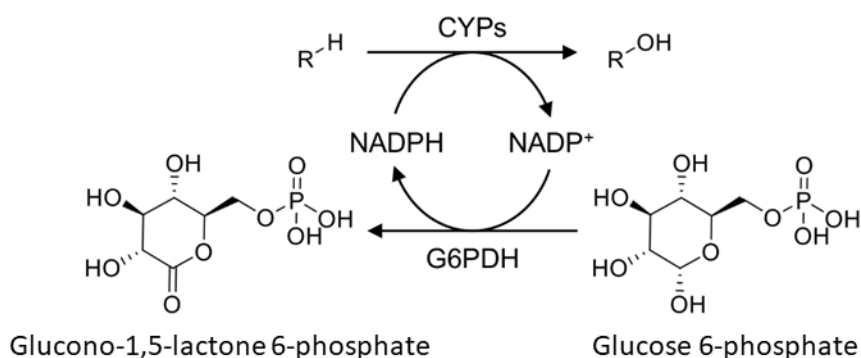


Figure 6.2 Système de régénération du NADPH (NRS) utilisant le glucose 6-phosphate et le NADP⁺ dans l'oxydation médiée par les CYPs.

D'autres cofacteurs, plus spécifiques à certaines réactions de biotransformation, ont également été utilisés pour identifier un vaste éventail de métabolites. L'UDPGA a été utilisée pour l'analyse des conjugués glucuroniques de BPA, BHT et leurs analogues tandis que le PAPS a été employé pour étudier leurs conjugués sulfates. Et enfin, le SAM a permis d'étudier les métabolites méthylés de l'EGCG et de ses analogues ainsi que les analogues des esters de gallates (chapitre V). Tous ces cofacteurs ont été aussi utilisés en combinaison avec le NRS afin d'accéder à des métabolites issus des réactions de biotransformation combinées telles qu'un métabolite oxydé et conjugué à un acide glucuronique (+O+gluc) ou un groupe sulfonate (+O+sulf). Le choix des cofacteurs dépendra de la nature des xénobiotiques à étudier et du type d'enzymes susceptible de rencontrer au cours du métabolisme. De plus, certains cofacteurs sont

très instables, en particulier le PAPS qui doit être stocké à -80°C et préparé juste avant son utilisation.

Des échantillons « contrôles » doivent également être réalisés en excluant du mélange d'incubation le substrat, le NRS (déterminer si la réaction dépend de l'oxydation) ou les autres cofacteurs ou les fractions hépatiques (réaction dépendante des protéines/enzymes) afin de s'assurer que les métabolites sont issus de la réaction de biotransformation. De plus, il est primordial que les échantillons de métabolisme et les contrôles soient préparés et incubés dans les mêmes conditions.

Le flux de travail doit être ajusté en fonction de la nature du xénobiotique étudié. Par exemple, après l'incubation du BHT et de ses analogues, l'étape d'évaporation du surnageant a été évitée et remplacée par une dilution (chapitre IV). Le BHT est sensible à la dégradation lorsqu'il est évaporé. Ainsi, il se peut qu'il ne soit pas détectable lors de l'analyse, tout comme ses métabolites les plus sensibles tels que le BHQ. L'EGCG et ses analogues, présentés dans le chapitre V, sont très sensibles à la température et à la lumière et présentent un risque d'épimérisation. La préparation de ces échantillons nécessite un travail minutieux et rapide pour éviter leur dégradation ou leur épimérisation.

6.1.4 Le piégeage des métabolites réactifs

Le glutathion (GSH) a été largement utilisé pour le piégeage *in vitro* et la détection des métabolites réactifs. Les structures chimiques des adduits GSH résultants sont caractérisés par la LC-MS/MS, et les métabolites réactifs peuvent être déduits de ces analyses (comme mentionné dans la partie 1.4.2). Certaines études antérieures ont montré que les adduits du GSH subissent une perte neutre commune de 129 Da (γ -glutamyle) lors de la dissociation induite par collision (CID) en mode positif. Ainsi, le balayage de la perte neutre de 129 a été largement utilisé comme méthode générique pour détecter rapidement les adduits du GSH formés dans les incubations microsomales (Lee et Zhu, 2011; Yan *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007). Cependant, la faible sensibilité,

la faible sélectivité et le risque élevé de faux positifs sont des facteurs pour lesquels cette méthode n'est pas idéale pour l'étude des métabolites réactifs. Dans nos études, nous avons priorisé la haute résolution du QqTOF et de la fragmentation caractéristique en mode négatif du GSH (Figure 1.29) pour établir les structures des adduits GSH détectées dans les incubations. Cette méthode a montré son efficacité pour le dépistage des conjugués GSH connus ou pour des nouveaux conjugués provenant de xénobiotiques très étudiés tels que le BPA, et même pour distingués les isomères d'adduits GSH (Figure 2.4).

L'inconvénient du GSH est sa faible efficacité pour le piégeage des métabolites réactifs "électrophile fort", tels que les aldéhydes réactifs (Yan *et al.*, 2007). Des agents de piégeage alternatifs, tels que la semicarbazide, la méthoxylamine et l'N-acétyllysine ont été utilisés pour imiter les résidus lysine des protéines afin de capturer les aldéhydes réactifs (Li *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2007). Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié alors seulement la formation de métabolites réactifs « faible » avec le piégeage au GSH.

6.1.5 Limitations des études *in vitro* du métabolisme

Les études *in vitro* sont limitées sur plusieurs aspects. Elles se restreignent aux cultures cellulaires uniques et simplifiées. De plus, les conditions cellulaires ne sont pas exactement reproduites, et parfois, la réponse cellulaire suite à un stimulus est nulle ou incomplète. Dans certains cas, il peut également y avoir une réduction progressive de l'expression ou de l'activité enzymatique dans les cultures cellulaires. Elles ne considèrent pas l'impact qu'il peut y avoir sur un ensemble d'organes ou de tissus aux propriétés différentes (Gomez-Lechon *et al.*, 2003). Ainsi, les résultats des études *in vitro* doivent, dans la plupart des cas, être validés par des études *in vivo*. Cependant, les études cliniques *in vivo* sur la formation de métabolites et surtout celles sur les métabolites réactifs chez l'homme sont souvent entravées par la faible prévisibilité des résultats et le risque de dommages potentiels. Les modèles animaux sont donc une

option courante pour étudier le métabolisme *in vivo* des xénobiotiques. Ces études incluent souvent un modèle de rongeur (rat ou souris), et ce, même si des différences significatives existent entre les espèces. Néanmoins, dans certains cas, des études *in vivo* sur les métabolites réactifs ou la toxicité des xénobiotiques sont possibles. Les études cliniques humaines idéales sont rarement applicables dans l'évaluation de la toxicité des xénobiotiques, mais elles fourniraient des informations précieuses dans les tests de préapprobation (médicaments ou produits de soin personnels ou de consommation quotidienne) (Splawiński *et al.*, 2006).

6.2 Le développement de la méthode analytique LC-HRMS/MS

L'optimisation des paramètres chromatographiques et de la spectrométrie de masse est importante pour détecter et identifier correctement les métabolites formés dans les incubations *in vitro*. La séparation chromatographique utilisée pour l'ensemble de nos résultats était en mode d'élution par gradient pour enrichir progressivement la phase mobile en solvant et donner une élution progressive (Rouessac *et al.*, 2004). Ceci a permis une bonne résolution et une bonne séparation des pics, même en cas d'isomères et d'épimères. Le choix des phases mobiles et de la colonne est également des facteurs importants pour la séparation des composés. Elles sont optimisées en fonction du type et de la nature d'analyte étudiés. En effet, pour l'ensemble des xénobiotiques étudiés, la colonne biphényle a été choisie. Elle offre une meilleure rétention et une plus grande sensibilité, en particulier pour les composés aromatiques. Elle a aussi la capacité de séparer les isomères, tels que les dimères des analogues de BPA (Figure 2.5) ou même les épimères des catéchines (Figure 4.2). Les particules ayant un noyau dur (*core-shell*) de la colonne utilisée offrent une haute performance, avec une phase stationnaire unique, ce qui permet d'améliorer le nombre de plateaux théoriques et de diminuer la contre-pression de la colonne (La Nasa *et al.*, 2013). Cette colonne a été utilisée dans l'étude de métabolisme *in vitro* d'autres types des xénobiotiques tels que le triclosan (Guesmi et Sleno, 2020) et les principes actifs des écrans solaires (Guesmi *et al.*, 2020).

Le choix de la phase mobile a un grand impact sur la sélectivité et sur la résolution des composés. Chacun des solvants utilisés en chromatographie en phase inverse possède des propriétés solvato-chromatiques différentes. Par exemple, le méthanol est plus acide tandis que l'acétonitrile peut faire dans des interactions dipôle-dipôle. Le passage d'un solvant à l'autre est un bon moyen d'étudier les différentes options de sélectivité offertes. Le méthanol a été choisi pour l'analyse des catéchines de thé vert, car il offrait une meilleure rétention aux catéchines les plus polaires et surtout pour leurs métabolites polaires par rapport à l'ACN (chapitre V). De plus, le pH de l'éluant doit être soigneusement pris en compte, car il affecte le degré d'ionisation, et donc l'hydrophobicité relative des analytes. C'est pour cette raison que l'acide formique est seulement ajouté dans la phase A pour l'analyse de métabolisme de BPA et ses analogues (chapitres II et III). L'ajout d'acide formique dans les deux phases détériore la forme des pics. Les phases mobiles acides sont principalement utilisées en bioanalyse LC-MS. Cependant, une grande partie des analytes, dont certains xénobiotiques et leurs métabolites, sont des composés basiques qui existent sous des formes ionisées dans les phases mobiles acides. Cependant, l'utilisation de phases mobiles acides peut avoir des inconvénients qui comprennent une mauvaise forme des pics (peak tailing), une rétention insuffisante, une faible efficacité de séparation et une faible sensibilité. En utilisant des phases mobiles à pH neutre ou élevé, les composés basiques tels que le BHT (pK_a 12.2) peuvent être neutralisés. Ces composés, généralement plus hydrophobes, sont élués avec une plus grande organicité et possèdent un temps de rétention plus élevé que celui des composants de la matrice et des sels hydrophiles à élution précoce. Avec l'amélioration de la forme des pics chromatographiques (pics plus nets et plus symétriques), la plupart des composés basiques présentent des rapports signal/bruit plus élevés dans les phases mobiles basiques que dans la phase mobile acide couramment utilisée (Tan et Fanaras, 2019). Ceci a été démontré dans le chapitre IV, lors de l'analyse de BHT et de ses analogues. Dans la phase mobile A, l'acide formique a été remplacé par l'acétate d'ammonium et tandis que la phase mobile B se composait de 100% d'ACN. Cela permettrait d'avoir

un meilleur signal et une meilleure forme de pics. Bien que la même colonne ait été utilisée dans ces études, l'optimisation des phases mobiles était nécessaire en fonction de la nature des xénobiotiques étudiés. Le gradient d'élution, le débit, la température de la colonne ont aussi été optimisés afin d'avoir une meilleure qualité de séparation chromatographique.

Une fois que la méthode de séparation chromatographique est optimale, l'optimisation des paramètres d'ionisation et de la MS est nécessaire. Les paramètres de la source (température, voltage, débit de gaz, etc.) ont été afin non seulement pour obtenir un signal maximal pour tous les analytes étudiés, mais aussi pour obtenir un signal stable. L'ESI est largement utilisée dans les études bioanalytiques parce qu'elle peut ioniser une grande variété d'analytes, allant de petites molécules aux macromolécules. Cependant, elle peut être inefficace pour ioniser certains composés non polaires. L'APPI est une source d'ionisation qui a récemment été développée et qui peut ioniser ce type de composés (Raffaelli et Saba, 2003). Outre que la polarité, la composition de la phase mobile (volatilité, viscosité, pH, concentration de l'électrolyte) et les propriétés des analytes (pK_a , hydrophobie, énergies de solvation des ions) peuvent également influencer l'efficacité de l'ionisation de l'ESI (Poletini, 2006). L'optimisation du mode d'ionisation est aussi importante surtout dans le cas de l'analyse des xénobiotiques avec des sensibilités différentes. Par exemple les modes d'ionisation positif et négatif ont été évalués pour la détection de BPA et de ses analogues (chapitre III). Les espèces déprotonées des bisphénols ont donné le signal le plus élevé (Figure 3.1), à l'exception du BPS, qui a montré des signaux comparables pour les ions protonés et déprotonés. En général, le mode positif (ESI+) était généralement préféré par les analystes. Cependant, on constate que, dans de nombreux cas, le mode négatif (ESI-) est la meilleure option en raison de la réduction du bruit de fond, d'une meilleure sensibilité (efficacité d'ionisation) et de son potentiel de limites de détection plus basses (Liigand *et al.*, 2017). Pour toutes les molécules étudiées, les

deux modes d'ionisation ont été testés dès le début du développement de la méthode et elles ont toutes montré une préférence pour le mode négatif.

Une fois ionisés, les ions parents entrent dans le premier compartiment du MS, puis arrivent dans la cellule de collision. Des molécules de gaz entrent en collision avec les ions parents permettant ainsi de les décomposer en fragments. Ces derniers sont formés à partir de différentes énergies de collision (CE) appliquées et forment, à leur tour, différents spectres. Pour l'analyse des résultats, l'énergie de collision utilisée dans la plupart des expériences MS/MS était de 30V, avec une propagation de $\pm 10V$. Dans certain cas, il fallait optimiser cette valeur et l'augmenter à $50 \pm 10 V$ pour l'analyse des dimères de BPS et de CUMY ainsi que les di- adduits GSH, et parfois même à $70 \pm 10 V$ pour les dimères de BPAF (chapitre III). Cette optimisation a permis d'avoir plus de fragments caractéristiques aux métabolites afin de distinguer les C-C et les C-O dimères des analogues de BPA et de mieux élucider leurs structures.

