

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉTECTION DE LA DÉGRADATION DE MATÉRIAUX ORGANIQUES ET
BIOLOGIQUES. 1. QUANTIFICATION D'ÉLECTROPHILES LIPIDIQUES PAR
SONDE FLUORESCENTE. 2. DÉVELOPPEMENT D'INDICATEUR
COLORIMÉTRIQUE IRRÉVERSIBLE DE TEMPÉRATURE CRITIQUE.

MEMOIRE
PRESENTE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
ASMA BOUSHIH

OCTOBRE 2020

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce projet. Je voudrais dans un premier temps remercier, mon directeur de recherche Mr Mathieu Frenette, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses conseils pertinents qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Merci pour son encadrement, son soutien et la confiance qu'il m'a témoignée. Sa capacité d'analyse et son enthousiasme m'ont montré que le monde de la recherche pouvait être un univers passionnant.

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

Merci à mes collègues du labo Frenette qui ont participé à l'accomplissement de ce mémoire de près ou de loin : Ehsan Hosseinasab, Michel St-Vincent, Mélanie Sollin, Yohann gagné, Taylor Hope, Antoine Juneau, Samuel Parent-Vézina et Alex Benoit.

Un gros Merci à mes parents et mon frère qui m'ont toujours encouragé et m'ont accompagné tout au long de mon cheminement.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xv
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	xvii
RÉSUMÉ.....	xviii
PARTIE A. QUANTIFICATION D'ÉLECTROPHILES PAR SONDE FLUORESCENTE DANS LES HUILES DE CUISSON	1
1. INTRODUCTION	1
1.1 Mise en contexte.....	1
1.2 Composition de lipides	4
1.2.1 Auto-oxydation des acides gras.....	5
1.2.2 Les électrophiles cétone-alpha-beta insaturé (accepteurs de Michael).....	7
1.3 Aspects théoriques des méthodes expérimentales	9
1.3.1 Spectroscopie d'absorption UV-Vis	9
1.3.2 Processus des états excités	11
1.3.3 Principe de fluorescence	13
1.3.4 Notion de fluorochrome	14
1.4 Sonde fluorescente et transfert d'électrons	16
1.4.1 Exemples de sondes fluorescentes.....	16
1.4.2 Sonde pré-fluorescente par modification des états excités	18
1.4.3 Sonde pré-fluorescente par modification chimique du fluorochrome	19
1.5 Notions de fluorescence des coumarines	22
1.5.1 Objectif de la recherche	25

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	27
2.1 Matériels utilisés.....	27
2.1.1 Le 7-mercapto-4-méthylcoumarine (C-SH).....	27
2.1.2 Purification du 7-mercapto-4-méthylcoumarine.....	28
2.1.3 Choix de l'électrophile étalon	29
2.1.4 Choix du solvant.....	30
2.1.5 Choix du catalyseur	31
2.2 Méthodes	32
2.2.1 Optimisation de la longueur d'onde	32
2.2.2 Extraction des huiles à partir des croustilles	32
2.2.3 Indice d'électrophilicité dans les patates frites	33
2.2.4 Indice d'électrophilicité dans les huiles canola.....	34
2.2.5 Acquisition des données	35
2.2.6 Traitement des données	36
3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	38
3.1 Quantification des électrophiles dans les patates frites par sonde pré-fluorescente	38
3.1.1 Optimisation de la méthode	38
3.1.2 Indice d'électrophilicité dans les patates frites	43
3.2 Indice d'électrophilicité dans les huiles canola	48
3.2.1 Étude de la cinétique de la fluorescence des huiles canola chauffées	48
3.2.2 Dilution des huiles de canola chauffées.....	51
3.2.3 Analyse par détermination de l'indice de <i>p</i> -anisidine	55
3.3 Limites de la méthode.....	57
4. CONCLUSION.....	59
PARTIE B. DÉVELOPPEMENT D'INDICATEUR COLORIMÉTRIQUE IRRÉVERSIBLE DE TEMPÉRATURE CRITIQUE	
5.1 Introduction	61
5.1.1 Objectif de la recherche	63
5.1.2 Théorie du projet	64
5.2 Matériels et méthodes	66
5.2.1 Matériels utilisés.....	66
5.2.2 Méthodes.....	68

5.2.3	Description des méthodes	69
5.3	Résultats et discussions	72
5.3.1	Estimation des températures de fusion	72
5.3.2	Résultats primaires sur papier pH.....	75
5.3.3	Résultats avec les indicateurs colorés.....	77
5.3.4	Conception de l'indicateur temps-température	82
5.4	Conclusion.....	86
6.	RÉFÉRENCES	88

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 - Structures chimiques de l'acide stéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et linoléique. La notation [omega]-3 et [omega]-6 désigne le nombre de carbones avant la première insaturation en partant du CH₃ terminal des acides gras. 4
- Figure 2 - Étapes menant à la formation d'un hydroperoxyde..... 6
- Figure 3 - Oxydation primaire des lipides polyinsaturés en hydroperoxydes suivie d'une oxydation secondaire en électrophiles portant le groupement de carbonyles α,β -insaturés..... 8
- Figure 4 - Attaque nucléophile du glutathion pour désactiver un électrophile dérivé d'oxydation de lipides. 9
- Figure 5 - Schéma de principe du spectromètre UV-visible mono faisceau (Wikipédia).
..... 10
- Figure 6 - Diagramme de Jablonski présentant les transitions radiatives (lignes pleines) et non radiatives (lignes pointillées) (Frackowiak, 1988). IC = Conversion interne, ISC = Conversion intersystème. 12
- Figure 7 - (a) Schéma d'un fluorimètre et (b) Transitions lumineuse relatives en fonction de la longueur d'onde. (a) adapté de la référence (Valeur, 2003) et (b) de la référence (Frackowiak, 1988). 14

- Figure 8 - (a) Exemples de fluorochromes fréquemment rencontrés. (b) Fluorescence de différentes substances sous lumière UV (image adaptée de Wikipédia). Le vert : fluorescéine, le rouge : la rhodamine B, le jaune : la rhodamine 6G, le bleu : la quinine et le violet : un mélange de quinine et de rhodamine 6G..... 15
- Figure 9 - (a) Schéma 3D de la molécule fluorescente EGFP (Ormo et al., 1996) et (b) la structure du chromophore et (c) son spectre de fluorescence qui correspond à une émission verte..... 17
- Figure 10 - Sonde pré-fluorescente basée sur la réaction de 7-hydroxycoumarine avec une paire de phosphine. Le peroxyde d'hydrogène oxyde la phosphine ce qui augmente la fluorescence..... 18
- Figure 11 - La DCFH non fluorescente devient fluorescente dans les cellules après hydrolyse et oxydation radicalaire pour générer la 2,7-dichlorofluorescéine fluorescente..... 20
- Figure 12 - Sonde pré-fluorescente basée sur la détection du peroxyde d'hydrogène dans les mitochondries. (a) La sonde peut détecter le peroxyde d'hydrogène dans les cellules suivant les concentrations (fluorescence faible). (b) Augmentation de l'intensité de la fluorescence avec l'ajout du peroxyde d'hydrogène dans le milieu. Confirmation de la localisation du site chromophore bleu dans les noyaux des mitochondries (Dickinson & Chang, 2008)..... 21
- Figure 13 - La coumarine est non fluorescente en raison d'un état excité n, π^* bas. Substitution à la position 7 avec des groupes donneurs d'électrons habituellement améliore la fluorescence comme dans le cas de C-OH et C-SR..... 23

Figure 14 - À gauche photoluminescence du C-SH et à droite photoluminescence du C-SR, le C-SR ne peut relâcher un proton et va alors émettre un photon via fluorescence.	24
Figure 15 - Réaction du 7-mercapto-4-méthylcoumarine avec un électrophile dérivé de lipides donnant lieu à une augmentation de fluorescence.	27
Figure 16 - Structure du <i>trans</i> -4-hydroxy-2-nonéanal et <i>trans</i> -2-nonéanal.	29
Figure 17 – À gauche le mélange de l’huile dans l’éthanol, au centre dans le méthanol et à droite dans le mélange 1 :1 (v/v) d’éthanol et chloroforme.	30
Figure 18 – Réaction de la L-proline avec le <i>trans</i> -2-nonéanal.	31
Figure 19 - Réaction d’addition du C-SH sur le <i>trans</i> -2-nonéanal catalysée par la L-proline.	31
Figure 20 - Réaction de la <i>p</i> -anisidine avec un aldéhyde dérivé de lipide oxydé en milieu acide pour former un chromophore qui absorbe à 350 nm.	35
Figure 21 - Cas idéal d’ajouts dosés (Pente de la cinétique de fluorescence de la réaction en fonction de la concentration du <i>trans</i> -2-nonéanal)	37
Figure 22 - Réaction du C-SH avec un produit électrophile d’oxydation	38
Figure 23 - Spectre d’absorption et d’émission du C-SH dans le chloroforme (ligne continue : absorption, ligne en pointillée : émission de fluorescence). Le spectre rouge est celui du C-SH et le bleu du C-SMe.	39

- Figure 24 - Exemple de données obtenues pour la fluorescence du C-SH (1 mM) réagissant avec trois concentrations de *trans*-2-nonenal (0, 0,04 et 0,1 mM) catalysé par la L-proline (4 mM) dans un mélange d'éthanol et chloroforme 1:1 (v/v). 40
- Figure 25 - Vitesse d'augmentation de la fluorescence du mélange de C-SH (1 mM), L-proline (4 mM) dans le chloroforme:éthanol 1:1 (v/v) en fonction de la concentration de *trans*-2-nonéanal. En rouge, avec ajout d'huile et en bleu, sans huile. 41
- Figure 26 - Graphique de l'analyse des frites McDonald directement après l'achat. .. 44
- Figure 27 - Graphique de l'analyse des frites McDonald réfrigérée 24 heures. 45
- Figure 28 - Comparaison du contenu d'électrophiles, rapporté en équivalents de *trans*-2-nonenal, pour les huiles extraites de patates frites provenant de 7 restaurants de la région de Montréal. Les frites provenant du restaurant Vulcano ont été achetées la veille tandis que ceux provenant des autres restaurants ont été achetés la journée de l'analyse. 46
- Figure 29 - Comparaison du contenu en électrophiles de l'huile de croustilles Lays® immédiatement après l'ouverture du sac et en fonction du temps. 48
- Figure 30 - Cinétique de la fluorescence de la réaction du C-SH avec plusieurs concentrations de *trans*-2-nonéanal dans le CHCl₃/EtOH 1:1 v/v. La longueur d'onde d'excitation est de 365 nm et la longueur d'onde d'émission est de 420 nm. 49