Pour l'analyse LC-HRMS/MS, le temps de rétention et la masse exacte des ions précurseurs et produits sont deux paramètres clés pour l'identification des métabolites. Durant toutes les analyses effectués une calibration automatique a été introduite dans la séquence d'injections après chaque quatre échantillons. Cette calibration consiste à l'introduction un mélange de composés standards dans le MS à un rythme régulier pendant que la procédure est en cours. Cette solution du calibrant est introduite directement dans le MS à partir d'une pompe à seringue ou par un injecteur connecté à la pompe LC. La calibration nécessite une série d'ions espacés dans la gamme de masse d'intérêt. Cette procédure de calibration assure la robustesse du système pour la mesure des masses exactes des ions d'intérêt, s'ils sont bien résolus des autres ions présents au même moment durant l'analyse. Les résultats des standards sont automatiquement vérifiés par le logiciel pour déterminer la performance du système, ce qui permet une évaluation et un contrôle rigoureux de la qualité des signaux.

De nos jours, les modes d'acquisition dépendants des données (DDA) et indépendants des données (DIA) sont les deux paradigmes expérimentaux détachés, qui visent à acquérir simultanément des spectres MS et MS/MS pour tous les composants en un seul passage analytique. En général, DDA génère un spectre MS/MS à partir des fragments issus du top N, où N représente le nombre d'ions précurseurs les plus abondants sélectionnés pour la fragmentation (Figure 6.3). Pour DIA, tous les ions précurseurs sont isolés dans la plage de masse prédéfinie pour acquérir des spectres MS/MS dans une fenêtre d'isolement (Sun *et al.*, 2021). La méthode DDA est plus adaptée que l'acquisition DIA, car elle peut recueillir efficacement les ions fragments des composés cibles en présélectionnant les ions précurseurs, ce qui réduit considérablement les taux de faux positifs (Tonoli *et al.*, 2020). De plus, les spectres MS/MS obtenus par DIA sont plus complexes que ceux de DDA, car les fenêtres d'isolement plus larges adoptées par la méthode DIA, permettent une fragmentation plus importante de tous les composés, y compris les interférents de la matrice avec les mêmes masses précises (Sun *et al.*, 2021). Pour ces raisons, nos études utilisent l'acquisition DDA pour les cinq ions précurseurs les plus abondants (Chapitre II-V).

Néanmoins, l'acquisition MS/MS en mode DDA sur un système QqTOF n'est pas parfaite et ne permet pas une couverture complète de tous les métabolites détectés, en particulier ceux qui sont peu abondants. L'absence de spectre MS/MS empêche l'élucidation de la structure et l'identification des métabolites. Afin de maximiser le rendement d'identification, le mode d'acquisition MS/MS dédié ou ciblé (*Targeted MS/MS*) a été utilisé pour certains métabolites (Figure 6.3). Il est basé sur la connaissance préexistante des métabolites potentiels, de leurs masses précises et l'évaluation manuelle des données MS1. L'utilisation du mode MS/MS dédié a permis d'augmenter significativement la qualité spectrale des MS/MS de ces métabolites. Par exemple, les MS/MS des di-adduits GSH (chapitre III) ont été acquis en mode MS/MS dédié lors de la seconde injection, car leurs signaux n'étaient pas assez intenses et la qualité des spectres acquis à la première injection n'était pas suffisante pour

l'élucidation des structures. Ainsi, de multiples nouveaux métabolites ont été caractérisés.

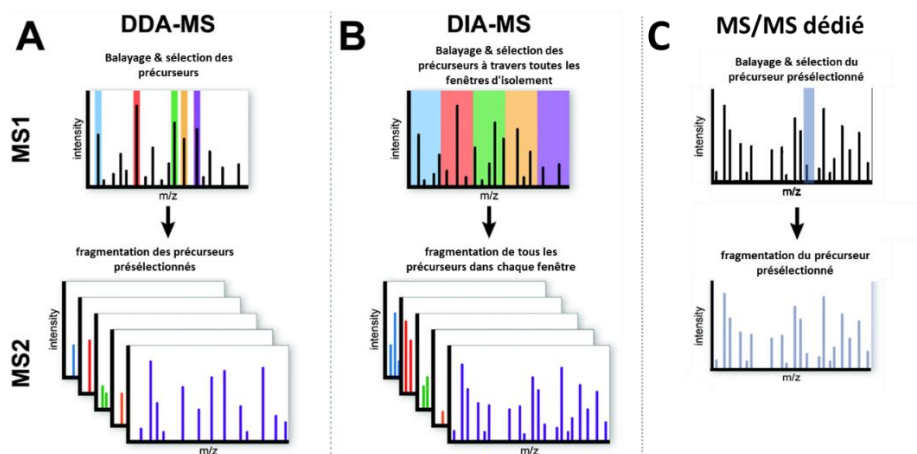


Figure 6.3 Aperçu schématique des méthodes d'acquisition DDA-MS (a), DIA-MS (b) et MS/MS dédié (c).

6.3 Traitement des données

Afin d'étudier avec succès le métabolisme des xénobiotiques, plusieurs logiciels ont été utilisés. La plupart d'entre eux sont des logiciels de Sciex, le fabricant de spectromètres de masse utilisé lors des analyses effectuées tout au long de ce projet. Le logiciel MetabolitePilot™ a été utilisé pour l'identification des métabolites. Cet outil permet de rechercher les métabolites présents dans des échantillons de métabolisme complexes de manière ciblée et non ciblée en le comparant avec des échantillons de contrôle. Les analyses ciblées recherchent les caractéristiques des métabolites (m/z et temps de rétention) en fonction du métabolisme prédit en phase I et/ou en phase II (voir tableau 1.5) et des caractéristiques structurales (Figure 1.25). La comparaison automatisée de l'analyte et du contrôle peut générer un grand nombre de pics inattendus qui doivent être vérifiés manuellement afin de déterminer s'ils sont susceptibles d'être liés à un composé parent. La liste des résultats des métabolites potentiels peut également être filtrée en fonction de l'aire de pic ou du temps de rétention. Lorsque les pics des métabolites attendus sont particulièrement intenses, l'analyste peut juger que les pics

inattendus mineurs présentent relativement peu d'intérêt, ne laissant que les pics inattendus majeurs dans le tableau (Mortishire-Smith *et al.*, 2005). L'application d'un filtre de temps de rétention peut réduire le nombre de pics qui doivent être examinés. Par exemple, dans le cas des analytes très polaires, qui éluent tôt dans le chromatogramme, les pics très fortement retenus peuvent être considérés comme moins susceptibles d'être des métabolites. L'utilisation de ce filtre permet également de repérer les produits issus de la fragmentation dans la source et de les éliminer. Enfin, dans le métabolisme de phase I, une très forte proportion de métabolites aura une composition élémentaire qui est un sous-ensemble de celle du composé testé, avec une flexibilité supplémentaire sur le nombre d'atomes d'hydrogène et d'oxygène. Une entrée dans le tableau des métabolites inattendus peut donc raisonnablement être ignorée si l'ion observé n'a pas de formule explicative possible dans les limites des tolérances autorisées pour la composition élémentaire (Pichette et Leblond, 2003). Pour les 24 xénobiotiques étudiés, les listes des métabolites proposés par MetabolitePilot™ ont été vérifiées et validées manuellement.

Pour confirmer qu'il s'agit bien d'un pic de métabolite ou pour identifier de nouveaux métabolites potentiels, une recherche manuelle des données a été effectuée avec les logiciels PeakView et MasterView (Sciex). Afin de valider un métabolite, le pic identifié doit répondre aux trois critères suivants : 1) une précision de masse inférieure à 5 ppm, 2) le spectre MS doit être de bonne qualité et le patron isotopique doit correspondre à la charge et à la composition élémentaire du métabolite proposé et 3) les spectres MS/MS doivent contenir les fragments caractéristiques du métabolite d'intérêt et 4) l'absence de ce pic dans les échantillons contrôles (métabolite formé suite au métabolisme). Parfois le logiciel MetabolitePilot™ peut ne pas proposer des métabolites tels que les dimères ou les métabolites issus de produits de clivage de la molécule parent. Ceci peut être dû à l'absence de réactions de biotransformation dans les listes utilisées par défaut ou lorsque l'intensité du pic est en bas des paramètres fixés d'intensités. C'est pour cette raison qu'une recherche manuelle des métabolites

potentiels non présents dans la liste proposée par MetabolitePilot™ est nécessaire, tels que les métabolites proposés dans la littérature. Par exemple, les dimères de BPA, l'adduit di-GSH et les adduits GSH des produits de clivage de BPA (phénol-2H+GSH et isopropylphénol-2H+GSH) n'ont pas été détectés par MetabolitePilot™. Une recherche manuelle sur PeakView et MasterView a permis de les identifier et d'élucider leurs structures pour la première fois dans l'article présenté dans le Chapitre II.

6.4 Résumé des résultats obtenus

Pour donner suite à l'optimisation de la préparation des échantillons, au développement de la méthode LC-HRMS/MS et à la stratégie de traitement des données, le métabolisme *in vitro* du BPA (chapitre II) et de ses analogues (chapitre III), du BHT et de ses analogues (chapitre IV) ainsi que des catéchines de thé vert et des esters gallates (chapitre V) a été étudié en détail. Par conséquent, ces chapitres seront abordés dans cet ordre.

6.4.1 Métabolisme *in vitro* de bisphénol A

L'exposition au BPA peut avoir des effets néfastes sur la santé humaine, tels que la perturbation endocrinienne, l'hépatotoxicité, la neurotoxicité et la mutagénicité. Cependant, le mécanisme moléculaire de la toxicité du BPA n'est pas encore bien défini. Pour mieux caractériser tous les produits de biotransformation possibles du BPA, la LC-HRMS/MS a été utilisée pour détecter et élucider les métabolites en utilisant plusieurs systèmes *in vitro*. Aucune méthode de criblage non ciblée basée sur la spectrométrie de masse à haute résolution n'a été rapportée auparavant, pour la détection des métabolites connus des phases I et II du BPA. Des systèmes *in vitro* complémentaires, comprenant des microsomes hépatiques humains et de rat, des Supersomes CYP3A4 et des fractions S9 de rat, ont été utilisés avec les cofacteurs appropriés (NADPH, UDPGA et PAPS). Trois analogues du bisphénol A marqués aux deutériums (Figure 2.1) ont également été utilisés pour faciliter l'élucidation structurelle des métabolites formés et la détermination de leurs régiochimie (Tableau

2.2). Dans des conditions oxydatives, les mêmes métabolites ont été détectés dans les incubations utilisant les RLM, HLM, RS9 et CYP3A4. En présence de NADPH, le BPA a formé du BPA hydroxylé (BPA+O), en position *ortho* (Figure 2.6). Celui-ci est ensuite oxydé en *ortho*-quinone (BPAQ), qui peut se lier à l'ADN et au glutathion (Stack *et al.*, 2018). Lorsque le GSH a été ajouté aux incubations, de nombreux adduits ont été détectés. Le BPAQ était l'intermédiaire réactif probable pour la formation de l'adduit BPA+O-2H+GSH proposé comme du 3-hydroxy-5-GSH-BPA (Figure 2.6). Plusieurs études ont montré la production de BPAQ-GSH (chimiquement ou enzymatiquement), mais cette étude est la première à indiquer la régiochimie de ce conjugué en utilisant la spectrométrie de masse à haute résolution. Le pic le plus intense de conjugués au glutathion était BPA-2H+GSH, qui suit une voie métabolique différente de celle du 3-hydroxy-5-GSH-BPA. La formation de cet adduit était NADPH-dépendante. Il a été suggéré que ce métabolite était formé via la formation d'un époxyde suivie de l'ajout de GSH à un intermédiaire arène-époxyde médié par le CYP et de la perte d'une molécule d'eau (Jaeg *et al.*, 2004). Les résultats des analogues deutérés soutiennent cette voie d'activation métabolique (Figure 6.4). Les trois analogues deutérés de BPA ont été incubés en présence de HLM, NADPH et le GSH. Les trois analogues ont produit l'adduit GSH direct (-2H+GSH). L'utilisation des mesures de masses exactes ainsi que leurs spectres MS a montré que seul l'analogue BPA d4 33'55' a perdu un deutérium prouvant que le GSH se lie au BPA en position *ortho* du cycle aromatique (Figure 6.4).

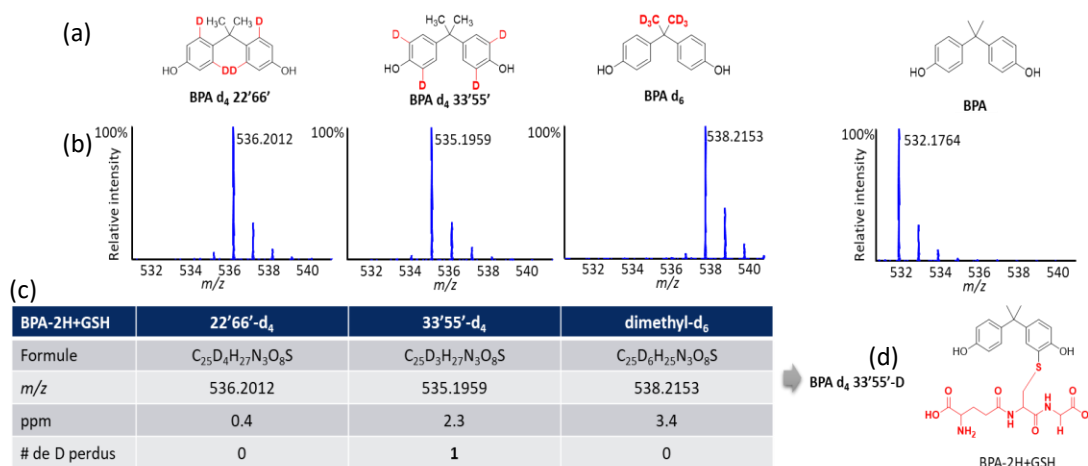


Figure 6.4 Application du marquage au deutérium pour l'élucidation structurale de l'adduit BPA-2H+GSH. (a) Structures chimiques de BPA et ses trois analogues marqués au deutérium disponibles commercialement. (b) Spectres MS de l'adduit GSH direct de BPA et de ses formes deutérées. (c) Tableau des mesures de masses exactes, de ppm et du nombre de deutériums perdus. (d) Structure finale élucidée de l'adduit BPA-2H+GSH.

L'adduit BPA+O-4H+2GSH n'avait pas été détecté auparavant via le métabolisme du BPA. Il a été proposé que ce métabolite suit la même voie que celle du BPA+O-2H+GSH, suivi d'une seconde oxydation (formation de quinone) et d'un ajout de GSH sur le même cycle aromatique, très probablement à la position C2, la moins encombrée. En effet, l'élucidation structurale par HR-MS/MS pour ce nouveau métabolite, avec des expériences de marquage isotopique, a prouvé que les deux groupes glutathionyl et le +O sont ajoutés sur le même cycle aromatique (Figure 2.6).

La formation de phénol-2H+GSH et d'isopropylphénol-2H+GSH a été observée avec les HLM, RLM, et les Supersomes en présence de NADPH et de GSH. D'après leurs spectres MS/MS et le de marquage isotopique, on a pu confirmer que l'ajout de GSH pour ces produits se fait en position *para* (Figure 2.6). Ce phénomène est expliqué par un mécanisme radicalaire dans lequel le BPA subit un clivage homolytique de la liaison C-C, ce qui produit un radical phénol et un radical d'isopropylphénol. Ces radicaux sont instables et se lient rapidement au GSH pour former des adduits stables (Figure 6.5). Le GSH peut piéger les radicaux grâce à sa capacité à donner des électrons, ce qui

lui permet de neutraliser ces espèces réactives. La détection de ces conjugués GSH, l'élucidation de leurs structures, pour la première fois et leur mécanisme de formation sont d'une grande importance pour l'étude de la toxicité de BPA. Le potentiel de la molécule de BPA à se cliver et à former des métabolites réactifs radicalaires présente un danger supplémentaire pour la sécurité dû à ses nombreuses utilisations dans le quotidien.

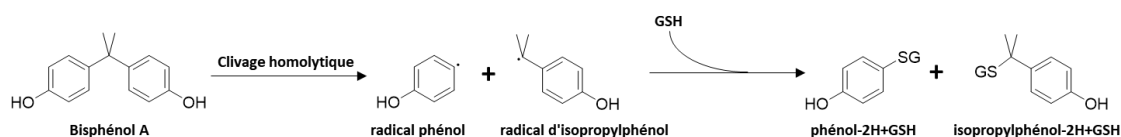


Figure 6.5 Formation des adduits GSH des produits de clivage homolytique de BPA

Nous avons montré que le BPA est également capable de se dimériser dans des conditions oxydantes (Figure 2.2). En étudiant les spectres MS/MS des deux isomères de dimères formés, il a été possible de conclure que le premier isomère ayant un temps de rétention de 16,8 min résulte d'une liaison C *ortho*-C *ortho* et que celui à 17,4 min est formé suite à une liaison C *ortho*-O (Figure 2.6). Ces structures ont été validées par des incubations des analogues marqués au deutérium. En général, si une voie radicalaire est initiée, cette dimérisation correspond à des couplages internes dans lesquels les cycles aromatiques sont juxtaposés pour fusionner. Sur la base de ces résultats, lors de l'oxydation du BPA, une voie radicalaire aromatique est proposée pour initier la formation d'un radical aryle par le CYP450. Par la suite, une fusion entre les cycles aromatiques des deux molécules de BPA pour former le dimère C-C ou entre le radical aryle formé et un groupement hydroxyle de BPA pour générer le dimère C-O. La dimérisation de BPA est une voie de biotransformation intéressante pour les études de toxicité à cause des risques d'accumulation dans l'organisme provenant du caractère hydrophobe des dimères. Contrairement aux voies de dimérisation ou de conjugaison au GSH, la glucuronidation et la sulfatation étaient indépendantes de l'oxydation de phase I, comme le confirme la formation des métabolites BPA+gluc et de BPA+SO₃

(Figure 2.6). L'ajout de NADPH à ces incubations a permis la formation supplémentaire de conjugués glucuroniques ou sulfatés oxydés et d'un nouveau métabolite le BPA+2O+SO₃. Même si la glucuronidation et la sulfatation sont considérées comme des voies de détoxification du BPA, il existe un risque de déconjugaison du métabolite de phase II formé par des enzymes, telles que les glucuronidases ou les sulfatases (Graaf *et al.*, 2002).

Ainsi, l'étude détaillée de la fragmentation MS/MS et l'utilisation de différents analogues du BPA marqués aux deutériums ont permis d'élucider la structure et de confirmer la régiochimie des métabolites connus et nouvellement identifiés du BPA. La stratégie d'analyse développée dans cette étude sera certainement utile pour d'autres études sur l'exposition au BPA ou d'autres xénobiotiques.

6.4.2 Métabolisme *in vitro* des analogues de bisphénol A

Le métabolisme *in vitro* des cinq substitués du BPA (BPAF, BPF, BPS, CUMY et TMBPF) a été étudié pour élucider les réactions de biotransformation de phase I et de phase II dans les fractions hépatiques de rat et d'humain. La méthode chromatographique développée pour l'analyse du métabolisme de BPA a été appliquée pour la séparation de ces différents analogues. Leurs XIC (Figure 3.1) montrent une grande différence de sensibilités lors de l'ionisation en mode négatif. Le BPAF, par exemple, a produit le pic le plus intense des cinq analogues étudiés, soit environ 100 et 400 fois plus élevé que le BPA et le CUMY, respectivement. Cette différence d'intensité du signal pourrait affecter la détection des métabolites. Cependant, la plupart des métabolites ont donné des réponses beaucoup plus importantes que le composé parent non métabolisé, en particulier pour les conjugués de phase II et les adduits du GSH. Ceci constitue un défi supplémentaire pour étudier le métabolisme de ces analogues en utilisant une et unique méthode.

Sous condition oxydative, tous les analogues ont produit un métabolite oxydatif (+O). Le BPF, BPAF et BPS ont produit chacun deux isomères de dimères, qui ont été

caractérisés en C-O et C-C dimères en utilisant leurs spectres MS/MS (Figure 2.3). En raison du caractère hydrophobe du CUMY, aucun dimère n'a été détecté avec le gradient utilisé initialement. Une colonne différente (F5) avec un gradient plus rapide a permis d'obtenir une meilleure détection des dimères de l'ensemble des analogues (Figure 3.7), dont un seul dimère pour le CUMY, comme prévu par sa structure asymétrique. Le spectre HRMS/MS a confirmé qu'il s'agissait d'un dimère C-C (Figure 3.17). Le TMBPF était le seul analogue n'ayant pas formé des dimères dus à la présence des groupements méthyles sur les cycles aromatiques, ce qui bloque les voies de dimérisation proposée ci-dessus.

Tous les analogues ont produit plusieurs adduits GSH (-2H+GSH, +O-2H+GSH, +2O-2H+GSH, +O-4H+2GSH). Ceux qui possédaient une structure symétrique (BPF et TMBP) ont formé des adduits GSH issus des produits de clivage tout comme BPA. La même voie métabolique que le BPA est rationalisée pour le BPF et TMBPF, soit via un clivage homolytique et l'ajout de GSH à chaque position *para* (Figure 3.8).

Tous les substitués de BPA étudiés ont également formé des conjugués glucuroniques (+gluc et +2 gluc) et sulfates (+SO₃) avec combinaisons avec des réactions oxydatives (+O+gluc, +O+SO₃ et +2O+SO₃) (Figure 3.4).

Malgré le grand nombre d'études sur le métabolisme du BPA, il s'agit du premier article portant sur le métabolisme du CUMY et du TMBPF. L'ensemble des analogues du BPA étudiés ont présenté des biotransformations similaires à celles du BPA. Ils ont produit des métabolites oxydatifs, plusieurs adduits GSH différents, ainsi que des conjugués glucuroniques et sulfatés. Une chromatographie optimisée, des mesures de masse précises et une fragmentation détaillée ont permis d'élucider les structures de tous les métabolites et de leurs adduits détectés. Plusieurs métabolites ont été caractérisés dans le chapitre III pour la première fois. Cette importante étude a permis de montrer que malgré les changements structurels entre le BPA et ses analogues, ils suivent tous les mêmes voies métaboliques. Le fait de remplacer le BPA par ces

analogues dans des produits commerciaux souvent plus coûteux sous l'étiquette "sans BPA" ou "BPA free" constitue une préoccupation pour la sécurité des consommateurs. Les études futures devraient se concentrer davantage sur la pertinence de ces voies métaboliques dans la toxicité globale des analogues du BPA.

6.4.3 Métabolisme *in vitro* des antioxydants synthétiques

6.4.3.1 Métabolisme de BHT

Le BHT, l'antioxydant phénolique synthétique le plus fréquemment utilisé, est ajouté aux aliments, aux produits pharmaceutiques et cosmétiques. De plus, il est utilisé comme additif dans le caoutchouc, les plastiques et les huiles minérales (Lanigan et Yamarik, 2002). Son utilisation courante dans divers produits de consommation nous a conduits à étudier son métabolisme plus en détail, d'autant plus que son utilisation et ses méthodes de détection dans les matrices biologiques ne sont pas réglementées. Afin d'étudier les différentes voies métaboliques du BHT, une méthode LC-MS/MS spécifique a été optimisée. Celle-ci utilise la colonne biphényle avec les phases mobiles comportant 5 mM de l'acétate d'ammonium (phase A) et de l'acétonitrile (phase B). Le remplacement de l'acide formique comme additif par l'acétate d'ammonium a permis d'augmenter significativement le signal et a amélioré la forme des pics pour de nombreux métabolites détectés. La détection de BHT était ardue due à son faible signal et sa forte instabilité. De plus, le BHT était assez résistant à la fragmentation en MS, et une augmentation de l'énergie de collision pour former d'autres fragments structurellement caractéristiques entraîne une perte de la majeure partie du signal et aucun ion produit clair n'a été observé. Malgré les nombreuses applications et les différentes études *in vitro* et *in vivo* du BHT, son spectre MS/MS à haute résolution a publié pour la première fois dans l'article présenté au chapitre IV (Figure 4.1).

Les microsomes humains et de rat ont produit des profils métaboliques similaires pour toutes les conditions d'incubation. Tous les métabolites de BHT détectés ont été confirmés par des mesures de masse précises à moins de 5 ppm. De plus, leurs

structures ont été élucidées grâce aux analogues deutérés de BHT (BHT- d_3 et BHT- d_{20}) (Tableaux 4.1 et 4.2). Le métabolisme oxydatif de BHT est complexe. Plusieurs métabolites ont été détectés et identifiés pour la première (Figure 4.2). Par exemple, le DBP est un métabolite connu du BHT. Il est également utilisé comme antioxydant phénolique synthétique dans les plastiques et les emballages alimentaires. Il a été détecté dans les incubations oxydatives et a été confirmé par le standard synthétique DBP, qui a également été incubé dans des conditions oxydatives (Figure 4.5). Une oxydation plus poussée du DBP peut former la BHT-hydroquinone (BHQ), également détectée dans les incubations oxydatives de BHT. Dans ces conditions oxydatives, une voie métabolique majeure est initiée par l'oxydation du groupement *para*-méthyle, conduisant à la formation du BHT-aldéhyde et du BHT-acide par oxydation successive. La forme acide est décarboxylée en DBP, à partir duquel le BHQ est probablement formé. Une autre voie métabolique est initiée par l'oxydation du groupement *t*-butyle. La double oxydation forme le BHT+2O, qui est ensuite oxydé en BHT-aldéhyde hydroxylé (BHT-aldéhyde+O) (Figure 4.3). Le BHT-aldéhyde+O est métabolite du BHT nouvellement identifié dans le chapitre IV. Il possède la même formule et la même masse exacte que le BHT-acide. Grâce à leurs différents fragments caractéristiques en HRMS/MS et à l'utilisation des analogues deutérés nous avons pu élucider avec certitude leurs structures.

Trois adduits GSH du BHT ont été détectés (Figure 4.2), correspondant au BHT-2H+GSH, BHT+O-2H+GSH, et au DBP-2H+GSH. Leurs spectres HRMS/MS étaient dominés par des fragments caractéristiques de la fraction GSH et ils n'ont pas permis l'élucidation de leurs structures. Ces deux premiers adduits GSH peuvent résulter de la formation de l'intermédiaire quinone-méthide, suivie par l'addition de GSH sur le carbone méthylène. Cette hypothèse est soutenue par les résultats d'incubations des analogues deutérés du BHT. Pour le métabolite DBP-2H+GSH, la structure où le groupement SG remplace le groupe méthyle a été proposée (Figure 4.3). La formation

de ce métabolite s'explique par une voie radicalaire, initiée par la décarboxylation de BHT acide pour former le DBP[•], suivie par le piégeage avec GSH.

Plusieurs conjugués glucuroniques ont été détectés, notamment l'hydroxy-BHT glucuronide (BHT + O + gluc), le BHT-acide glucuronide (BHT-acide + gluc), le DBP glucuronide (DBP + gluc) et le BHQ glucuronide (BHQ + gluc). Le seul métabolite sulfaté détecté a pu être attribué à la BHQ+SO₃ qui a été confirmée par son spectre HRMS/MS. Ce métabolite n'avait pas été signalé auparavant. Aucun conjugué glucuronique ou sulfaté direct de BHT n'a été détecté, et ce, malgré la présence d'un groupement hydroxyle dans la structure. Cette information est très utile pour toutes les études *in vivo* réalisées par clivage enzymatique par β-glucuronidase ou sulfatase pour la détection des métabolites du BHT dans des matrices biologiques, telles que l'urine. Les métabolites de BHT détectés dans cette étude innovante peuvent servir de biomarqueurs pour de futures analyses de BHT dans des échantillons *in vivo* à la place de procédures génériques qui ne seront pas applicables au BHT(Canada, 2020; Cao, 2012).