Figure 31 - Courbes d'étalonnage de la pente de la vitesse de variation d'intensité de fluorescence par rapport au temps selon la concentration de <i>trans</i> -2-nonéanal de 0 à 840 s.....	50
Figure 32 - Courbes d'ajouts dosés de solutions d'huile de canola chauffées pendant 0 à 16 heures de 10% (v/v).....	51
Figure 33 - Courbes d'ajouts dosés de solutions d'huile de canola chauffées pendant environ 10 et 13 heures à diverses concentrations volumiques.....	52
Figure 34 - Comparaison du contenu d'électrophiles, rapporté en équivalents de <i>trans</i> -2-nonéanal pour les huiles de canola chauffée à 180°C de 0 h à 6 h.....	53
Figure 35 - Courbes d'ajouts dosés de solution d'huiles de canola chauffées de 0 à 6 h, diluées à 0,5 % (m/v).....	54
Figure 36 - Comparaison des valeurs d'indice de <i>p</i> -anisidine et de concentration de <i>trans</i> -2-nonéanal dans l'huile de canola chauffée à 180°C de 0h à 6h.....	56
Figure 37 - Fonctionnement du TTI Enzymatique : L'hydrolyse du triglycéride provoque la libération d'acides carboxyliques et la chute de pH induit le changement de couleur d'un indicateur du vert foncé au rouge orange.....	63
Figure 38 - Protocole et concept général du TTI : à gauche la réaction lorsque la température est inférieure à la température critique il n'y a aucun changement (le substrat reste cristallisé), à droite la réaction lorsque la température critique de fusion est atteinte.....	64
Figure 39 - Structure des alcools utilisés.....	66

Figure 40 - Réaction entre le dodécanol et l'hydroxyde de potassium.	66
Figure 41- Structures des indicateurs colorés de pH utilisés.	67
Figure 42 - Exemple de thermo gramme DSC et les différents échanges de chaleur possibles avec cette méthode.	68
Figure 43 - Protocole de fonctionnement du TTI : en haut la réaction sur papier pH lorsque la température est inférieure à la température critique il n'y a aucun changement, en deuxième position la réaction lorsque la température critique de fusion est atteinte, en bas la réaction sur papier filtre avec l'Alizarine Yellow R et le vert malachite lorsque la température critique de fusion est atteinte.....	71
Figure 44 - Exemple de thermogramme obtenu avec le mélange de dodécanol/décanol 9:1 (v/v), sans KOH; le pic en bas représente la température de fusion et celui du haut indique la température de cristallisation pour ces expériences.	72
Figure 45 - Température de fusion obtenue par DSC pour des mélanges de décanol et dodécanol.....	73
Figure 46 - Température de fusion obtenue par DSC pour des mélanges de décanol et dodécanol avec 0,4 M KOH.	74
Figure 47 - Photos de languette de papier pH en fonction du temps après l'application d'une goutte de dodécanol:décanol (3:2 v/v) avec 0,4 M (haut) et 0,1 M (bas) de KOH.	76
Figure 48 - Détérioration du papier pH à température ambiante avec 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v).....	76

- Figure 49 - Réaction de l'Alizarine Yellow R avec l'hydroxyde de potassium..... 78
- Figure 50 - Applications sur papier pH imbibé d'Alizarine Yellow R avec 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v) à température ambiante..... 78
- Figure 51 - Réaction du thymolphtaléine avec l'hydroxyde de potassium. 79
- Figure 52 - À gauche : Application sur papier filtre imbibé de solution d'Alizarine Yellow R (0,92 mM) /Thymol phtaléine (0,91 mM) avec 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v). À droite : Détérioration du même échantillon en phase liquide. 79
- Figure 53 - Absorption à 620 nm de la solution d'Alizarine Yellow R (0,92 mM) et Thymol phtaléine (0,91 mM) en fonction du temps après l'ajout de KOH (0,4 M). 80
- Figure 54 - Réaction du vert malachite avec l'hydroxyde de potassium. 81
- Figure 55 - Changement transitionnel de couleurs avec l'ajout de solutions basiques de 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v) sur papier filtre imbibé d'indicateurs de pH : 900 µL d'Alizarine Yellow R (0,005 M) et 100 µL de vert malachite (0,005 M). 81
- Figure 56 - Changement de couleur d'un papier filtre imbibé d'indicateurs de pH : 800 µL d'Alizarine Yellow R (0,005 M) et 200 µL de vert malachite (0,005 M) après l'ajout d'une goutte de 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v). 82
- Figure 57 - Schéma montrant la dégradation du film chargé de colorant et ses applications comme indicateur temps-température. A) Conception schématique du dispositif TTI. B) L'appareil sera activé en appuyant sur la languette qui met la

solution de base en contact avec le film chargé de colorants. C) Le processus de changement de couleur de la solution est lié à l'historique d'exposition. Avec le temps, la fenêtre d'affichage passe du rouge à la couleur jaune. 83

Figure 58 - Résultats du TTI activé à température ambiante avec 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v). Papier filtre imbibé avec 800 µL d'Alizarine Yellow R (0,005 M) et 200 µL de vert malachite (0,005 M)..... 84

Figure 59 - Résultats du TTI activé à 6°C avec 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v) dans le capillaire. Papier filtre imbibé avec 800 µL d'Alizarine Yellow R (0,005 M) et 200 µL de vert malachite (0,005 M)..... 85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Concentration équivalente en <i>trans</i> -2-nonenal des huiles de canola chauffées 10 et 13h à des concentrations de 5,0; 1,0 et 0,5% (v/v).	52
Tableau 2 - Équivalent en <i>trans</i> -2-nonénal dans les huiles de canola oxydées et calculs du ratio de conformité.	55
Tableau 3 - Indice de <i>p</i> -anisidine moyen des huiles de canola chauffées à 180°C de 0h à 6h.	56
Tableau 4 - Mélanges testés pour estimation des points de fusion par DSC sans KOH.	70
Tableau 5 - Différents indicateurs colorimétriques de pH testés et leur zone de virage.	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

C-SH	7-mercapto-4-méthylcoumarine
C-SR	Produit alkylé du C-SH
C-OH	7-hydroxy-4-méthylcoumarine
GSH	Glutathion
DCFH	2',7'-Dichlorofluorescin diacétate
ADN	Acide désoxyribonucléique
UV-vis	Spectroscopie d'absorption de lumière ultraviolet et visible
GC	Chromatographie en phase gazeuse (<i>Gas chromatography</i>)
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
ω	Désignation des acides gras insaturés
ROOH	Hydroperoxyde
k	Constante de vitesse
E	Électrophile
EtOH	Éthanol
MeOH	Méthanol

<i>p</i> -AV	<i>p</i> -Anisidine Value
ISO	International Organization for Standardization
TTI	Indicateur temps et température (<i>Time and Temperature Indicator</i>)
T _c	Température critique
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

u.a.	Unité arbitraire
é	Électron
g	Gramme
C	Concentration
s	Seconde
min	Minute
h	Heure
°C	Degré Celsius
M	Mol/L
mM	Millimolaire (10^{-3} M)
μM	Micromolaire (10^{-6} M)
τ_0	Temps de vie en absence d'extincteur
Φ_F	Rendement quantique de fluorescence
%	Pourcentage

RÉSUMÉ

Les produits alimentaires ou pharmaceutiques peuvent subir des réactions de dégradation, oxydation, pourrissement et enfin décomposition. Ainsi un aliment ou vaccin qui est conservé à température élevée ou en présence d'oxydants peut s'altérer et représenter un danger pour la santé du consommateur. La première partie de ce mémoire va s'intéresser au phénomène d'oxydation des huiles alimentaires végétales qui génèrent des électrophiles. La seconde partie traitera d'un indicateur colorimétrique pour détecter le bris d'une chaîne de froid lors du transport de produits réfrigérés.

L'oxydation des aliments est un processus inéluctable accéléré par l'oxygène présent dans l'air. Les huiles alimentaires en particulier peuvent s'oxyder pour former une multitude de produits portant le motif de carbonyle α,β -insaturé. Dans le corps humain, ces carbonyles α,β -insaturés agissent comme électrophiles qui se lient aux amines et thiols de protéines pouvant provoquer des effets néfastes sur la santé.

Nous avons développé une méthode fluorométrique pour mesurer la présence de carbonyles α,β -insaturés dans les huiles alimentaires. La méthode analytique est basée sur la 7-mercapto-4-méthylcoumarine (C-SH) qui peu fluorescente dans un solvant protique ($\phi_F = 0,01$, MeOH) et devient plus fluorescente lorsqu'elle se lie aux cétones et aldéhydes α, β -insaturés (électrophiles) avec $\phi_F > 0,5$. Cette technique dépend de la cinétique de pseudo-premier ordre pour l'addition du C-SH aux électrophiles d'un échantillon et les résultats sont rapportés par rapport à un électrophile standard, le *trans*-2-nonénaal. L'avantage de la technique développée est l'utilisation du criblage haut débit qui permet de faire réagir simultanément un grand nombre d'échantillons avec un substrat donné. Contrairement aux méthodes analytiques comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) qui nécessitent beaucoup d'expertise et une préparation laborieuse des échantillons.

Comme preuve de concept, nous avons déterminé la concentration équivalente en *trans*-2-nonénaal dans des frites récoltées de 6 restaurants différents et des huiles extraites des croustilles « Lays » qui passe de 0 à 469 μM après plusieurs jours d'ouverture du sac de chips. Nous avons aussi calculé la concentration équivalente en électrophiles de l'huile de canola chauffée qui a triplé de 0 à 6h.

La méthode standardisée ISO 6885:2012 d'indice de *p*-anisidine (*p*-AV) a été utilisée pour la comparer avec notre méthode basée sur le C-SH. Dans les mêmes conditions, l'huile de canola chauffée de 0 à 6 h passe de $p\text{-AV} < 0$ à $p\text{-AV} = 197 \pm 2$. L'indice *p*-AV est proportionnel au contenu en aldéhyde tandis que la technique basée sur le C-SH permet de quantifier les électrophiles qui sont reconnus pour leur toxicité. La comparaison de la méthode développée avec la méthode standardisée d'indice de *p*-anisidine permet de confirmer que la méthode développée pourrait être employée dans l'industrie agroalimentaire afin de réduire la quantité d'électrophiles dans les produits alimentaires.

La température joue aussi un rôle important dans la dégradation de plusieurs aliments et vaccins. Ceux-ci doivent être distribués et entreposés sans atteindre des températures élevées critiques qui pourraient entraîner des effets néfastes. La deuxième partie de ce mémoire traite sur le développement d'un indicateur colorimétrique qui permet de rapporter un bris dans cette « chaîne de froid ». Il est essentiel de surveiller la température dès les premières étapes de fabrication jusqu'à la livraison du produit alimentaire ou pharmaceutique. Pour les vaccins et certains médicaments, la « chaîne du froid » est aussi critique lors du transport. Les indicateurs temps-température (TTI) fournissent un résumé visuel de l'historique de la chaîne de refroidissement accumulé d'un produit, enregistrant les effets du temps et de la température. Dans notre conception, la température critique et le changement de couleur sont déterminés par le point de fusion d'une solution basique d'un mélange de deux alcools (dodécanol et décanol) qui peut fournir un indicateur activé entre 3°C et 24°C. Les différents points de fusion ont été déterminés par calorimétrie différentielle à balayage. Pour obtenir un changement colorimétrique graduel, nous avons utilisé des indicateurs de pH comme l'Alizarine Yellow R et le vert Malachite. Ce mélange d'indicateurs imbibé sur un papier filtre demeure vert si la température critique n'est pas dépassée. L'indicateur affiche un rouge si la température critique est dépassée pour moins d'un certain temps et passe au jaune lorsque l'échantillon est gardé au-delà de la température critique pour une période prolongée. La durée de cette période de passage du rouge au jaune dépend du design de l'indicateur et semble dépendre de l'oxygène.

De manière globale, ce mémoire explique le développement et l'application de deux méthodes de détection de dégradation de matériaux organiques et biologiques.

Mots-clés : Électrophile, huile, oxydation, sonde pré-fluorescente, *p*-anisidine, température, fusion, indicateur, pH, colorants.

PARTIE A. QUANTIFICATION D'ÉLECTROPHILES PAR SONDE FLUORESCENTE DANS LES HUILES DE CUISSON

1. INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Les huiles sont utilisées dans de nombreux domaines de l'industrie cosmétique (crème, maquillage, savon), agroalimentaire (huile de cuisson), pharmaceutique et chimique. Les huiles végétales insaturées jouent un rôle essentiel dans notre alimentation qui va bien au-delà de leur apport calorique (Combe & Rossignol-Castera, 2010). Lorsque les huiles sont exposées à l'air, cependant, elles peuvent se dégrader en produits nocifs pour la santé (Schaich, 2005). L'huile de friture en est un bon exemple ; la cuisson à haute température cause une oxydation accélérée de ces huiles. Certainement, les effets néfastes d'une consommation accrue d'aliments frits sont bien connus (Adibhatla & Hatcher, 2010). Nous proposons ici une méthode pour quantifier certains produits nocifs générés lors de l'oxydation d'huile.

L'oxydation des lipides dans les huiles provient de l'effet de l'oxygène de l'air sur les liaisons alcènes des acides gras insaturés. L'oxydation engendre une chaîne de réactions qui donnent au début des produits primaires (peroxydes), par la suite des

produits d'oxydation secondaire (cétones et aldéhydes). La plupart de ces oxydations secondaires produisent des effets sensoriels (altération de la flaveur) et biologiques indésirables (rancissement des huiles). Il s'agit d'une réaction en chaîne complexe, évolutive et irréversible (Barriuso, Astiasarán, & Ansorena, 2013; Kanner, 2007; Tabea, Azadmard-Damirchi, Jägerstad, & Dutta, 2008). Les produits secondaires d'oxydation possibles pour les huiles végétales étudiées (huile de canola) sont les aldéhydes et cétones α,β -insaturés qui sont particulièrement réactifs et qui deviennent toxiques lorsqu'ils se lient aux protéines ou à l'ADN (Grootveld et al., 2001; Obach & Kalgutkar, 2018). Afin de prévenir l'exposition à ces substances électrophiles, plusieurs méthodes analytiques ont été développées pour essayer de déterminer le degré d'oxydation des huiles. Certaines méthodes ciblent les hydroperoxydes (titrage à l'iode, spectroscopie UV-Vis, etc.) et d'autres ciblent les produits d'oxydation secondaires (essai d'acide thiobarbiturique, indice *p*-anisidine pour les aldéhydes, etc.) (Barriuso et al., 2013; Chu, 1991; Shahidi & Wanasundara, 2002).

Les méthodes de quantification par UV-vis sont plutôt simples et assez sensibles, fiables et reproductibles lorsqu'elles sont effectuées dans des conditions normalisées. Par contre, elles sont fortement empiriques par le fait qu'elles mesurent des mélanges complexes de molécules oxydées. De plus, ces méthodes demandent généralement beaucoup de travail et utilise de grandes quantités de solvants et de réactifs parfois dangereux (Barriuso et al., 2013). Le titrage à l'iode est une méthode spectrophotométrique iododépendante définie pour déterminer la teneur en hydroperoxydes. Dans ce procédé peu utilisé de nos jours, l'échantillon lipidique est placé dans une solution acide, qui est ensuite fusionné avec de l'iodure. L'hydroperoxyde lipidique oxyde l'iodure en iode. Ensuite, l'iode et l'iodure générés dans l'excès réagissent pour donner un anion triiodure, qui est détecté par spectrophotométrie à 350 nm (Barriuso et al., 2013; Kyriakidis & Katsiloulis, 2000). Cependant, les méthodes qui ciblent les produits secondaires d'oxydation ne permettent d'obtenir qu'une partie de l'information de l'ensemble des molécules formées et il est

donc nécessaire d'employer plusieurs méthodes pour réellement connaître le degré d'oxydation d'une huile. De plus, les valeurs obtenues par ces tests sont souvent imprécises et n'offrent alors pas de représentation intuitive du degré d'oxydation des huiles.

Pour une quantification plus précise, il est préférable d'employer des méthodes analytiques comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Barriuso et al., 2013). Clairement, ces méthodes sont plus coûteuses que les méthodes de quantification par spectroscopie UV-vis mentionnées précédemment. En effet ces techniques demandent beaucoup d'expertise et des instruments spécialisés, mais elles ont aussi un inconvénient important : les échantillons doivent souvent subir une préparation élaborée avant de pouvoir injecter les huiles dans les colonnes chromatographiques. Par exemple, il est parfois nécessaire de faire la saponification des huiles et/ou leur estérification. Cette préparation peut modifier les groupes fonctionnels tels que les hydroperoxydes et autres électrophiles présents dans l'huile. L'analyse qui suit peut prendre 20-40 minutes par échantillon, sans compter le temps d'analyse des courbes d'étalonnage.

Comme les produits nocifs des huiles sont dérivés de produits électrophiles, nous avons développé une technique simple pour évaluer le taux d'électrophiles dans une huile.

La méthode proposée permet de rapidement évaluer l'ensemble des électrophiles dans des huiles extraites sans modifications particulières. Étant donné que la cinétique du mélange d'électrophiles sera évaluée, les électrophiles qui réagissent plus rapidement, donc plus toxiques, vont avoir un poids plus important dans les mesures effectuées.

1.2 Composition de lipides

Pour répondre au mieux aux besoins de l'organisme, il faut consommer des composants énergétiques qui sont les glucides, les protéines et les lipides (matières grasses). Les huiles alimentaires sont formées à 100 % de lipides (environ 99 % de triglycérides); elles sont très caloriques et ne renferment pas d'eau. Les triglycérides sont composés de trois acides gras liés à un fragment de glycérol par des liaisons ester (Frankel, 2014). Les acides gras sont classés en trois catégories par rapport au degré d'insaturation, *i.e.*, la présence de liaisons doubles dans leur chaîne aliphatique : les acides gras saturés, mono-insaturés et polyinsaturés. La majorité des acides gras sont constitués par des chaînes de 12 à 22 carbones. Quelques exemples des principaux acides gras composant les huiles végétales sont l'acide palmitique ($C_{16}H_{32}O_2$), l'acide oléique ($C_{18}H_{34}O_2$), l'acide linoléique ($C_{18}H_{32}O_2$), linoléinique ($C_{18}H_{30}O_2$) et l'acide stéarique ($C_{18}H_{36}O_2$).

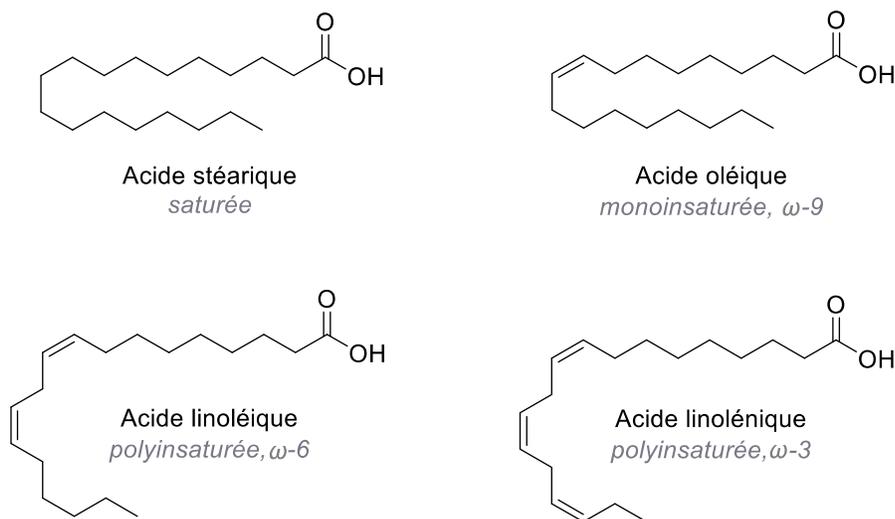


Figure 1 - Structures chimiques de l'acide stéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et linoléinique. La notation [omega]-3 et [omega]-6 désigne le nombre de carbones avant la première insaturation en partant du CH_3 terminal des acides gras.