6.4.3.2 Métabolisme des métabolites de BHT : DBP et BHT acide

Le métabolisme oxydatif du DBP et du BHT acide a également été étudié en utilisant leur standard respectif afin d'étayer la voie métabolique complexe proposée pour le BHT. Dans des conditions d'oxydation, le DBP a formé des métabolites oxydatifs non caractérisés auparavant, y compris un métabolite majeur hydroxylé au groupement t-butyle (DBP+O), ainsi que deux formes di-hydroxylées et un métabolite acide carboxylique (DBP+2O-2H).

Le standard BHT-acide a non seulement confirmé son identification, mais il a aussi permis de le distinguer du nouveau métabolite, le BHT-aldéhyde+O. Les incubations de BHT-acide ont montré que la formation de DBP et de BHQ était non enzymatique, et ont permis de caractériser un nouveau métabolite hydroxylé (BHT-acide+O). Le potentiel d'avoir certain métabolite comme standard nous a permis tout d'abord de

confirmer leur identification, mais aussi d'accéder à d'autres voies métaboliques qui peuvent être intéressantes pour les études de toxicité du BHT ou de ses analogues.

6.4.3.3 Métabolisme de BHA et TBHQ

Le BHA est un analogue du BHT et a été utilisé dans différentes industries, seul ou en combinaison avec le BHT et d'autres antioxydants. Le TBHQ est un métabolite du BHA par O-déméthylation et également un puissant antioxydant phénolique synthétique couramment utilisé. Le BHA et le TBHQ sont également des xénobiotiques intéressants pour l'étude du métabolisme étant donné l'absence de réglementation sur leur utilisation et les données manquantes sur leur exposition. Ces deux analogues ont été incubés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le BHT. Le tableau 4.3 résume les résultats de LC-HRMS/MS pour tous leurs métabolites détectés. BHA a produit des métabolites oxydatifs (un dimère et deux isomères de +O) contrairement au TBHQ. Ceci a été expliqué par la préférence du TBHQ à former un métabolite réactif, tel que la quinone.

Des adduits GSH identiques ont été détectés pour le BHA et le TBHQ, soit deux isomères de TBHQ-2H+GSH, TBHQ-4H+GSH, ainsi qu'un adduit de di-glutathion (TBHQ-4H+2GSH). De plus, deux nouveaux adduits GSH de BHA ont été détectés pour la première fois, le BHA-2H+GSH et le BHA+O-2H+GSH (Figure 4.6). Le premier se forme via un époxyde, suivi d'un ajout de GSH et de la perte d'une molécule d'eau, tandis que le second est formé via le métabolite réactif *ortho*-quinone.

La principale voie métabolique du BHA serait la conjugaison du groupe hydroxyle libre avec l'acide glucuronique et le sulfate. Quatre conjugués glucuroniques de BHA ont été détectés, le TBHQ+gluc, le BHA+gluc, et deux isomères de BHA+O + gluc. Ces deux derniers sont des nouveaux métabolites qui n'ont pas encore été caractérisés. Le TBHQ a formé seulement le même conjugué glucuronique que le BHA (TBHQ+gluc). Plusieurs conjugués sulfatés ont été détectés pour le BHA, y compris deux isomères correspondant à BHA+SO₃, BHA+O+SO₃ et un conjugué sulfate

commun entre le BHA et le TBHQ (TBHQ + SO₃). Bien que le BHA et le TBHQ soient des analogues du BHT, ils présentent un métabolisme très différent. La structure unique du BHT rend son métabolisme beaucoup plus compliqué. Cependant, le BHA et le TBHQ ont également formé des métabolites réactifs qui sont d'une grande importance pour l'évaluation de la sécurité de ces xénobiotiques. D'autres études doivent être effectuées pour mieux comprendre leur toxicité suite à leur utilisation à la place ou en combinaison avec le BHT ou d'autres antioxydants synthétiques.

6.4.3.4 Métabolisme des esters gallates

L'acide gallique et ses analogues (EG, PG, BG, OG et LG) sont utilisés comme de puissants antioxydants dans diverses applications. Cependant, leur métabolisme n'a pas été étudié de manière approfondie jusqu'à présent. Dans le chapitre V, nous avons étudié le métabolisme *in vitro* de cette famille de xénobiotiques qui est caractérisée par une large gamme de polarité. L'acide gallique étant trop polaire, le gradient LC a dû être optimisé pour pouvoir détecter ses métabolites les plus polaires. D'autre part, le gallate de lauryle étant très apolaire, il a été nécessaire de maintenir le gradient à un pourcentage organique élevé pendant 3 minutes supplémentaires afin de le détecter, lui et ses métabolites méthylés encore plus apolaires.

Suite à l'incubation de ces antioxydants avec des HLM, les esters de gallates les plus hydrophobes (BG, OG et LG) ont formé des métabolites oxydatifs, contrairement à EG et PG (Tableau 5.2). L'oxydation se produisant dans la chaîne latérale alkyle. OG et LG peuvent ensuite s'oxyder en aldéhyde et en acides carboxyliques correspondants. Cette dernière est une réaction courante lors de la biotransformation des xénobiotiques catalysée par les CYP450 (Guengerich et Munro, 2013).

La méthylation se retrouve parmi les voies métaboliques spécifiques à cette famille d'antioxydants. Elle se produit sur les groupements hydroxyles de la partie galloyle, catalysée par la COMT. Tous les esters gallates synthétiques étudiés au chapitre V ont formé deux isomères de métabolites mono-méthylés. Pour l'acide gallique, un

métabolite di-méthylé a été détecté. Pour le BG et l'OG, un métabolite méthylé oxydé (+O+CH₂) a également été formé.

Tous les esters gallates ont également formé plusieurs adduits GSH, en plus de différentes combinaisons d'oxydation et de méthylation. Ces gallates synthétiques ont produit des adduits GSH méthylés qui n'ont jamais été reportés auparavant. De plus, l'OG et le LG ont produit des adduits GSH hydroxylés (+O-2H+GSH). Des adduits de di-glutathion ont également été observés pour PG et BG. Plusieurs nouveaux métabolites, issus de ces antioxydants synthétiques très peu étudiés, ont été décrits pour la première fois dans le chapitre V. L'absence d'études sur le métabolisme et la toxicité de ce type de xénobiotiques rend leur utilisation non réglementée dans les produits de consommation très dangereuse et des études supplémentaires sont nécessaires.

6.4.4 Métabolisme *in vitro* des catéchines du thé vert

Malgré leurs nombreux effets bénéfiques, les données disponibles sur la biotransformation des catéchines du thé sont limitées et les études se sont principalement concentrées sur l'EGCG ou certains de ses analogues. Les principales réactions de biotransformation décrites dans la littérature pour les catéchines du thé sont la méthylation, la glucuronidation et la sulfatation. Cependant, la formation de métabolites réactifs des catéchines du thé via la détection des conjugués du glutathion n'a pas été étudiée de manière approfondie.

Le métabolisme de huit catéchines du thé vert (Figure 5.1) a été étudié par LC-HRMS/MS en utilisant des incubations de microsomes de foie humain pour former des métabolites oxydés et méthylés, en plus des conjugués au glutathion. Cette étude a permis aussi de comparer l'effet des différences structurelles subtiles de ces analogues sur le métabolisme. Une seule méthode chromatographique a été mise au point pour l'analyse de tous les composés parents et de leurs nombreux produits de biotransformation. La spectrométrie de masse en tandem à haute résolution a permis d'effectuer des mesures de masse précises pour élucider leurs structures (tableau 5.3).

Cette nouvelle méthode chromatographique a permis une bonne séparation entre toutes les catéchines, y compris les espèces épimériques (Figure 5.2), avec une résolution accrue et des temps d'analyse plus courts que ceux rapportés précédemment. L'optimisation de la méthode analytique était d'une grande importance pour différencier les analogues de l'EGCG et pour bien les séparer, d'autant plus que les épimères présentaient une fragmentation MS très similaire. De plus, le HRMS/MS a été utilisé pour différencier de nombreuses structures isomériques des métabolites (Figures 5.5 et 5.6). Cette stratégie a permis de caractériser plusieurs nouveaux métabolites des catéchines du thé vert pour la première fois dans le chapitre V.

Dans des conditions d'oxydation *in vitro*, l'EGCG et ses analogues n'ont pas formé de métabolites hydroxylés. Cela a été expliqué par leurs structures déjà hautement hydroxylées. Bien que la méthylation soit la principale voie métabolique de ces antioxydants naturels, il existe des opinions contradictoires dans la littérature sur le rôle de la méthylation. Certains considèrent que la méthylation peut diminuer leurs bioactivités, tandis que d'autres affirment que la méthylation améliore l'efficacité des catéchines du thé vert (Lu *et al.*, 2003; OKushio *et al.*, 1999b; Yang *et al.*, 2015). Lorsque la SAM a été ajoutée au mélange d'incubation, toutes les catéchines ont formé des métabolites mono et di-méthylés (Tableau 5.1). Compte tenu de cette contradiction dans la littérature et la formation de ces métabolites *in vitro* et *in vivo*, l'effet de la méthylation sur ces molécules nécessite une étude plus approfondie. En présence de NADPH et de GSH, les formes quinones réactives des catéchines peuvent réagir avec le glutathion. La formation de tels adduits élimine les métabolites réactifs potentiellement toxiques et réduit leur potentiel de liaison aux macromolécules cellulaires dans l'organisme. On a prouvé que le GSH se lie à l'EGCG et à ses analogues dans les cycles aromatiques B ou D (Figure 5.6). Jusqu'à présent, il a été difficile de comprendre si les nombreuses bioactivités des catéchines du thé vert sont dues à leur activité antioxydante ou à leurs interactions avec des cibles moléculaires spécifiques. Lorsque la SAM et le GSH ont été ajoutés aux incubations, des adduits mono GSH

méthylés ont été formés et caractérisés pour la première fois dans cette étude (Tableau 5.1). La capacité des catéchines du thé à s'oxyder est annulée par la méthylation médiée par la COMT en raison du masquage de la fonction catéchol. Cependant, la conjugaison des quinones avec le GSH n'élimine pas leur réactivité à la COMT. Ceci explique également pourquoi les métabolites diméthylés ne sont plus détectés dans ces conditions. La compétition entre la *O*-méthylation et l'oxydation couplée à la conjugaison du GSH des catéchines du thé vert peut avoir des implications intéressantes *in vivo*. Par conséquent, la caractérisation de cette nouvelle voie de biotransformation et ces nouveaux métabolites était importante. Une fois ces métabolites caractérisés par notre stratégie développée dans le Chapitre V, d'autres études supplémentaires peuvent examiner leurs propriétés bioactives individuelles ou leurs implications toxicologiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'exposition aux xénobiotiques, en particulier à des doses élevées ou répétées, peut avoir des effets néfastes sur les systèmes biologiques selon différents mécanismes. Les changements dans les systèmes métaboliques, y compris la formation de métabolites réactifs et la perturbation du métabolisme endogène sont les causes principales de la toxicité induite par ces molécules. Le dépistage non ciblé des xénobiotiques et de leurs métabolites permet de mieux caractériser leur mécanisme d'action. Dans le cadre de cette étude, de nouvelles stratégies de dépistage non ciblées ont été développées pour étudier le métabolisme *in vitro* des xénobiotiques par la spectrométrie de masse en tandem à haute résolution. Dans un premier temps, la formation *in vitro* des métabolites de phase I et II incluant les métabolites réactifs de 24 xénobiotiques de différentes familles a été investiguée. De nombreux métabolites oxydatifs et méthylés, des adduits GSH, des conjugués glucuroniques et sulfatés ont été identifiés, dont plusieurs n'ont jamais été reportés auparavant. De plus, l'optimisation de l'étape de préparation des échantillons et des méthodes de séparation a été réalisée selon la nature des xénobiotiques étudiés. Elle comprenait notamment la concentration des analytes et des cofacteurs (NADPH, GSH, UDPGA, PAPS, SAM), les conditions d'incubation des échantillons, la colonne chromatographique, le gradient d'éluion, le débit, la nature et les additifs des phases mobiles, etc. L'utilisation d'un spectromètre de masse hybride quadripolaire-temps de vol a offert une grande sensibilité, une grande rapidité d'exécution et un pouvoir de résolution élevé pour la détection et l'analyse structurale des métabolites formés dans les incubations. L'optimisation des méthodes MS (mode d'ionisation, CE, mode d'acquisition, paramètres de la source, etc.) a montré son efficacité pour obtenir des spectres MS/MS de tous les métabolites détectés avec une bonne qualité et une précision de masse parfaite. Cette stratégie a permis alors d'identifier 221 métabolites en totale dont 13 pour le BPA (Chapitre II), 53 pour les analogues de BPA (Chapitre III), 16 pour le BHT et 23 pour ses analogues (Chapitre

IV) ainsi que 116 métabolites pour les catéchines de thé vert et les esters gallates (Chapitre V). L'utilisation des analogues deutérés de certains xénobiotiques étudiés a permis d'élucider la structure et de confirmer la régiochimie des métabolites connus et nouvellement identifiés. Enfin, des logiciels tels que MetabolitePilot™ ont été utilisés pour accélérer les études de métabolisme, qui permettent l'identification automatisée des métabolites à partir d'informations telles que la formule du composé parent et de plusieurs critères de décision (masse exacte, seuils de détection des pics ou de qualité du spectre). Le logiciel PeakView a permis aussi d'approfondir la recherche manuelle et la filtration des données afin d'identifier les métabolites formés et de présenter leurs chromatogrammes, leurs spectres MS et leurs spectres MS/MS.