Les huiles saturées sont habituellement solides et opaques à la température ambiante alors que les huiles insaturées (oméga-6 et oméga-3) sont liquides à la température ambiante. Ces huiles sont essentielles à la vie cellulaire. La membrane de chaque cellule est d'ailleurs constituée d'une double couche lipidique ce qui assure la flexibilité des membranes et la création des messages cellulaires (Lecerf, 2011).

Une autre caractéristique importante à prendre en compte c'est le point de fumée, qui est la température à partir de laquelle les huiles ou les graisses se décomposent et se dénaturent en émettant des fumées de façon continue. Cette production de fumée est responsable du mauvais goût produit par les huiles surchauffées. Cependant, le chauffage extrême d'une substance lipidique au-delà de son point de fumée entraîne la décomposition des acides gras et l'apparition de substances indésirables nocives pour la santé (cancérogènes) connue sous le nom d'électrophiles (Custot, 1959).

Ainsi, du fait de leur richesse en acides gras polyinsaturés, les huiles alimentaires sont sujettes à des réactions chimiques telles que l'isomérisation et l'oxydation des acides gras. Ces réactions sont accélérées à haute température.

1.2.1 Auto-oxydation des acides gras

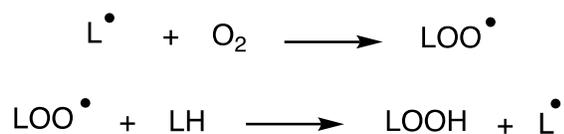
L'auto-oxydation représente le processus d'oxydation ou dégradation des matériaux organiques sous l'effet de l'oxygène. Le processus d'oxydation repose sur un échange d'électron (é) entre une source oxydante (qui gagne un é) et une source réductrice (qui perd un é). Fréquemment, l'oxygène se trouve être l'oxydant. Ce dernier réagit rapidement avec des radicaux libres qui sont en fait des molécules ayant un électron non apparié.

L'auto-oxydation présente un mécanisme similaire pour divers systèmes. Ce processus constitue une chaîne complexe de réactions qui donnent tout d'abord des produits primaires (peroxydes), qui une fois exposé à des conditions d'oxydation prolongées génèrent des produits d'oxydation secondaires comme des aldéhydes, cétones, époxydes, composés hydroxylés, oligomères et polymères (Cillard & Cillard, 2006). La peroxydation des lipides constitue une suite de réactions en chaîne entre l'oxygène et les doubles liaisons des lipides polyinsaturés qui aboutissent à l'accumulation d'hydroperoxydes (LOOH) (Figure 2). Cette réaction se fait sur trois étapes : initiation, propagation et terminaison (Ingold, 1961).

Initiation:



Propagation:



Termination:

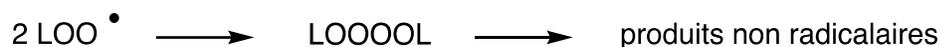


Figure 2 - Étapes menant à la formation d'un hydroperoxyde.

La peroxydation des lipides engendre des radicaux libres plus connus sous le nom des intermédiaires de réactions. Ces derniers très instables ont des effets toxiques sur la santé.

1.2.2 Les électrophiles cétone-alpha-beta insaturé (accepteurs de Michael)

Les électrophiles sont des substances qui réagissent avec les molécules nucléophiles riches en électrons (Frankel, 2014). Les électrophiles vont accepter une paire d'électrons afin de faire un lien covalent avec le nucléophile pour ainsi combler leur besoin d'électron. Parmi ces substances, les acides gras polyinsaturés sont une source potentielle d'électrophiles. Ces molécules, par leur oxydation, formeront des radicaux libres (Parr, Szentpaly, & Liu, 1999). Une oxydation supplémentaire des hydroperoxydes lipidiques génère un réseau de cétones et produits aldéhydiques, dont plusieurs sont électrophiles. Lorsque chauffée, l'huile alimentaire se dégrade par des réactions d'oxydations radicalaires pour former des hydroperoxydes et des carbonyles α,β -insaturés (Figure 3). Ces molécules ont la possibilité de s'attaquer aux sites nucléophiles des protéines comme les thiols via une réaction d'addition de Michael. Lorsqu'une protéine est liée à l'électrophile, celui-ci peut réagir avec une amine d'une autre (ou de la même) protéine via la fonction carbonyle. Ces modifications covalentes peuvent avoir des effets très néfastes puisque plusieurs zones très importantes pour la cellule ont des sites nucléophiles, par exemple les bases azotées de l'ADN (Nakamura & Miyoshi, 2010). Ces électrophiles peuvent former des liaisons covalentes avec les protéines et l'ADN ; cela semble être une des principales raisons des effets néfastes des radicaux libres. Une modification au niveau de l'ADN peut entraîner la formation de cellules cancéreuses Les modifications de protéines peuvent accélérer la formation d'agrégats et entraîner des maladies cardiovasculaires.

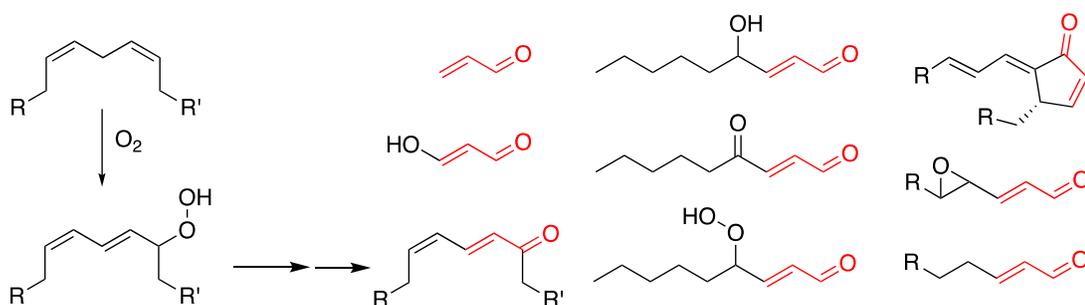


Figure 3 - Oxydation primaire des lipides polyinsaturés en hydroperoxydes suivie d'une oxydation secondaire en électrophiles portant le groupement de carbonyles α,β -insaturés.

Ce n'est que récemment que l'odeur « métallique » des métaux fut proprement expliquée (Glindemann, Dietrich, Staerk, & Kusch, 2006). Bien évidemment, l'odeur ne peut provenir de métaux eux-mêmes car ils ne sont pas volatils, mais plutôt des produits qui sont créés en contact avec la peau. Puisque la peau contient des lipides polyinsaturés et des dérivés peroxydés de ceux-ci, les métaux réducteurs tels que le fer ou le cuivre initient une réaction radicalaire qui produit une oxydation des lipides en produits volatils et nauséabonds. L'oct-1-én-3-one, une cétone α,β -insaturées, fut identifiée comme le principal produit de dégradation de peroxydes lipidiques qui donne une odeur métallique à la peau et même au goût métallique du sang dans la bouche.

Pour prévenir la peroxydation des lipides par des électrophiles α,β -insaturées, il est nécessaire d'utiliser des antioxydants. Les antioxydants jouent un rôle essentiel dans le maintien d'une bonne santé et dans la prévention des maladies. Comme les antioxydants empêchent les auto-oxydations des lipides et protéines, le glutathion prévient les dommages électrophiles induits par les produits d'oxydation électrophiles. Le glutathion est une défense cellulaire contre ces électrophiles (Meister & Anderson, 1983). Ce dernier est un pseudo-tripeptide contenant un thiol qui peut réagir avec les électrophiles (Figure 4), agissant ainsi comme réactif pour empêcher la réaction de modification des protéines et de l'ADN (Frenette, 2009).

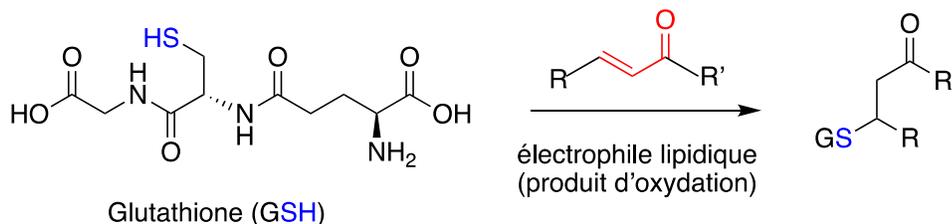


Figure 4 - Attaque nucléophile du glutathion pour désactiver un électrophile dérivé d'oxydation de lipides.

Les effets néfastes de l'oxydation des lipides sont de plus en plus reconnus à travers la formation d'un large éventail d'électrophiles qui ne sont pas neutralisés par le glutathion. Puisque ces composés sont d'une variété de structures et de caractères électrophiles, nous avons développé une méthode analytique pour comparer la teneur de différentes huiles alimentaires par leur contenu en électrophiles.

1.3 Aspects théoriques des méthodes expérimentales

1.3.1 Spectroscopie d'absorption UV-Vis

Le spectrophotomètre, souvent dénommé « UV-Vis » est une technique de base à la fois rapide et précise qui permet d'étudier la cinétique d'une réaction, les transformations d'une molécule, la quantification d'un analyte et plus encore (Perkampus, 2013). C'est une méthode analytique qui consiste à mesurer l'absorbance d'un échantillon dans le domaine de la lumière visible (400 – 800 nm) ou ultraviolet (190 – 400 nm). L'absorbance d'un échantillon est proportionnelle à sa concentration. Cette relation s'exprime par la loi de Beer-Lambert où l'absorbance A (densité optique) :

$$A_{\lambda} = -\log(I / I_0) = -\log(T) = \epsilon_{\lambda} l C \quad (1.1)$$

- I_0 : Intensité de la lumière transmise d'un blanc à la longueur d'onde λ
- I : Intensité de la lumière transmise de l'échantillon à la longueur d'onde λ
- T : fraction de la lumière transmise
- ε : coefficient d'absorption molaire or absorptivité molaire propre à l'entité chimique dans les conditions de la mesure ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- l : la longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu considéré (cm)
- C : la concentration de l'entité chimique (mol L^{-1})

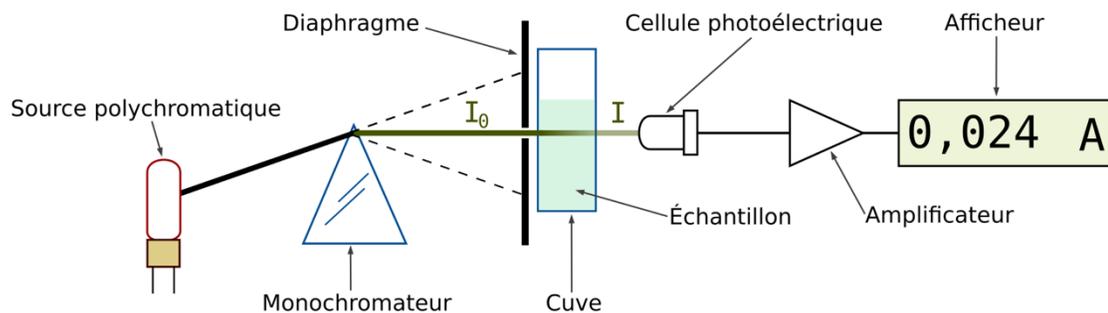


Figure 5 - Schéma de principe du spectromètre UV-visible mono faisceau (Wikipédia).