La méthode développée pour l'analyse de BPA et ses analogues BPF, BPAF, BPS, CUMY et TMBPF (Chapitres II et III) a montré son efficacité pour l'analyse du métabolisme *in vitro* de ces molécules. Le but ultime était de développer une seule méthode qui permettra d'étudier le métabolisme de tous les analogues de BPA et de toute la famille de bisphénols. Nous travaillons actuellement à tester notre approche sur d'autres types d'analogues de BPA comme le BPB, le BPAP et le TBBPA (Figure 1.5) afin de vérifier s'ils suivent aussi les mêmes réactions de biotransformations que celles du BPA. Le métabolisme oxydatif, les conjugués glucuronique et sulfatés ainsi que les métabolites réactifs de ces trois analogues ont été étudiés en utilisant des fractions hépatiques de foie de rat et humain (HLM, RLM, HS9 et RS9). La même méthode LC-MS/MS décrite dans les chapitres II et III a été utilisée pour l'analyse de ces échantillons. Encore une fois, grâce au même flux de travail optimisé, plusieurs métabolites *in vitro* de BPB, BPAP et TBBPA ont été détectés. De plus, leurs structures, dont plusieurs n'ont jamais été rapportés auparavant, ont été élucidées. Ceci confirme que la méthode présentée dans les chapitres II et III peut être appliquée aussi sur d'autres analogues de BPA.

Afin d'élargir le champ d'application de notre méthode bioanalytique à l'étude de métabolisme d'autres xénobiotiques tels que les médicaments, les pesticides ou d'autres produits de soins personnels sont aussi en cours d'investigation.

Le but d'étudier le métabolisme d'un grand nombre de xénobiotiques est de refléter notre exposome complexe. Notre exposition non pas seulement à la molécule parente, mais aussi à ses métabolites est très important, car dans certains cas les métabolites peuvent être plus nocifs. Malheureusement les techniques développées par les organismes qui rédigent les réglementations comme Santé Canada ou la FDA ne prennent pas en compte l'effet du métabolisme sur la toxicité de la molécule. Leur technique utilise une hydrolyse enzymatique (β glucuronidase ou sulfatase) de l'échantillon d'urine suivi d'une dérivatisation chimique et d'une analyse ciblée de produit de clivage par MRM (multiple reaction monitoring) sur un système GC/MS. Cette technique ne prend pas en compte la possibilité de formation des métabolites réactifs ou la formation de métabolites avec une combinaison de réactions de biotransformation (+O+gluc). Elle ne reflète donc pas la réalité de l'exposition aux xénobiotiques.

Afin d'analyser l'exposition humaine à des xénobiotiques, il faut tout d'abord identifier tous leurs produits de biotransformation *in vitro*. La caractérisation des métabolites *in vitro* permettra par la suite de développer une liste des métabolites oxydatifs, des conjugués glucuroniques et sulfatés ainsi que des adduits GSH et NAC issus de tous les xénobiotiques étudiés. Une base de données interne est en cours d'élaboration à l'aide du logiciel Sciex OS. Elle contient les spectres MS/MS des tous les xénobiotiques et leurs métabolites détectés qui seront acquis avec une bonne qualité (score > 80). Elle pourra donc être utilisée pour le dépistage efficace des échantillons biologiques tel que l'urine afin de déterminer l'exposition à ces xénobiotiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmad H, Sharma R, Mansour A et Awasthi YC (1992) t-butylated hydroxytoluene enhances intracellular levels of glutathione and related enzymes of rat lens in vitro organ culture. *Experimental Eye Research* 54: 41-48.
- Almeida ES, Portela FM, Sousa RM, Daniel D, Terrones MG, Richter EM et Muñoz RA (2011) Behaviour of the antioxidant tert-butylhydroquinone on the storage stability and corrosive character of biodiesel. *Fuel* 90: 3480-3484.
- Anari MR et Baillie TA (2005) Bridging cheminformatic metabolite prediction and tandem mass spectrometry. *Drug discovery today* 10: 711-717.
- Ansar S et Iqbal M (2016) Antioxidant and nephroprotective potential of butylated hydroxyanisole against ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress and early tumor events. *Human and Experimental Toxicology* 35: 448-453.
- ANSES (2017) Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des substances inscrites au programme de travail 2016 de l'Agence dans le cadre de la Stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens (SNPE) *Avis de l'Anses Saisines n° 2017-SA-0117 et 2017-SA-0187*
- Armstrong KE et Wattenberg LW (1985) Metabolism of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole to 3-tert-butyl-4,5-dihydroxyanisole by rat liver microsomes. *Cancer research* 45: 1507-1510.
- Asha S et Vidyavathi M (2010) Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs—a review. *Applied biochemistry and biotechnology* 160: 1699-1722.
- Banerjee S et Mazumdar S (2012) Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International journal of analytical chemistry* 2012:
- Barroso JB, Peragón J, García-Salguero L, de la Higuera M et Lupiáñez JA (1999) Variations in the kinetic behaviour of the NADPH-production systems in different tissues of the

trout when fed on an amino-acid-based diet at different frequencies. *International Journal of biochemistry & Cell Biology* 31: 277-290.

Basati G, Ghanadi P et Abbaszadeh S (2020) A review of the most important natural antioxidants and effective medicinal plants in traditional medicine on prostate cancer and its disorders. *Journal of Herbmed Pharmacology* 9: 112-120.

Binetti R, Costamagna FM et Marcello I (2008) Exponential growth of new chemicals and evolution of information relevant to risk control. *Annali-Istituto Superiore di Sanità* 44: 13.

Bojić M, Sedgeman CA, Nagy LD et Guengerich FP (2015) Aromatic hydroxylation of salicylic acid and aspirin by human cytochromes P450. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 73: 49-56.

Bolton JL, Acay NM et Vukomanovic V (1994) Evidence that 4-allyl-o-quinones spontaneously rearrange to their more electrophilic quinone methides: potential bioactivation mechanism for the hepatocarcinogen safrole. *Chemical research in toxicology* 7: 443-450.

Botterweck AA, Verhagen H, Goldbohm RA, Kleinjans J et van den Brandt PA (2000) Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food and Chemical Toxicology* 38: 599-605.

Brewer M (2011) Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10: 221-247.

Butterworth M, Lau SS et Monks TJ (1996) 17 β -Estradiol metabolism by hamster hepatic microsomes: comparison of catechol estrogen O-methylation with catechol estrogen oxidation and glutathione conjugation. *Chemical research in toxicology* 9: 793-799.

- Byrns G (2001) The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plants. *Water Research* 35: 2523-2533.
- Cabaton N, Zalko D, Rathahao E, Canlet C, Delous G, Chagnon MC, Cravedi JP et Perdu E (2008) Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions. *Toxicology in Vitro* 22: 1697-1704.
- Cadogan DF et Howick CJ (2000) Plasticizers. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*
- (2020) Dans Health Canada. 2020. List of permitted preservatives. Accès aout 2020. Récupéré de <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/lists-permitted/11-preservatives.html#a4>
- Cao XL (2012) A review recent development on analytical methods for determination of bisphenol a in food and biological samples. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 35: 2795-2829.
- Carocho M, Barreiro MF, Morales P et Ferreira IC (2014) Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 13: 377-399.
- Carocho M et Ferreira IC (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology* 51: 15-25.
- Castro G, Rodriguez I, Ramil M et Cela R (2019) Direct analysis in real time accurate mass spectrometry determination of bisphenol A in thermal printing paper. *Talanta* 205: 120086.
- Cech NB et Enke CG (2001) Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* 20: 362-387.
- Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z et Mazzeo JR (2007) Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B* 852: 22-34.

- Chaudhuri B et Sharma MM (1991) Alkylation of phenol with alpha-methylstyrene, propylene, butenes, isoamylene, 1-octene, and diisobutylene: heterogeneous vs. homogeneous catalysts. *Industrial and Engineering Chemistry* 30: 227-231.
- Chelcheleh M et Allameh A (1995) In vivo biotransformation of aflatoxin B1 and its interaction with cellular macromolecules in neonatal rats. *Mechanisms of Ageing and Development* 78: 189-196.
- Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng Y-L, Wu Y et Widelka M (2016) Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity a review. *Environ Sci Technol* 50: 5438-5453.
- Chen K, Xiang Y, Yan X, Li Z, Qin R et Sun J (2022) Global Tracking of Transformation Products of Environmental Contaminants by 2H-Labeled Stable Isotope-Assisted Metabolomics. *Analytical Chemistry*
- Chernushevich IV, Loboda AV et Thomson BA (2001) An introduction to quadrupole time of flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 36: 849-865.
- Choe S et Yang K (1982) Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean Journal of Food And Nutrition* 14: 283-288.
- Chokkathukalam A, Kim D-H, Barrett MP, Breitling R et Creek DJ (2014) Stable isotope-labeling studies in metabolomics: new insights into structure and dynamics of metabolic networks. *Bioanalysis* 6: 511-524.
- Conning DM et Phillips JC (1986) Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. *Food and Chemical Toxicology* 24: 1145-1148.
- Crespy V, Nancoz N, Oliveira M, Hau J, Courtet-Compondu M-C et Williamson G (2004) Glucuronidation of the green tea catechins,(-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-

epicatechin-3-gallate, by rat hepatic and intestinal microsomes. *Free Radical Research* 38: 1025-1031.

Croom E (2012) Metabolism of xenobiotics of human environments. *Progress in molecular biology and translational science* 112: 31-88.

Crump D, Sharin T, Chiu S et O'Brien JM (2021) In vitro screening of 21 Bisphenol A replacement alternatives: compared with bisphenol A, the majority of alternatives are more cytotoxic and dysregulate more genes in avian hepatocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 40: 2024-2031.

De Hoffmann E et Stroobant V (2007) *Mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons,

de Lima Cherubim DJ, Buzanello Martins CV, Oliveira Fariña L et da Silva de Lucca RA (2020) Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of cosmetic dermatology* 19: 33-37.

Dearden JC (2003) In silico prediction of drug toxicity. *Journal of computer-aided molecular design* 17: 119-127.

Dekant W (2009) The role of biotransformation and bioactivation in toxicity. *Molecular, clinical and environmental toxicology* 57-86.

den Braver-Sewradj SP, van Spronsen R et Hessel EVS (2020) Substitution of bisphenol A: a review of the carcinogenicity, reproductive toxicity, and endocrine disruption potential of alternative substances. *Critical Reviews in Toxicology* 1-20.

Dieckhaus CM, Fernandez-Metzler CL, King R, Krolikowski PH et Baillie TA (2005) Negative ion tandem mass spectrometry for the detection of glutathione conjugates. *Chemical research in toxicology* 18: 630-638.

Dodds EC et Lawson W (1936) Synthetic strogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137: 996-996.

- Dodds JN, Alexander NLM, Kirkwood KI, Foster MR, Hopkins ZR, Knappe DR et Baker ES (2020) From pesticides to per-and polyfluoroalkyl substances: an evaluation of recent targeted and untargeted mass spectrometry methods for xenobiotics. *Analytical chemistry* 93: 641-656.
- Du G-J, Zhang Z, Wen X-D, Yu C, Calway T, Yuan C-S et Wang C-Z (2012) Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients* 4: 1679-1691.
- Dufresne CJ et Farnworth ER (2001) A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry* 12: 404-421.
- Dybala-Defratyka A, Szatkowski L, Kaminski R, Wujec M, Siwek A et Paneth P (2008) Kinetic isotope effects on dehalogenations at an aromatic carbon. *Environmental science and technology* 42: 7744-7750.
- Eales J, Bethel A, Galloway T, Hopkinson P, Morrissey K, Short RE et Garside R (2022) Human health impacts of exposure to phthalate plasticizers: An overview of reviews. *Environment International* 158: 106903.
- Edmonds JS, Nomachi M, Terasaki M, Morita M, Skelton BW et White AH (2004) The reaction of bisphenol A 3,4-quinone with DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319: 556-561.
- El-Rashidy R et Niazi S (1983) A new metabolite of butylated hydroxyanisole in man. *Biopharmaceutics and drug disposition* 4: 389-396.
- European Commission (2011) Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Journal of the European Union* 12: 1-89.

- Evans DC, Watt AP, Nicoll-Griffith DA et Baillie TA (2004) Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chemical research in toxicology* 17: 3-16.
- Ferrer I et Thurman EM (2003) Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. *Trends in Analytical Chemistry* 22: 750-756.
- Fic A, Zegura B, Sollner Dolenc M, Filipic M et Peterlin Masic L (2013) Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 64: 189-200.
- Fiser B, Jójárt B, Csizmadia IG et Viskolcz B (2013) Glutathione–hydroxyl radical interaction: a theoretical study on radical recognition process. *PLoS one* 8: e73652.
- Floyd RA (1999) Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Experimental Biology and Medicine* 222: 236-245.
- Franklin MR et Yost GS (2000) Biotransformation: a balance between bioactivation and detoxification. *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications* 57-86.
- Fries E et Puttmann W (2002) Analysis of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) in water by means of solid phase extraction combined with GC/MS. *Water Research* 36: 2319-2327.
- Fujisawa S, Kadoma Y et Yokoe I (2004) Radical-scavenging activity of butylated hydroxytoluene (BHT) and its metabolites. *Chemistry and physics of lipids* 130: 189-195.
- Gabriel FL, Cyris M, Giger W et Kohler HP (2007) ipso-substitution: a general biochemical and biodegradation mechanism to cleave alpha-quaternary alkylphenols and bisphenol A. *Chemistry and Biodiversity* 4: 2123-2137.

- Gallart-Ayala H, Moyano E et Galceran MT (2011) Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 683: 227-233.
- Gan J, Harper TW, Hsueh M-M, Qu Q et Humphreys WG (2005) Dansyl glutathione as a trapping agent for the quantitative estimation and identification of reactive metabolites. *Chemical research in toxicology* 18: 896-903.
- Gerona RR, Woodruff TJ, Dickenson CA, Pan J, Schwartz JM, Sen S, Friesen MW, Fujimoto VY et Hunt PA (2013) Bisphenol-A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestation umbilical cord serum in a northern and central California population. *Environmental Science and Technology* 47: 12477-12485.
- Gharavi N, Haggarty S et El-Kadi AO (2007) Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Current drug metabolism* 8: 1-7.
- Gomez-Lechon M, Donato M, Castell J et Jover R (2003) Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Current drug metabolism* 4: 292-312.
- Goodman DL, McDonnell JT, Nelson HS, Vaughan TR et Weber RW (1990) Chronic urticaria exacerbated by the antioxidant food preservatives, butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 86: 570-575.
- Goossen LJ, Rodriguez N et Gooßen K (2008) Carboxylic acids as substrates in homogeneous catalysis. *Angewandte Chemie International Edition* 47: 3100-3120.
- Graaf Md, Boven E, Scheeren HW, Haisma HJ et Pinedo HM (2002) Beta-glucuronidase-mediated drug release. *Current pharmaceutical design* 8: 1391-1403.
- Guengerich FP (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology* 14: 611-650.