La Figure 5 montre le schéma d'un spectromètre UV-Vis à une longueur d'onde donnée : la lumière monochromatique traverse l'échantillon et la transmittance est mesurée de manière instantanée. Le spectre de l'échantillon est souvent exprimé en absorbance et corrigé par une référence pour soustraire l'absorbance des transitions du médium et de la cuvette.

1.3.2 Processus des états excités

Les électrons dans les molécules se retrouvent dans des orbitales de plusieurs niveaux d'énergie. Il est possible pour ces électrons de passer d'un niveau à l'autre. Par contre, comme la matière tend toujours vers l'énergie minimum, les électrons sous leur forme la plus stable sont sur le niveau d'énergie le plus bas. Un moyen de faire changer les électrons de niveau d'énergie est les rendre dans leurs états excités en transférant de l'énergie. Il y a cependant plusieurs contraintes. Les électrons doivent recevoir la quantité d'énergie exacte correspondant à la différence entre ces deux niveaux d'énergies. En sélectionnant la bonne longueur d'onde de lumière à envoyer sur les molécules, c'est l'énergie qui est modulée. En effet, la lumière transporte une énergie différente dépendant de sa longueur d'onde. Une fois la bonne longueur d'onde sélectionnée, les électrons passeront au niveau supérieur excité et lorsque le transfert de la lumière ou énergie cessera, les électrons retourneront à leur niveau le plus stable soit l'énergie la plus basse (Hehre, 2003).

Le spectre d'émission d'un composé chimique est le spectre des rayonnements électromagnétiques émis suite à une transition électronique d'un état à haute énergie à un état à énergie inférieure. Un spectrophotomètre permet d'observer plusieurs des transitions décrites dans le diagramme de Jablonski présenté ci-dessous (Figure 6). En général, le spectre d'excitation devrait permettre d'identifier les transitions d'absorptions. Pour un système idéal, le spectre d'excitation est identique au spectre d'absorption, mais en pratique, il varie selon l'intensité de la lampe à chaque longueur d'onde et selon la correction effectuée (Lindon, Tranter, & Koppenaal, 2016). En outre, pour un échantillon soumis à une source lumineuse ou radiation continue on obtient les deux modes d'émission : fluorescence et phosphorescence.

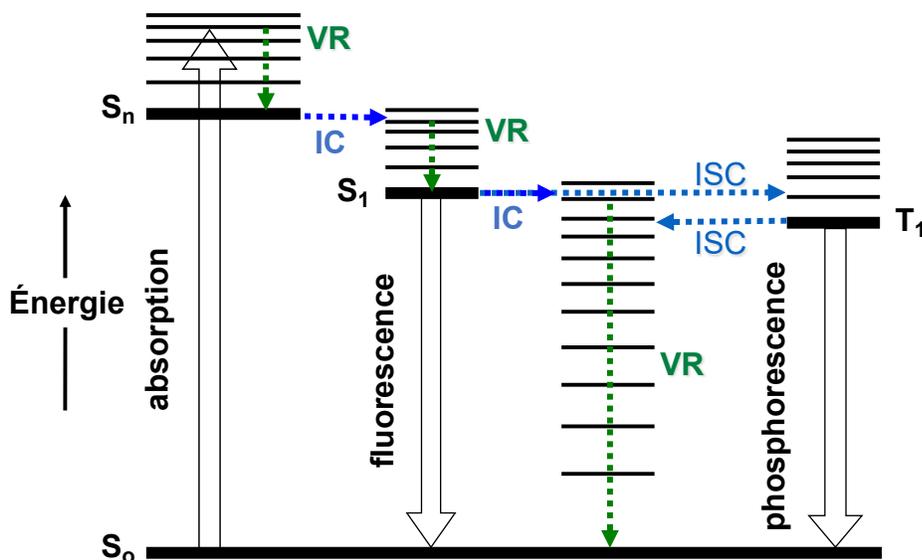


Figure 6 - Diagramme de Jablonski présentant les transitions radiatives (lignes pleines) et non radiatives (lignes pointillées) (Frackowiak, 1988). IC = Conversion interne, ISC = Conversion intersystème.

Chaque transition radiative indiquée par une ligne droite dans la Figure 6 engage l'absorption ou l'émission d'un photon pour passer d'un état à un autre. C'est le cas de la fluorescence et de la phosphorescence.

Tout d'abord, un photon est absorbé par l'état fondamental S_0 et crée un état excité S_1 . À partir de là, trois trajectoires sont anticipées : premièrement, le retour non radiatif à l'état fondamental ($S_1 \rightarrow S_0 + \text{chaleur}$), deuxièmement on a le retour radiatif par fluorescence ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$) et finalement, le passage à un état triplet ($S_1 \rightarrow T_1$). Le processus implique un changement de spin électronique formellement pour les molécules isolées, mais il peut être accéléré par les atomes lourds ou pour certaines classes de molécules, dont les cétones. Le changement de configuration électronique pour un même spin total (*e.g.*, $S_2 \rightarrow S_1$) est intitulé conversion interne (IC). Ce processus rapide se produit quand un état vibrationnel peut se coupler avec un état vibrationnel d'un état de spin de plus basse énergie. Lorsqu'un électron est en

mouvement autour d'un atome, le mouvement de rotation cause un moment magnétique qui peut provoquer un changement de spin : c'est le *couplage spin-orbite* et celui-ci accélère la conversion intersystème (ISC). La conversion intersystème est d'autant plus importante que la molécule possède un couplage spin-orbite fort d'un atome lourd. Plus la masse et la charge du métal ou atome sont grandes, plus l'inversion est fréquente. Ce type de transition non radiative peut conduire à la phosphorescence ($T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$), mais demeure une transition lente (Marian, 2012).

1.3.3 Principe de fluorescence

Pour redescendre à un niveau d'énergie, de la lumière sera émise pendant un bref moment (nanosecondes). Cette lumière émise est la fluorescence. Il y a toutefois une différence entre la lumière reçue et la lumière émise puisqu'une partie de l'énergie sera perdue en chaleur. Une molécule fluorescente est caractérisée par l'émission simultanée d'un photon. Le retour radiatif par fluorescence se fait du niveau ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$) comme mentionné en Figure 6. La décroissance de l'intensité de la fluorescence est semblable à une désintégration radioactive qui est également exponentielle (Valeur, 2003).

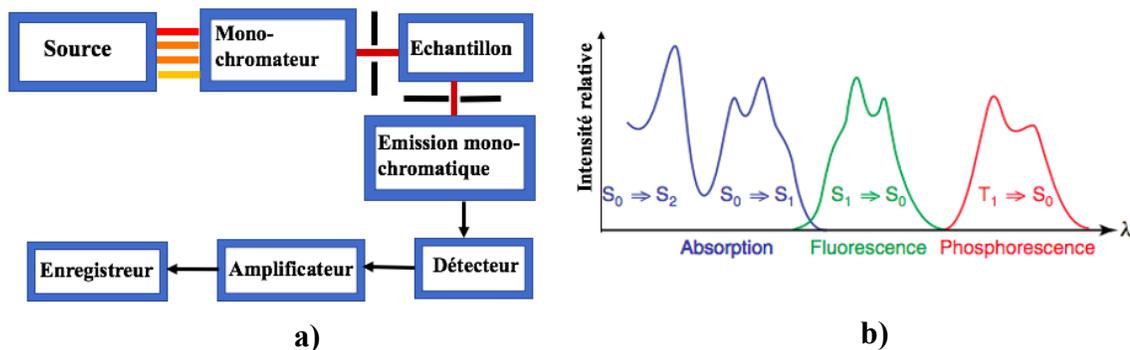


Figure 7 - (a) Schéma d'un fluorimètre et (b) Transitions lumineuse relatives en fonction de la longueur d'onde. (a) adapté de la référence (Valeur, 2003) et (b) de la référence (Frackowiak, 1988).

La source lumineuse polychromatique continue émet à toutes les longueurs d'ondes (une lampe xénon de 300 watts est utilisée pour notre appareil) et l'intensité est réglée par les fentes puis filtrée par un réseau de diffraction. L'échantillon est excité à la longueur d'onde choisie (λ_{exc}) et celui-ci émet une gamme de longueurs d'onde (λ_{em}) qui sont filtrées à nouveau à la longueur d'onde d'intérêt puis est détecté. L'utilisation de lumière pulsée ou amplificateur permet la détection résolue dans le temps, lorsque jumelée au détecteur approprié. La fluorescence est très particulière puisque, comme la plupart des propriétés d'une solution, elle augmente proportionnellement à la concentration, mais seulement jusqu'à un certain point. À une certaine concentration, la fluorescence commencera à diminuer. C'est parce qu'il y a un effet d'auto-extinction qui se produit lorsqu'une molécule fluorescente est trop concentrée. Cet effet d'auto-extinction s'explique par l'interaction de deux molécules entre elles pour se stabiliser. Cette interaction entre la forme excitée de la molécule et de la forme non excitée crée une baisse des niveaux d'énergie pour une meilleure stabilisation de ceux-ci (Valeur, 2003). Les niveaux d'énergie étant plus bas, la fluorescence est donc empêchée. Plus la concentration sera augmentée, plus cet effet sera présent et moins la fluorescence sera intense.

1.3.4 Notion de fluorochrome

Une molécule fluorochrome doit être capable d'émettre de la fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou molécules planes et cycliques et ainsi plusieurs liaisons π (Herman, 1998).

Les fluorochromes sont fréquemment utilisés dans la biologie moléculaire : marquage cellulaire et immunologique (Figure 8).

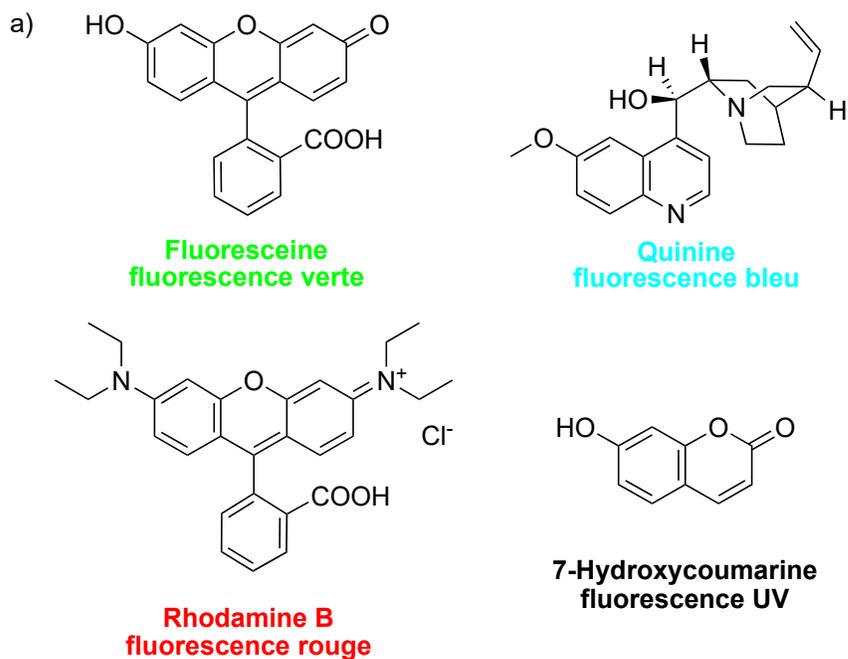


Figure 8 - (a) Exemples de fluorochromes fréquemment rencontrés. (b) Fluorescence de différentes substances sous lumière UV (image adaptée de Wikipédia). Le vert : fluorescéine, le rouge : la rhodamine B, le jaune : la rhodamine 6G, le bleu : la quinine et le violet : un mélange de quinine et de rhodamine 6G.

1.4 Sonde fluorescente et transfert d'électrons

Le phénomène de fluorescence correspond à l'émission de l'énergie à une certaine longueur d'onde suivant une des règles de sélection de la mécanique quantique : la molécule reste dans un état singulet. Ce qui caractérise une molécule fluorescente d'une molécule qui ne l'est pas c'est l'état excité π, π^* plus bas que l'état n, π^* . En effet, les électrons vont émettre de la fluorescence à partir de l'état π, π^* et non à partir de l'état n, π^* (Frenette, 2009). Les molécules n'ayant pas le bon état le plus bas en énergie ne feront pas ou peu de fluorescence, ce qui est le cas de la majorité des molécules. Dans ce cas, l'émission ou l'énergie d'excitation sera dissipé par d'autres voies non radiatives telles que la relaxation vibrationnelle (IC : Conversion interne), croisement intersystème (ISC : Conversion intersystème), photochimie.... Donc pour qu'une molécule soit fluorescente elle doit émettre de la lumière considérablement vite pour éviter de tomber dans les autres processus d'émission cités précédemment. Des molécules qui deviennent fluorescentes après une modification chimique sélective gagnent beaucoup d'intérêt de nos jours; elles sont appelées sondes pré-fluorescentes (Ueno & Nagano, 2011). Deux conceptions communes pour les sondes pré-fluorescentes seront discutées :

- (i) Modification des états excités de la molécule par transformation chimique.
- (ii) Modification chimique directe du fluorochrome.

1.4.1 Exemples de sondes fluorescentes

Dans les domaines de biologie moléculaire et biotechnologies, les sondes fluorescentes sont très utilisées tel qu'un marqueur fluorescent qui peut être attaché à une molécule

cible. La plus connue est la protéine fluorescente verte (souvent abrégé GFP « Green Fluorescent Protein ») qui a valu le prix Nobel de la chimie en 2008 (Nicolas & Moreau, 2008). La GFP est constituée de 238 acides aminés et le chromophore fluorescent est synthétisé par modifications de post-transcription par les chaînes latérales glycine, sérine et tyrosine. Les protéines fluorescentes vertes subissent une oxydation par les radicaux libres qui génère du peroxyde d'hydrogène comme sous-produit (Osamu & Sachi, 2017). Le pic d'émission de la fluorescence de la protéine modifiée GFP « Green Fluorescent Protein » se situe à 509 nm (Figure 9).

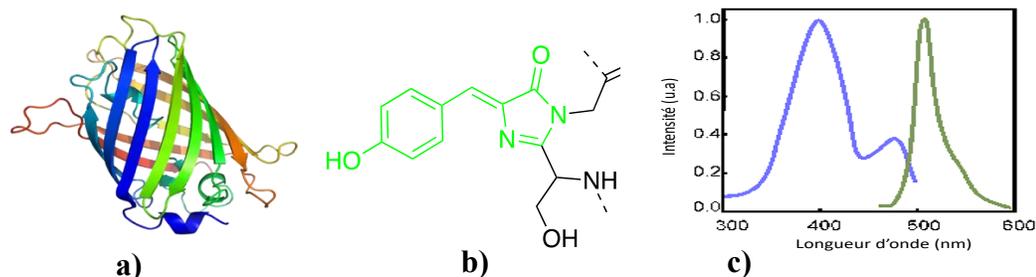


Figure 9 - (a) Schéma 3D de la molécule fluorescente EGFP (Ormo et al., 1996) et (b) la structure du chromophore et (c) son spectre de fluorescence qui correspond à une émission verte.

La longueur d'onde d'émission maximale de la fluorescence de cette molécule est également photo-excitable (dépend de l'exposition aux photons ultraviolets). Lorsqu'associée à un gène d'intérêt, la protéine fluorescente verte permet l'observation directe de l'expression de ce gène en microscopie à fluorescence. L'utilisation des molécules qui deviennent fluorescentes après une modification chimique est devenue d'un grand intérêt dans la biologie cellulaire et le domaine de la médecine régénératrice (Yuste, 2005). Ce genre de molécules modifiables sont appelées sondes pré-fluorescentes. L'action de ces sondes est principalement influencée par leur environnement, leur emplacement (traçage de la fluorescence en suivant le

déplacement de la molécule d'intérêt) et enfin la modification chimique du chromophore.

1.4.2 Sonde pré-fluorescente par modification des états excités

Des sondes pré-fluorescentes qui détectent le peroxyde d'hydrogène ont été conçues basées sur une réaction entre un extincteur (« quencheur ») ou donneur d'électrons et un accepteur d'électrons. Cet extincteur à l'état excité possède une paire d'électrons non appariés (phosphine ou une amine par exemple) va réagir avec un accepteur d'électrons (chromophore à état excité inférieur) ou une espèce réactive de l'oxygène tel qu'un peroxyde (H_2O_2). Une réaction de la triphénylphosphine avec des hydroperoxydes permettrait la conception d'une nouvelle sonde fluorescente pour H_2O_2 (Figure 10). La triphénylphosphine va réagir avec les hydroperoxydes tels que le peroxyde d'hydrogène pour produire de l'oxyde de triphénylphosphine (Soh et al., 2005).

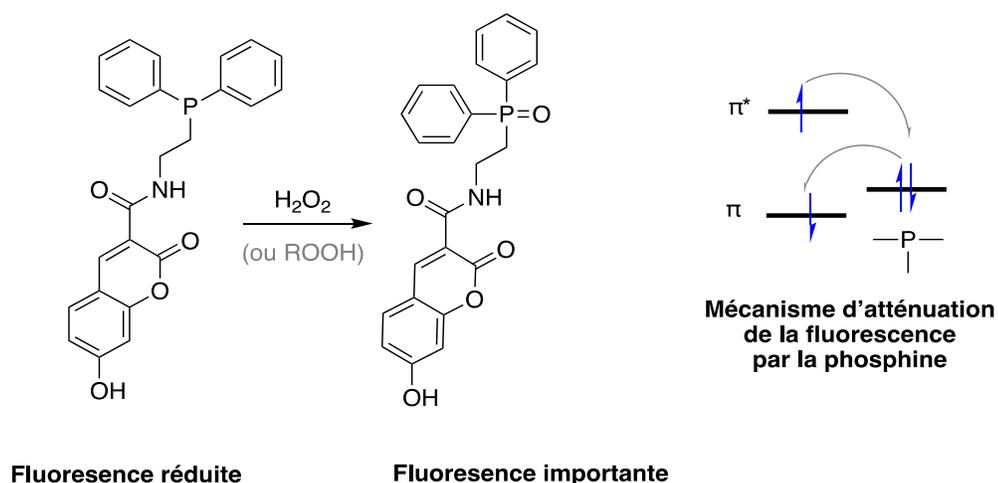


Figure 10 - Sonde pré-fluorescente basée sur la réaction de 7-hydroxycoumarine avec une paire de phosphine. Le peroxyde d'hydrogène oxyde la phosphine ce qui augmente la fluorescence.

Dans ce dernier cas, la paire d'électrons non appariés de la phosphine éteint la fluorescence du fluorochrome hydroxycoumarine, qui est rétablie après l'oxydation de la phosphine. Ainsi, le fluorochrome reste inchangé après la réaction d'oxydation c'est le « quencheur » (la phosphine) lié de manière covalente qui subit des transformations. Des sondes pré-fluorescentes qui détectent le peroxyde d'hydrogène ont été conçues sur un principe similaire.