- Guengerich FP et Munro AW (2013) Unusual cytochrome p450 enzymes and reactions. *Journal of Biological Chemistry* 288: 17065-17073.
- Guesmi A, Ohlund L et Sleno L (2020) In vitro metabolism of sunscreen compounds by liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 34: e8679.
- Guesmi A et Sleno L (2020) In vitro metabolism of triclosan studied by liquid chromatography–high-resolution tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412: 335-342.
- Güngörmüş C et Kılıç A (2012) The safety assessment of food additives by reproductive and developmental toxicity studies. *Food Additive* 31-48.
- Guroff G, Renson J, Udenfriend S, Daly JW, Jerina DM et Witkop B (1967) Hydroxylation-Induced Migration: The NIH Shift: Recent experiments reveal an unexpected and general result of enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Science* 157: 1524-1530.
- Gys C, Kovacic A, Huber C, Lai FY, Heath E et Covaci A (2018) Suspect and untargeted screening of bisphenol S metabolites produced by in vitro human liver metabolism. *Toxicology Letters* 295: 115-123.
- Hanna PE et Anders M (2019) The mercapturic acid pathway. *Critical Reviews in Toxicology* 49: 819-929.
- Hano C et Tungmunnithum D (2020) Plant Polyphenols, More than Just Simple Natural Antioxidants: Oxidative Stress, Aging and Age-Related Diseases. *Medicines* 7: 26.
- Hasegawa H, Hirao S et Suzuki S (2016) Liquid Chromatography-mass Spectrometric Analysis of p-cumylphenol and Bisphenol A in Environmental Waters in Nagoya City. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 26: 21-26.

- Hassan ZK, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, ElAmin M, Daghestani MH et AlOlayan EM (2012) Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012:
- Hayes JD, Flanagan JU et Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45: 51-88.
- Hinson JA et Roberts DW (1992) Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: effects on proteins. *Annual review of pharmacology and toxicology* 32: 471-510.
- Ho CS, Lam C, Chan M, Cheung R, Law L, Lit L, Ng K, Suen M et Tai H (2003) Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews* 24: 3.
- Hoepner LA (2019) Bisphenol a: A narrative review of prenatal exposure effects on adipogenesis and childhood obesity via peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Environmental Research* 173: 54-68.
- Hrelia S et Angeloni C (2020) New mechanisms of action of natural antioxidants in health and disease. *Antioxidants* 9: 344.
- Hsiao JJ, Potter OG, Chu T-W et Yin H (2018) Improved LC/MS methods for the analysis of metal-sensitive analytes using medronic acid as a mobile phase additive. *Analytical chemistry* 90: 9457-9464.
- IARC (1986) Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation, Summary of Data Reported and Evaluation. *World Health Organization (WHO), International Agency for Research on Cancer (IARC) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 40: 123-206.
- Inoue H, Kemanai S, Sano C, Kato S, Yokota H et Iwano H (2016) Bisphenol A glucuronide/sulfate diconjugate in perfused liver of rats. *Journal of Veterinary Medical Science* 78: 733-737.

- Ito N, Fukushima S et Tsuda H (1985) Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Critical Reviews in Toxicology* 15: 109-150.
- Jaeg JP, Perdu E, Dolo L, Debrauwer L, Cravedi JP et Zalko D (2004) Characterization of new bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4935-4942.
- Jakoby WB (2012) *Metabolic basis of detoxication: metabolism of functional groups*. Elsevier,
- Jančová P et Šiller M (2012) Phase II drug metabolism. *Topics on drug metabolism* 35-60.
- Jhajra S, Prasad B, Shah J et Singh S (2014) High-resolution MS for drug metabolite identification. Dans. Future Science Ltd.
- Johnson AR et Carlson EE (2015) *Collision-induced dissociation mass spectrometry: a powerful tool for natural product structure elucidation*. ACS Publications,
- Kajimoto O, Kajimoto Y, Yabune M, Nakamura T, Kotani K, Suzuki Y, Nozawa A, Nagata K, Unno T et Sagesaka YM (2005) Tea catechins with a galloyl moiety reduce body weight and fat. *International Journal of Health Sciences* 51: 161-171.
- Kalgutkar AS et Soglia JR (2005) Minimising the potential for metabolic activation in drug discovery. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 1: 91-142.
- Khan I et Ahmad S (2020) The impact of natural antioxidants on human health. Dans *Functional Food Products and Sustainable Health*. Springer.
- Khanam S et Prakash A (2021) Promising Sources of Antioxidants from Herbs and Spices: A Review. *International Journal of Advanced Research* 4: 188–195.
- Kim JB, Jung JI et Han DH (2015) *Salivary bisphenol-A level detected by ELISA after restoration with resin-based dental sealant*. CRC Press/Balkema,

- Kind T et Fiehn O (2010) Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical reviews* 2: 23-60.
- Knolhoff AM, Callahan JH et Croley TR (2014) Mass accuracy and isotopic abundance measurements for HR-MS instrumentation: capabilities for non-targeted analyses. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 25: 1285-1294.
- Kostiainen R, Kotiaho T, Kuuranne T et Auriola S (2003) Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies. *Journal of Mass Spectrometry* 38: 357-372.
- Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, Gauthier BR, Lalonde K et Lalonde PJ (2009) Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 26: 928-937.
- Kupfer R, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM et Thompson JA (2002) Lung toxicity and tumor promotion by hydroxylated derivatives of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) and 2-tert-butyl-4-methyl-6-iso-propylphenol: correlation with quinone methide reactivity. *Chemical research in toxicology* 15: 1106-1112.
- Kusumawati I et Indrayanto G (2013) Natural antioxidants in cosmetics. *Studies in natural products chemistry* 40: 485-505.
- La Nasa J, Ghelardi E, Degano I, Modugno F et Colombini MP (2013) Core shell stationary phases for a novel separation of triglycerides in plant oils by high performance liquid chromatography with electrospray-quadrupole-time of flight mass spectrometer. *Journal of Chromatography A* 1308: 114-124.
- Lacorte S et Fernandez - Alba AR (2006) Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews* 25: 866-880.

- Lamb DC et Waterman MR (2013) Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368: 20120434.
- Lambert JD, Sang S et Yang CS (2007) Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Molecular Pharmaceutics* 4: 819-825.
- Lanigan RS et Yamarik TA (2002) Final report on the safety assessment of BHT(1). *International Journal of Toxicology* 21 Suppl 2: 19-94.
- Lee MS et Zhu M (2011) *Mass spectrometry in drug metabolism and disposition*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA
- Lee S, Suk K, Kim IK, Jang IS, Park JW, Johnson VJ, Kwon TK, Choi BJ et Kim SH (2008) Signaling pathways of bisphenol A induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: Role of calcium induced reactive oxygen species, mitogen activated protein kinases, and nuclear factor B. *Journal of neuroscience research* 86: 2932-2942.
- Li C, Cui X, Chen Y, Liao C et Ma LQ (2019) Synthetic phenolic antioxidants and their major metabolites in human fingernail. *Environmental Research* 169: 308-314.
- Li D-K, Miao M, Zhou Z, Wu C, Shi H, Liu X, Wang S et Yuan W (2013a) Urine bisphenol-A level in relation to obesity and overweight in school-age children. *PloS one* 8: e65399.
- Li F, Gonzalez FJ et Ma X (2012) LC-MS-based metabolomics in profiling of drug metabolism and bioactivation. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2: 118-125.
- Li J, Pang SY, Zhou Y, Sun S, Wang L, Wang Z, Gao Y, Yang Y et Jiang J (2018) Transformation of bisphenol AF and bisphenol S by manganese dioxide and effect of iodide. *Water Research* 143: 47-55.
- Li M, Shen Y, Ling T, Ho C-T, Li D, Guo H et Xie Z (2021) Analysis of Differentiated Chemical Components between Zijuan Purple Tea and Yunkang Green Tea by UHPLC-Orbitrap-MS/MS Combined with Chemometrics. *Foods* 10: 1070.

- Li M, Yang Y, Yang Y, Yin J, Zhang J, Feng Y et Shao B (2013b) Biotransformation of bisphenol AF to its major glucuronide metabolite reduces estrogenic activity. *PLoS one* 8: e83170.
- Li X et Franke AA (2015) Improvement of bisphenol A quantitation from urine by LCMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407: 3869-3874.
- Liigand P, Kaupmees K, Haav K, Liigand J, Leito I, Girod M, Antoine R et Kruve A (2017) Think negative: finding the best electrospray ionization/MS mode for your analyte. *Analytical chemistry* 89: 5665-5668.
- Liu R et Mabury SA (2018) Synthetic phenolic antioxidants and transformation products in human sera from United States donors. *Environmental Science and Technology* 5: 419-423.
- Liu R et Mabury SA (2019) Synthetic Phenolic Antioxidants in Personal Care Products in Toronto, Canada: Occurrence, Human Exposure, and Discharge via Greywater. *Environmental Science and Technology* 53: 13440-13448.
- Lu H, Meng X et Yang CS (2003) Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metabolism and Disposition* 31: 572-579.
- Ma S, K Chowdhury S et B Alton K (2006) Application of mass spectrometry for metabolite identification. *Current drug metabolism* 7: 503-523.
- Ma S et Zhu M (2009) Recent advances in applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites. *Chemico-biological interactions* 179: 25-37.

- Madsen KG, Olsen J, Skonberg C, Hansen SH et Jurva U (2007) Development and evaluation of an electrochemical method for studying reactive phase-I metabolites: correlation to in vitro drug metabolism. *Chemical research in toxicology* 20: 821-831.
- Maeda-Yamamoto M, Ema K, Monobe M, Tokuda Y et Tachibana H (2012) Epicatechin-3-O-(3 O-methyl)-gallate content in various tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) and its in vitro inhibitory effect on histamine release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 2165-2170.
- Maeda-Yamamoto M, Ema K, Tokuda Y, Monobe M, Tachibana H, Sameshima Y et Kuriyama S (2011) Effect of green tea powder (*Camellia sinensis* L. cv. Benifuuki) particle size on O-methylated EGCG absorption in rats; The Kakegawa Study. *Cytotechnology* 63: 171-179.
- Matich EK, Soria NGC, Aga DS et Atilla-Gokcumen GE (2019) Applications of metabolomics in assessing ecological effects of emerging contaminants and pollutants on plants. *Journal of hazardous materials* 373: 527-535.
- Matuszczak E, Komarowska MD, Debek W et Hermanowicz A (2019) The Impact of Bisphenol A on Fertility, Reproductive System, and Development: A Review of the Literature. *International Journal of Endocrinology* 2019: 4068717.
- Mazur CS, Kenneke JF, Goldsmith M-R et Brown C (2009) Contrasting influence of NADPH and a NADPH-regenerating system on the metabolism of carbonyl-containing compounds in hepatic microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 37: 1801-1805.
- Mazur CS, Kenneke JF, Hess-Wilson JK et Lipscomb JC (2010) Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements. *Drug Metabolism and Disposition* 38: 2232-2238.
- McCormick JM, Paiva MS, Häggblom MM, Cooper KR et White LA (2010) Embryonic exposure to tetrabromobisphenol A and its metabolites, bisphenol A and tetrabromobisphenol A dimethyl ether disrupts normal zebrafish (*Danio rerio*)

development and matrix metalloproteinase expression. *Aquatic Toxicology* 100: 255-262.

Meng X, Lee M-J, Li C, Sheng S, Zhu N, Sang S, Ho C-T et Yang CS (2001) Formation and identification of 4O-methyl(-)-epigallocatechin in humans. *Drug Metabolism and Disposition* 29: 789-793.

Meng Z, Tian S, Yan J, Jia M, Yan S, Li R, Zhang R, Zhu W et Zhou Z (2019) Effects of perinatal exposure to BPA, BPF and BPAF on liver function in male mouse offspring involving in oxidative damage and metabolic disorder. *Environmental Pollution* 247: 935-943.

Michalowicz J (2014) Bisphenol A—sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37: 738-758.

Miketova P, Schram KH, Whitney J, Li M, Huang R, Kerns E, Valcic S, Timmermann BN, Rourick R et Klohr S (2000) Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea. *Journal of Mass Spectrometry* 35: 860-869.

Miller GW (2021) Exposome: a new field, a new journal. *Exposome 1*:

Mitterer-daltoé MB, J.; Lise, C.; Breda, L.; Casagrande, M.; Lima, V., (2021) Consumer awareness of food antioxidants. Synthetic vs. Natural. *Journal of Food Science and Technology* 41: 208-212.

Mokra K, Wozniak K, Bukowska B, Sicinska P et Michalowicz J (2018) Low-concentration exposure to BPA, BPF and BPAF induces oxidative DNA bases lesions in human peripheral blood mononuclear cells. *Chemosphere* 201: 119-126.

Moore RJ, Jackson KG et Minihane AM (2009) Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *British Journal of Nutrition* 102: 1790-1802.