1.4.3 Sonde pré-fluorescente par modification chimique du fluorochrome

La génération de sondes pré-fluorescentes à partir de précurseurs non fluorescents se fait majoritairement par des réactions chimiques. Les biocapteurs acido-basiques sont les produits les plus connus. La fluorescence de ces molécules est influencée par le pH de la solution ainsi que par la polarité, la température, la présence d'ions ou les éventuelles interactions avec d'autres molécules (Bovell-Benjamin & Roberts, 2016). Il existe dans la littérature, de nombreuses sondes formées via des réactions chimiques variées. Plusieurs sondes pré-fluorescentes ont été développées qui deviennent fluorescentes après une attaque de radical peroxyde. L'une des plus connues est le 2,7'-dichlorodihydrofluorescéine di-acétate (DCFH) (Figure 11). Cette molécule qui est un colorant non fluorescent lipophile perméable aux cellules, est hydrolysée intracellulairement en sa forme polaire (Bonini, Rota, Tomasi, & Mason, 2006). Cette approche n'est pas sélective, car plusieurs oxydants oxydent la fluorescéine (après hydrolyse) pour générer le fluorochrome conjugué le plus stable. Les estérases cellulaires sont responsables de l'hydrolyse et de la libération du composé actif dans la cellule.

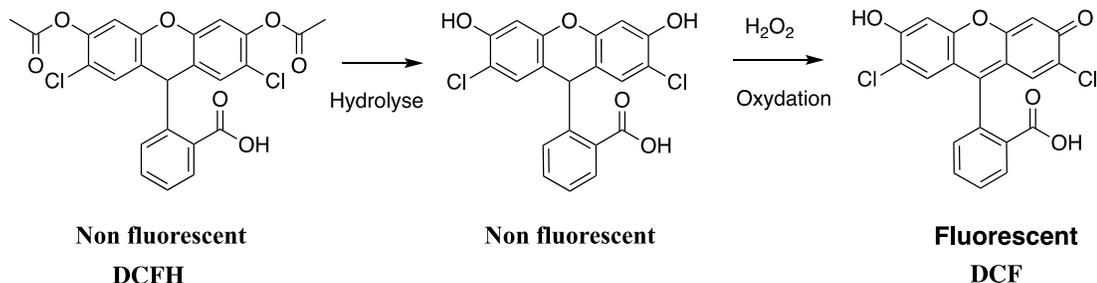


Figure 11 - La DCFH non fluorescente devient fluorescente dans les cellules après hydrolyse et oxydation radicalaire pour générer la 2,7-dichlorofluorescéine fluorescente.

L'oxydation du DCFH par l'action des espèces réactives oxygénées intracellulaires et d'autres peroxydes transforme la molécule en sa forme hautement fluorescente (DCF).

De nouvelles méthodes d'imagerie cellulaires ont été développées parmi lesquelles celle de Chang et Dickinson. La sonde pré-fluorescente proposée peut détecter le peroxyde d'hydrogène dans les cellules vivantes en particulier dans les mitochondries. La réaction se fait entre la liaison aryle-boronique de la molécule avec le H₂O₂ pour générer le chromophore (Dickinson & Chang, 2008). Dans la conception, le triphénylalkyl-phosphine a été ajouté pour localiser la fluorescence dans les mitochondries. (Figure 12).

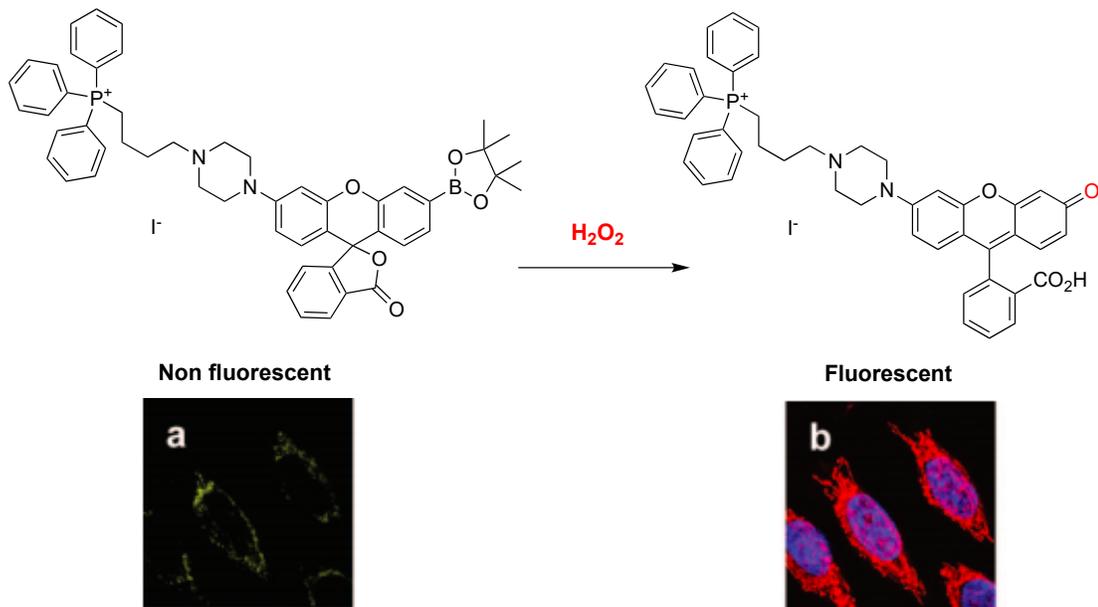


Figure 12 - Sonde pré-fluorescente basée sur la détection du peroxyde d'hydrogène dans les mitochondries. (a) La sonde peut détecter le peroxyde d'hydrogène dans les cellules suivant les concentrations (fluorescence faible). (b) Augmentation de l'intensité de la fluorescence avec l'ajout du peroxyde d'hydrogène dans le milieu. Confirmation de la localisation du site chromophore bleu dans les noyaux des mitochondries (Dickinson & Chang, 2008).

Le principal avantage d'une sonde pré-fluorescente est qu'elle soit capable de détecter des événements autrement invisibles à l'œil nu. La fluorescence obtenue doit présenter un signal spécifique, puissant et durable dans le temps. Dans la cellule vivante, le fluorochrome se doit de respecter autant que possible les fonctions cellulaires de la molécule. Le marquage cellulaire par des fluorochromes permet d'obtenir des renseignements structurels (ADN, protéines...) et fonctionnels (activité enzymatique, lipophilie...).

Pour conclure, les radicaux libres sont responsables de la dégradation oxydative des matières organiques telles que les produits alimentaires et les lipides. Dans l'absence d'antioxydants, des réactions d'oxydation secondaires ont lieu pour générer des produits électrophiles qui peuvent modifier de manière covalente les protéines et l'ADN. L'oxydation des radicaux libres intracellulaires a été liée à plusieurs maladies dont le vieillissement de la peau (sclérose et fibrose), inflammation et allergie, cancer, des maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer), à l'athérosclérose (Halliwell & Gutteridge, 2015). Il est donc essentiel d'essayer de prévenir ce processus désastreux. L'utilisation des sondes pré-fluorescentes fournit des informations essentielles pour le suivi des molécules cibles impliquées dans l'oxydation radicalaire.

1.5 Notions de fluorescence des coumarines

La coumarine, qui est responsable pour l'odeur du gazon fraîchement coupé (Haskins & Gorz, 1961), est fréquemment utilisée en photochimie. Les dérivés de la coumarine ont été utilisés dans de nombreuses applications comme dans le milieu pharmaceutique, cosmétique et biologique. Sa plus importante propriété se trouve être sa fluorescence d'où son utilité pour fabriquer des colorants laser et des sondes fluorescentes (Frenette, 2009). La coumarine n'est pas fluorescente, mais elle le devient si on lui ajoute un groupement alcool à la position 7. Cependant lorsqu'une réaction de substitution remplace l'hydrogène du groupement alcool par une autre chaîne alkyl, la fluorescence revient pratiquement nulle (Figure 13). Il a été décrit récemment que le phénomène inverse peut s'observer pour la coumarine avec un groupement thiol, aussi appelé mercapto, en position 7 (Lanterna, González-Béjar, Frenette, & Scaiano, 2017).

Généralement, ce qui caractérise une molécule fluorescente c'est que les électrons vont émettre de la fluorescence à partir de l'état singulet π, π^* et non à partir de l'état n, π^* . La coumarine est non fluorescente en raison d'un état excité n, π^* de basse énergie. La substitution à la position 7 avec des groupes donneurs d'électrons habituellement améliore la fluorescence comme dans le cas de C-OH et C-SR (Frenette, 2009).

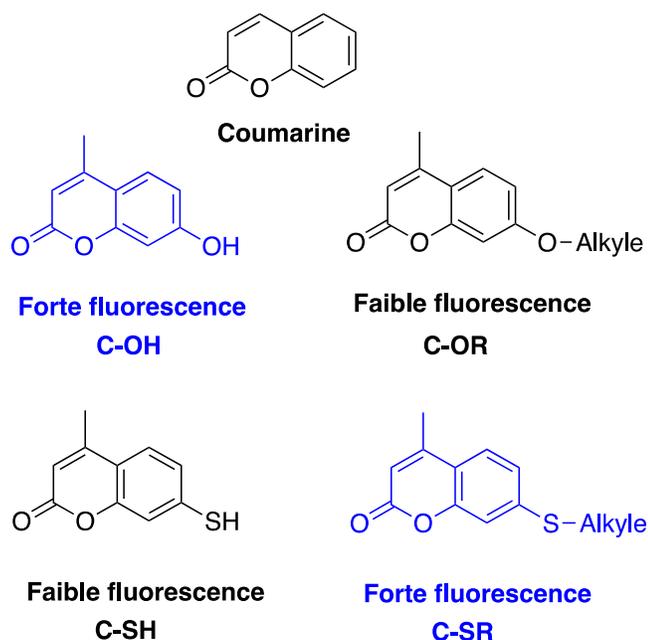


Figure 13 - La coumarine est non fluorescente en raison d'un état excité n, π^* bas. Substitution à la position 7 avec des groupes donneurs d'électrons habituellement améliore la fluorescence comme dans le cas de C-OH et C-SR.

La fluorescence du C-OH s'explique par les électrons non liants de l'oxygène qui ont un état π, π^* plus bas que son état n, π^* . Contrairement au soufre (C-SH) qui est plutôt l'inverse. Cela explique donc pourquoi ces deux composés très similaires ne sont pas tous les deux fluorescents. L'ajout d'une chaîne alkyl sur les deux groupements inverses cette propriété et donc celui qui était fluorescent ne l'est plus et celui qui ne l'était pas le devient.