- Mori T, Ishii T, Akagawa M, Nakamura Y et Nakayama T (2010) Covalent binding of tea catechins to protein thiols: the relationship between stability and electrophilic reactivity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74: 2451-2456.
- Mortishire Smith RJ, O'Connor D, Castro Perez JM et Kirby J (2005) Accelerated throughput metabolic route screening in early drug discovery using highresolution liquid chromatography/quadrupole time of flight mass spectrometry and automated data analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19: 2659-2670.
- Muobom SS, Umar A-MS, Soongseok Y et Brolin A-P (2020) A Review on Plasticizers and Eco-Friendly Bioplasticizers: Biomass Sources and Market. *International Journal of Engineering Research* 9: 1138-1144.
- Murtiastutik D, Prakoswa S, Rosita C, Tantular IS, Wibisono Y, Hidayati AN et Listiawan MY (2021) Epigallocatechingallate (EGCG) Antifungal Properties for Candida Isolates from HIV/AIDS Patients with Oral Candidiasis in Compare with Fluconazole. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology* 15:
- Mutlib AE (2008) Application of stable isotope-labeled compounds in metabolism and in metabolism-mediated toxicity studies. *Chemical research in toxicology* 21: 1672-1689.
- Muzolf-Panek M, Gliszczynska-Swiglo A, de Haan L, Aarts JM, Szymusiak H, Vervoort JM, Tyrakowska B et Rietjens IM (2008) Role of catechin quinones in the induction of EpRE-mediated gene expression. *Chemical research in toxicology* 21: 2352-2360.
- Nachman RM, Hartle JC, Lees PS et Groopman JD (2014) Early Life Metabolism of Bisphenol A: A Systematic Review of the Literature. *Current Environmental Health Reports* 1: 90-100.
- Nagai F, Ushiyama K et Kano I (1993) DNA cleavage by metabolites of butylated hydroxytoluene. *Archives of Toxicology* 67: 552-557.
- Nakagawa Y et Tayama S (1995) Cytotoxicity of propyl gallate and related compounds in rat hepatocytes. *Archives of Toxicology* 69: 204-208.

- Nakamura S, Tezuka Y, Ushiyama A, Kawashima C, Kitagawara Y, Takahashi K, Ohta S et Mashino T (2011) Ipso substitution of bisphenol A catalyzed by microsomal cytochrome P450 and enhancement of estrogenic activity. *Toxicology Letters* 203: 92-95.
- National Institute of Environmental Health Sciences N (2010) Bisphenol a (BPA). *National Toxicology Program*
- Negri A, Naponelli V, Rizzi F et Bettuzzi S (2018) Molecular targets of epigallocatechin—Gallate (EGCG): A special focus on signal transduction and cancer. *Nutrients* 10: 1936.
- Nes WD, Song Z, Dennis AL, Zhou W, Nam J et Miller MB (2003) Biosynthesis of phytosterols: kinetic mechanism for the enzymatic C-methylation of sterols. *Journal of Biological Chemistry* 278: 34505-34516.
- Nieva - Echevarría B, Manzanos MJ, Goicoechea E et Guillén MD (2015) 2, 6 Di tert butylhydroxytoluene and its metabolites in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 67-80.
- Nishikawa H, Wakano K et Kitani S (2007) Inhibition of NADPH oxidase subunits translocation by tea catechin EGCG in mast cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362: 504-509.
- Okushio K, Suzuki M, Matsumoto N, Nanjo F et Hara Y (1999a) Identification of (–)-epicatechin metabolites and their metabolic fate in the rat. *Drug Metabolism and Disposition* 27: 309-316.
- OKusHio K, Suzuki M, Matsumoto N, Nanjo F et HARA Y (1999b) Methylation of tea catechins by rat liver homogenates. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63: 430-432.
- Ortiz de Montellano PR (2010) Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews* 110: 932-948.

- Ousji O, Ohlund L et Sleno L (2020) Comprehensive In Vitro Metabolism Study of Bisphenol A Using Liquid Chromatography-High Resolution Tandem Mass Spectrometry. *Chemical research in toxicology* 33: 1468-1477.
- Park BK, Boobis A, Clarke S, Goldring CE, Jones D, Kenna JG, Lambert C, Lavery HG, Naisbitt DJ, Nelson S, et al. (2011) Managing the challenge of chemically reactive metabolites in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* 10: 292-306.
- Park J, Park R, Jang M et Park YI (2021) Therapeutic Potential of EGCG, a Green Tea Polyphenol, for Treatment of Coronavirus Diseases. *Life* 11: 197.
- Patra S, Rizzi F, Silva A, Rugina D et Bettuzzi S (2008) Molecular targets of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG): specificity and interaction with membrane lipid rafts. *Journal of Physiology and Pharmacology* 59: 217-235.
- Pednekar PP, Gajbhiye RK, Patil AD, Surve SV, Datar AG, Balsarkar GD, Chuahan AR et Vanage GR (2018) Estimation of plasma levels of bisphenol-a & phthalates in fertile & infertile women by gas chromatography-mass spectrometry. *Indian Journal of Medical Research* 148: 734-742.
- Pelch K, Wignall J, Goldstone A, Ross P, Blain R, Shapiro A, Holmgren S, Hsieh J, Svoboda D et Auerbach S (2017) NTP research report on biological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives.
- Perez-Torres I, Castrejon-Tellez V, Soto ME, Rubio-Ruiz ME, Manzano-Pech L et Guarner-Lans V (2021) Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *International journal of molecular sciences* 22: 1786.
- Peters MM, Lau SS, Dulik D, Murphy D, van Ommen B, van Bladeren PJ et Monks TJ (1996) Metabolism of tert-butylhydroquinone to S-substituted conjugates in the male Fischer 344 rat. *Chemical research in toxicology* 9: 133-139.
- Pichette V et Leblond FA (2003) Drug metabolism in chronic renal failure. *Current drug metabolism* 4: 91-103.

- Pivnenko K, Pedersen GA, Eriksson E et Astrup TF (2015) Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper. *Waste Management 44*: 39-47.
- Pleil JD et Isaacs KK (2016) High-resolution mass spectrometry: basic principles for using exact mass and mass defect for discovery analysis of organic molecules in blood, breath, urine and environmental media. *Journal of breath research 10*: 012001.
- Pokorný J (2007) Are natural antioxidants better—and safer—than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology 109*: 629-642.
- Polettini A (2006) *Applications of LC-MS in Toxicology*. Pharmaceutical Press,
- Pollard KM, Christy JM, Cauvi DM et Kono DH (2018) Environmental xenobiotic exposure and autoimmunity. *Current opinion in toxicology 10*: 15-22.
- Pont MM (2004) *Health-based reassessment of administrative occupational exposure limits: 2, 6-Di-tert-butyl-p-cresol (BHT/butylated hydroxytoluene)*.
- Pop A, Kiss B et Loghin F (2013) Endocrine disrupting effects of butylated hydroxyanisole (BHA-E320). *Clujul Medical 86*: 16-20.
- Powell C, Connelly J, Jones S, Grasso P et Bridges J (1986) Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat: their relevance to hepatocarcinogenicity. *Food and Chemical Toxicology 24*: 1131-1143.
- Pritchett JJ, Kuester RK et Sipes IG (2002) Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metabolism and Disposition 30*: 1180-1185.
- Pullen S, Boecker R et Tiegs G (2003) The flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrabromobisphenol A-bisallylether suppress the induction of interleukin-2 receptor α chain (CD25) in murine splenocytes. *Toxicology 184*: 11-22.

- Qiu SX, Yang RZ et Gross ML (2004) Synthesis and liquid chromatography/tandem mass spectrometric characterization of the adducts of bisphenol A o-quinone with glutathione and nucleotide monophosphates. *Chemical research in toxicology* 17: 1038-1046.
- Raffaelli A et Saba A (2003) Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 22: 318-331.
- Rha C-S, Choi Y-M, Kim J-C et Kim D-O (2021) Cost-Effective Simultaneous Separation and Quantification of Phenolics in Green and Processed Tea Using HPLC–UV–ESI Single-Quadrupole MS Detector and Python Script. *Separations* 8: 45.
- Rochester JR (2013) Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology* 42: 132-155.
- Rochester JR et Bolden AL (2015) Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environmental Health Perspectives* 123: 643-650.
- Rogers LD (2021) What Does CLARITY-BPA Mean for Canadians? *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18: 7001.
- Rojo D, Barbas C et Rupérez FJ (2012) LC–MS metabolomics of polar compounds. *Bioanalysis* 4: 1235-1243.
- Rosemond MJC, John-Williams LS, Yamaguchi T, Fujishita T et Walsh JS (2004) Enzymology of a carbonyl reduction clearance pathway for the HIV integrase inhibitor, S-1360: role of human liver cytosolic aldo-keto reductases. *Chemico-biological interactions* 147: 129-139.
- Rouessac F, Rouessac A et Cruch D (2004) *Analyse chimique*. Dunod,
- Rousu T, Pelkonen O et Tolonen A (2009) Rapid detection and characterization of reactive drug metabolites in vitro using several isotope labeled trapping agents and

ultraperformance liquid chromatography/time of flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23: 843-855.

Saad B, Sing YY, Nawi MA, Hashim N, Ali ASM, Saleh MI, Sulaiman SF, Talib KM et Ahmad K (2007) Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. *Food Chemistry* 105: 389-394.

Sadler JC, Humphreys LD, Snajdrova R et Burley GA (2017) A Tandem Enzymatic sp² C Methylation Process: Coupling in Situ SAdenosylMethionine Formation with Methyl Transfer. *Chem Bio Chem* 18: 992-995.

Sajiki J, Takahashi K et Yonekubo J (1999) Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 736: 255-261.

Sang S, Lambert JD, Hong J, Tian S, Lee M-J, Stark RE, Ho C-T et Yang CS (2005) Synthesis and structure identification of thiol conjugates of (-)-epigallocatechin gallate and their urinary levels in mice. *Chemical research in toxicology* 18: 1762-1769.

Schmidt J, Kotnik P, Trontelj J, Knez Z et Masic LP (2013a) Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicol In Vitro* 27: 1267-1276.

Schmidt J, Kotnik P, Trontelj J, Knez Z et Masic LP (2013b) Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicology in Vitro* 27: 1267-1276.

Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M et Chahoud I (2002) Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives* 110: A703-707.

Secretan P-H, Thirion O, Sadou Yayé H, Damy T, Astier A, Paul M et Do B (2021) Simple Approach to Enhance Green Tea Epigallocatechin Gallate Stability in Aqueous

Solutions and Bioavailability: Experimental and Theoretical Characterizations. *Pharmaceuticals* 14: 1242.

Serra H, Beausoleil C, Habert R, Minier C, Picard-Hagen N et Michel C (2019) Evidence for bisphenol B endocrine properties: scientific and regulatory perspectives. *Environmental health perspectives* 127: 106001.

Sgaragli G, Corte LD, Puliti R, De Sarlo F, Francalanci R, Guarna A, Dolaro P et Komarynsky M (1980) Oxidation of 2-t-butyl-4-methoxyphenol (BHA) by horseradish and mammalian peroxidase systems. *Biochemical Pharmacology* 29: 763-769.

Shaw S (2010) Halogenated flame retardants: do the fire safety benefits justify the risks? *Reviews on environmental health* 25: 261-306.

Shi J, Jiao Z, Zheng S, Li M, Zhang J, Feng Y, Yin J et Shao B (2015) Long-term effects of bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (*Danio rerio*), and the impact on offspring. *Chemosphere* 128: 252-257.

Sicard AA, Suarez NG, Cappadocia L et Annabi B (2021) Functional targeting of the TGF-betaR1 kinase domain and downstream signaling: A role for the galloyl moiety of green tea-derived catechins in ES-2 ovarian clear cell carcinoma. *Journal of Nutritional Biochemistry* 87: 108518.

Šilarová P, Česlová L et Meloun M (2017) Fast gradient HPLC/MS separation of phenolics in green tea to monitor their degradation. *Food Chemistry* 237: 471-480.

Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R et Dhaka N (2013) Potential applications of antioxidants—A review. *Journal of Pharmacy Research* 7: 828-835.

Singh B, Mense SM, Remotti F, Liu X et Bhat HK (2009) Antioxidant butylated hydroxyanisole inhibits estrogen-induced breast carcinogenesis in female ACI rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 23: 202-211.

- Singh R, Silva Elipe MV, Pearson PG, Arison BH, Wong BK, White R, Yu X, Burgey CS, Lin JH et Baillie TA (2003) Metabolic activation of a pyrazinone-containing thrombin inhibitor. Evidence for novel biotransformation involving pyrazinone ring oxidation, rearrangement, and covalent binding to proteins. *Chemical research in toxicology* 16: 198-207.
- Siroux V, Agier L et Slama R (2016) The exposome concept: a challenge and a potential driver for environmental health research. *European Respiratory Review* 25: 124-129.
- Skarydova L, Tomanova R, Havlikova L, Stambergova H, Solich P et Wsol V (2013) Deeper insight into the reducing biotransformation of bupropion in the human liver. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* DMPK-13-RG-051.
- Skledar DG et Mašič LP (2016) Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environmental Toxicology and Pharmacology* 47: 182-199.
- Skledar DG, Schmidt J, Fic A, Klopčič I, Trontelj J, Dolenc MS, Finel M et Mašič LP (2016) Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S. *Chemosphere* 157: 152-159.
- Sleno L (2014) Applications of high-resolution mass spectrometry in drug discovery and development. Dans. *Future Medicine*.
- Smyth W (2003) Electrospray ionisation mass spectrometric behaviour of selected drugs and their metabolites. *Analytica chimica acta* 492: 1-16.
- Soto AM, Schaeberle C, Maier MS, Sonnenschein C et Maffini MV (2017) Evidence of absence: estrogenicity assessment of a new food-contact coating and the bisphenol used in its synthesis. *Environmental Science and Technology* 51: 1718-1726.
- Spławski J, Kuźniar J, Filipiak K et Zieliński W (2006) Evaluation of drug toxicity in clinical trials. *Science and Engineering Ethics* 12: 139-145.

- Stack DE, Conrad JA et Mahmud B (2018) Structural Identification and Kinetic Analysis of the in Vitro Products Formed by Reaction of Bisphenol A-3,4-quinone with N-Acetylcysteine and Glutathione. *Chemical research in toxicology* 31: 81-87.
- Steffen Y, Gruber C, Schewe T et Sies H (2008) Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 469: 209-219.
- Stepan AF, Walker DP, Bauman J, Price DA, Baillie TA, Kalgutkar AS et Aleo MD (2011) Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: a perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. *Chemical research in toxicology* 24: 1345-1410.
- Stowell CL, Barvian KK, Young PC, Bigsby RM, Verdugo DE, Bertozzi CR et Widlanski TS (2006) A role for sulfation-desulfation in the uptake of bisphenol a into breast tumor cells. *Chemistry and biology* 13: 891-897.
- Street CM, Zhu Z, Finel M et Court MH (2017) Bisphenol-A glucuronidation in human liver and breast: identification of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and influence of genetic polymorphisms. *Xenobiotica* 47: 1-10.
- Sugimoto K, Matsuoka Y, Sakai K, Fujiya N, Fujii H et Mano J (2021) Catechins in green tea powder (matcha) are heat-stable scavengers of acrolein, a lipid peroxide-derived reactive carbonyl species. *Food Chemistry* 355: 129403.
- Suh HJ, Chung MS, Cho YH, Kim JW, Kim DH, Han KW et Kim CJ (2005) Estimated daily intakes of butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) and tert-butyl hydroquinone (TBHQ) antioxidants in Korea. *Food Addit Contam* 22: 1176-1188.
- Sun F, Tan H, Li Y, De Boevre M, Zhang H, Zhou J, Li Y et Yang S (2021) An integrated data-dependent and data-independent acquisition method for hazardous compounds screening in foods using a single UHPLC-Q-Orbitrap run. *Journal of Hazardous Materials* 401: 123266.

- Sun J, Fang R, Wang H, Xu D-X, Yang J, Huang X, Cozzolino D, Fang M et Huang Y (2022) A review of environmental metabolism disrupting chemicals and effect biomarkers associating disease risks: Where exposomics meets metabolomics. *Environment International* 158: 106941.
- Sun N et Walch A (2013) Qualitative and quantitative mass spectrometry imaging of drugs and metabolites in tissue at therapeutic levels. *Histochemistry and Cell Biology* 140: 93-104.
- Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N et Nakashima K (2004) Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column - switching and fluorescence detection. *Biomedical Chromatography* 18: 501-507.
- Sun Z, Yang X, Liu QS, Li C, Zhou Q, Fiedler H, Liao C, Zhang J et Jiang G (2019) Butylated hydroxyanisole isomers induce distinct adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Journal of Hazardous Materials* 379: 120794.
- Suryadi H, Rasyid AH et Harmita (2018) Analysis of bisphenol a in indonesian canned food by gas chromatography. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 10: 19-23.
- Szafran AT, Stossi F, Mancini MG, Walker CL et Mancini MA (2017) Characterizing properties of non-estrogenic substituted bisphenol analogs using high throughput microscopy and image analysis. *PloS one* 12: e0180141.
- Tajima K, Yamamoto K et Mizutani T (1983) Identification and determination of glutathione and glucuronide conjugates formed from butylated hydroxytoluene in rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 31: 3671-3677.
- Takeuchi T et Tsutsumi O (2002) Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and biophysical research communications* 291: 76-78.

- Tan A et Fanaras JC (2019) Use of high - pH (basic/alkaline) mobile phases for LC–MS or LC–MS/MS bioanalysis. *Biomedical Chromatography* 33: e4409.
- Terasaki M, Shiraishi F, Nishikawa T, Edmonds JS, Morita M et Makino M (2005) Estrogenic activity of impurities in industrial grade bisphenol A. *Environmental Science and Technology* 39: 3703-3707.
- Testa B et Krämer S-D (2008) *The biochemistry of drug metabolism. 1, Principles, redox reactions, hydrolyses*. Helvetica Chimica Acta Wiley-VCH,
- Thoene M, Dzika E, Gonkowski S et Wojtkiewicz J (2020) Bisphenol S in food causes hormonal and obesogenic effects comparable to or worse than bisphenol A: a literature review. *Nutrients* 12: 532.
- Thompson JA, Malkinson AM, Wand MD, Mastovich SL, Mead EW, Schullek KM et Laudenschlager WG (1987) Oxidative metabolism of butylated hydroxytoluene by hepatic and pulmonary microsomes from rats and mice. *Drug Metabolism and Disposition* 15: 833-840.
- Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA et vom Saal FS (2005) Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 7014-7019.
- Tolonen A, Turpeinen M et Pelkonen O (2009) Liquid chromatography–mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening. *Drug discovery today* 14: 120-133.
- Tonoli D, Staub Spörri A, Blanco M, Jan P, Larcinese J-P, Schmidt-Millasson P, Ortelli D et Edder P (2020) Performance enhancement and sample throughput increase of a multiresidue pesticides method in fruits and vegetables using Data-Dependent MS acquisition. *Food Additives & Contaminants: Part A* 37: 110-120.

- Tortosa V, Pietropaolo V, Brandi V, Macari G, Pasquadibisceglie A et Polticelli F (2020) Computational Methods for the Identification of Molecular Targets of Toxic Food Additives. Butylated Hydroxytoluene as a Case Study. *Molecules* 25: 2229.
- Usman A et Ahmad M (2019) Computational study suggesting reconsideration of BPA analogues based on their endocrine disrupting potential estimated by binding affinities to nuclear receptors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 171: 154-161.
- Vaidyanathan JB et Walle T (2002) Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metabolism and Disposition* 30: 897-903.
- Vaistij FE, Lim E-K, Edwards R et Bowles DJ (2009) Glycosylation of secondary metabolites and xenobiotics. Dans *Plant-derived natural products*. Springer.
- van Esch GJ (1986) Toxicology of tert-butylhydroquinone (TBHQ). *Food and Chemical Toxicology* 24: 1063-1065.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N et Welshons WV (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24: 139-177.
- Velayutham P, Babu A et Liu D (2008) Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Current Medicinal Chemistry* 15: 1840.
- Viana da Silva M, Santos MRC, Alves Silva IR, Macedo Viana EB, Dos Anjos DA, Santos IA, Barbosa de Lima NG, Wobeto C, Jorge N et Lannes SCDS (2021) Synthetic and natural antioxidants used in the oxidative stability of edible oils: an overview. *Food Reviews International* 1: 1-24.
- Vinggaard AM, Niemela J, Wedebye EB et Jensen GE (2008) Screening of 397 chemicals and development of a quantitative structure--activity relationship model for androgen receptor antagonism. *Chemical research in toxicology* 21: 813-823.

- Vrbanac J et Slauter R (2017) ADME in drug discovery. Dans *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*. Elsevier.
- Vrijheid M (2014) The exposome: a new paradigm to study the impact of environment on health. *Thorax* 69: 876-878.
- Waidyanatha S, Mathews JM, Patel PR, Black SR, Snyder RW et Fennell TR (2015) Disposition of bisphenol AF, a bisphenol A analogue, in hepatocytes in vitro and in male and female Harlan Sprague-Dawley rats and B6C3F1/N mice following oral and intravenous administration. *Xenobiotica* 45: 811-819.
- Wang J, Yamamoto Y, Hirai H et Kawagishi H (2013) Dimerization of bisphenol A by hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 under ligninolytic condition. *Current Microbiology* 66: 544-547.
- Wang P, Aronson WJ, Huang M, Zhang Y, Lee R-P, Heber D et Henning SM (2010) Green tea polyphenols and metabolites in prostatectomy tissue: implications for cancer prevention. *Cancer Prevention Research* 3: 985-993.
- Wang W et Kannan K (2019) Quantitative identification of and exposure to synthetic phenolic antioxidants, including butylated hydroxytoluene, in urine. *Environment International* 128: 24-29.
- Wang X, Li C, Yun F, Jiang X et Yu L (2021a) Preparation and Evaluation of Gallate Ester Derivatives Used as Promising Antioxidant and Antibacterial Inhibitors. *Chemistry and Biodiversity* 18: e2000913.
- Wang Y-K, Li WQ, Xia S, Guo L, Miao Y et Zhang B-K (2021b) Metabolic activation of the toxic natural products from herbal and dietary supplements leading to toxicities. *Frontiers in pharmacology* 12:
- Weinshilboum R et Wang L (2006) Pharmacogenomics: bench to bedside. *Focus* 3: 739-441.

- Whalley PM, Bartels M, Bentley KS, Corvaro M, Funk D, Himmelstein MW, Neumann B, Strupp C, Zhang F et Mehta J (2017) An in vitro approach for comparative interspecies metabolism of agrochemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 88: 322-327.
- Wild CP (2005) Complementing the genome with an “exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 14: 1847-1850.
- Wolf VG, Bonacorsi C, Raddi MSG, da Fonseca LM et Ximenes VF (2017) Octyl gallate, a food additive with potential beneficial properties to treat *Helicobacter pylori* infection. *Food and Function* 8: 2500-2511.
- Wrighton SA, Ring BJ et Vandenbranden M (1995) The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies. *Toxicologic Pathology* 23: 199-208.
- Wu M et Brown AC (2021) Applications of Catechins in the Treatment of Bacterial Infections. *Pathogens* 10: 546.
- (2022) Dans drug hunter. Récupéré Avril 2022 de <https://drughunter.com/>
- Xiao X, Li J, Yu T, Zhou L, Fan X, Xiao H, Wang Y, Yang L, Lv J et Jia X (2018) Bisphenol AP is anti-estrogenic and may cause adverse effects at low doses relevant to human exposure. *Environmental Pollution* 242: 1625-1632.
- Xie C, Zhong D et Chen X (2013a) A fragmentation-based method for the differentiation of glutathione conjugates by high-resolution mass spectrometry with electrospray ionization. *Analytica Chimica Acta* 788: 89-98.
- Xie C, Zhong D et Chen X (2013b) A fragmentation-based method for the differentiation of glutathione conjugates by high-resolution mass spectrometry with electrospray ionization. *Analytica chimica acta* 788: 89-98.

- Xu D-P, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang J-J et Li H-B (2017) Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences* 18: 96.
- Yan Z, Maher N, Torres R et Huebert N (2007) Use of a trapping agent for simultaneous capturing and high-throughput screening of both “soft” and “hard” reactive metabolites. *Analytical chemistry* 79: 4206-4214.
- Yang Y, Hu C, Zhong H, Chen X, Chen R et Yam KL (2016) Effects of Ultraviolet (UV) on Degradation of Irgafos 168 and Migration of Its Degradation Products from Polypropylene Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 7866-7873.
- Yang Y, Qiao L, Zhang X, Wu Z et Weng P (2015) Effect of methylated tea catechins from Chinese oolong tea on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. *Fitoterapia* 104: 45-49.
- Ye X, Wong LY, Kramer J, Zhou X, Jia T et Calafat AM (2015) Urinary concentrations of bisphenol A and three other bisphenols in convenience samples of US adults during 2000–2014. *Environmental Science and Technology* 49: 11834-11839.
- Yoshihara S, Makishima M, Suzuki N et Ohta S (2001) Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. *Toxicological Sciences* 62: 221-227.
- Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S et Perdu E (2011) Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82: 424-430.
- Zhang H (2022) Regulatory expert corner global food contact regulation updates for 1st quarter 2022. *Journal of Plastic Film & Sheeting* 87560879221089428.
- Zhang L, Fang P, Yang L, Zhang J et Wang X (2013) Rapid method for the separation and recovery of endocrine-disrupting compound bisphenol AP from wastewater. *Langmuir* 29: 3968-3975.

- Zhang R, Li C, Li Y, Cui X et Ma LQ (2018) Determination of 2,6-di-tert-butylhydroxytoluene and its transformation products in indoor dust and sediment by gas chromatography-mass spectrometry coupled with precolumn derivatization. *Science of The Total Environment* 619-620: 552-558.
- Zhang R, Li J et Cui X (2020) Tissue distribution, excretion, and metabolism of 2, 6-di-tert-butylhydroxytoluene in mice. *Science of The Total Environment* 139862.
- Zhao H, Wei J, Xiang L et Cai Z (2018) Mass spectrometry investigation of DNA adduct formation from bisphenol A quinone metabolite and MCF-7 cell DNA. *Talanta* 182: 583-589.
- Zhao H, Xiang L, Li J, Yang Z, Fang J, Zhao C, Xu S et Cai Z (2016a) Investigation on fragmentation pathways of bisphenols by using electrospray ionization Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 30: 1901-1913.
- Zhao H, Xiang L, Li J, Yang Z, Fang J, Zhao C, Xu S et Cai Z (2016b) Investigation on fragmentation pathways of bisphenols by using electrospray ionization Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 30: 1901-1913.
- Zhao M-T, Liu Z-Y, Li A, Zhao G-H, Xie H-K, Zhou D-Y et Wang T (2021) Gallic acid and its alkyl esters emerge as effective antioxidants against lipid oxidation during hot air drying process of *Ostrea talienwhanensis*. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 139: 110551.
- Zhao Y, Jiang F, Liu P, Chen W et Yi K (2012) Catechins containing a galloyl moiety as potential anti-HIV-1 compounds. *Drug Discovery* 17: 630-635.
- Zheng J, Ma L, Xin B, Olah T, Humphreys WG et Zhu M (2007) Screening and identification of GSH-trapped reactive metabolites using hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Chemical research in toxicology* 20: 757-766.

- Zhu M, Ma L, Zhang H et Humphreys WG (2007) Detection and structural characterization of glutathione-trapped reactive metabolites using liquid chromatography– high-resolution mass spectrometry and mass defect filtering. *Analytical chemistry* 79: 8333-8341.
- Zhu M, Zhang D, Zhang H et Shyu WC (2009) Integrated strategies for assessment of metabolite exposure in humans during drug development: analytical challenges and clinical development considerations. *Biopharmaceutics and drug disposition* 30: 163-184.
- Zhu M, Zhang H et Humphreys WG (2011) Drug metabolite profiling and identification by high-resolution mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 286: 25419-25425.
- Zucca P, Neves CM, Simões MM, Neves MdGP, Cocco G et Sanjust E (2016) Immobilized lignin peroxidase-like metalloporphyrins as reusable catalysts in oxidative bleaching of industrial dyes. *Molecules* 21: 964.