Le 7-mercapto-4-méthylcoumarine (C-SH) est peu fluorescent lorsqu'il se trouve dans un solvant protique polaire comme l'éthanol. Lorsqu'excité, le C-SH libère le proton au solvant pour former le groupement thione avec délocalisation de la charge négative et passage à l'état triplet avec un état excité n,π^* bas et ainsi la relaxation par fluorescence n'est plus préférentielle. Par contre, lorsqu'il est lié à une cétone ou un aldéhyde α,β -insaturée (C-SR), il n'y a plus de proton à libérer et alors la fluorescence est plus favorisée. La fluorescence s'explique par les électrons non appariés de l'atome d'oxygène qui ont un état π,π^* plus bas que son état n,π^* (Figure 14). Contrairement au soufre (C-SH).

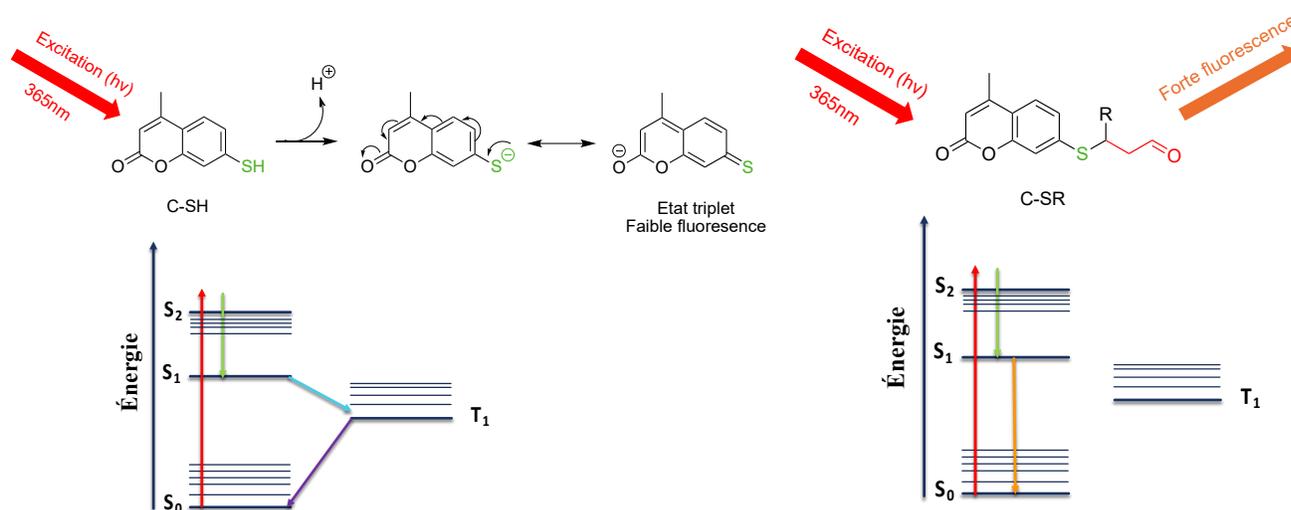


Figure 14 - À gauche photoluminescence du C-SH et à droite photoluminescence du C-SR, le C-SR ne peut relâcher un proton et va alors émettre un photon via fluorescence.

Dans les solvants non protiques, les propriétés fluorescentes des coumarines sont largement dictées par la nature de l'état excité singulet le plus bas, n, π^* ou π, π^* . En général, les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ (et les transitions $\pi^* \rightarrow \pi$) sont plus autorisées que les transitions $n \rightarrow \pi^*$. Pour un état excité en solution, Φ_0 est alors défini par le rapport des constantes de désactivation par radiation (émission, k_{rad}) sur la somme des constantes de vitesses de désactivation ($k_{\text{désactivation}}$) avec et sans radiation (sans

radiation = k_{nr} , qui inclut la relaxation thermique, réactions chimiques, etc.). Si l'émission de la fluorescence est plus rapide que les autres transitions concurrentes, le rendement quantique de fluorescence (Φ_F) sera élevé (Green, Pimblott, & Tachiya, 1993):

$$\Phi_0 = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{nr}} = \frac{k_{rad}}{1/\tau_0} = k_{rad}\tau_0 \quad (1.2)$$

Avec la présence d'un état excité, les extincteurs ou « quencheurs » peuvent augmenter le taux d'émission non radiative, réduisant ainsi le rendement quantique de fluorescence.

Dans un solvant protique polaire comme le méthanol, le C-SH présente une faible fluorescence avec $\Phi_F = 0,01$ dans le MeOH alors que le C-SR lié a un produit d'oxydation électrophile se caractérise par une forte fluorescence avec $\Phi_F = 0,53$ dans le MeOH (Frenette, 2009). Dans les solvants non protiques et dans l'absence des extincteurs des états excités, nous proposons que Φ_F soit largement dicté par la participation d'un état excité n,π^* non fluorescent.

1.5.1 Objectif de la recherche

Dans ce chapitre, nous avons décrit les nombreuses mesures préventives prises par les cellules contre le stress oxydatif ainsi que la littérature derrière les sondes fluorescentes. Les huiles alimentaires, d'autre part, ne disposent pas de nombreuses mesures préventives contre le stress oxydatif. Une fois que les antioxydants sont consommés, l'oxydation des lipides est répandue dans l'huile de cuisson. Est-il nocif de manger ces lipides oxydés ? Les maladies cardiovasculaires sont-elles corrélées à la quantité de lipides oxydés que nous ingérons ?

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous espérons faire avancer le niveau de connaissance des différents éléments pouvant affecter la dégradation des lipides. Ce chapitre décrit une sonde pré-fluorescente capable de quantifier les produits d'oxydation électrophiles dans des échantillons tels que les huiles alimentaires et les patates frites. En effet, le C-SH pourrait également être utilisé pour détecter la présence de tout agent d'alkylation en utilisant la puissante combinaison de sondes pré-fluorescentes et de lecteurs à haut criblage. Notre étude pourrait établir un indice de comparaison de « l'électrophilicité » entre l'huile extraite de matière grasse et un référentiel électrophile. Par cet indice, il serait possible d'évaluer la toxicité d'un aliment gras.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériels utilisés

2.1.1 Le 7-mercapto-4-méthylcoumarine (C-SH)

La méthode proposée a pour but de comparer la quantité et la réactivité des électrophiles trouvés dans différentes huiles alimentaires. La détection d'électrophiles est basée sur le nucléophile pré-fluorescent 7-mercapto-4-méthylcoumarine (C-SH), notre réactif principal dans ce projet. D'une part, le C-SH est très peu fluorescent dans les solvants protiques ($\Phi_F < 0.01$) comme déjà expliqué en Section 1.4. D'autre part, son groupement thiol est capable de réagir avec les carbonyles α,β -insaturés par une réaction de Michael catalysée par la proline. La nouvelle molécule formée, C-SR, est beaucoup plus fluorescente (Figure 15).

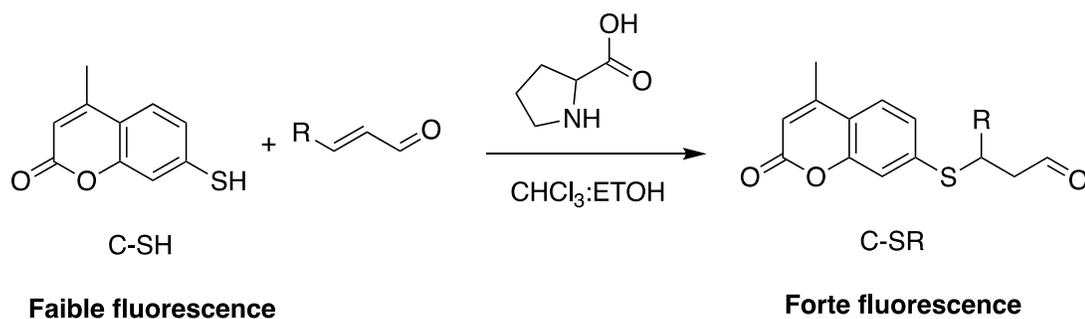


Figure 15 - Réaction du 7-mercapto-4-méthylcoumarine avec un électrophile dérivé de lipides donnant lieu à une augmentation de fluorescence.

Le C-SH contient une fonction thiol qui agit comme nucléophile de façon similaire aux sites nucléophiles des protéines. Le principe de base de cette méthode est de mesurer l'augmentation de la fluorescence en présence d'une huile (qui contient des électrophiles) et de comparer cette cinétique avec une molécule électrophile étalon. L'électrophile étalon choisi est le *trans*-2-nonéanal.

L'avantage principal de cette méthode basée sur le C-SH est que l'analyse est rapide et qu'elle donne un indice d'électrophilicité tenant compte de tous les électrophiles dans un échantillon. Cette méthode permet aussi d'analyser plusieurs échantillons en parallèle puisque les analyses se font par lecteur à microplaque. Il s'agit donc une méthode simple, rapide et qui rapporte le contenu en électrophiles dans les lipides oxydés.

2.1.2 Purification du 7-mercapto-4-méthylcoumarin

La première étape consistait à purifier le 7-mercapto-4-méthylcoumarine (97% de pureté) qui pourrait contenir du thiol oxydé en disulfure. Le C-SH n'est pas une molécule très soluble dans les solvants organiques peu polaires, alors on se sert de l'hexane afin de le purifier. L'ajout de 1.5 g de C-SH (impure) est inséré dans l'erenmeyer équipé de barreau magnétique. Après l'ajout d'hexane ACS (~ 50 mL), le mélange est brassé et chauffé, puis un minimum de dichlorométhane est ajouté pour atteindre la dissolution complète du C-SH en solution. La solution est ensuite retirée de la plaque chauffante pour refroidir et afin de permettre au dichlorométhane de s'évaporer pour que le C-SH, qui est peu soluble dans l'hexane, se recristallise et les cristaux sont récupérés. Il est important de récupérer le C-SH avant que l'hexane s'évapore trop, car sinon nos impuretés précipiteront aussi.

2.1.3 Choix de l'électrophile étalon

Le *trans*-4-hydroxy-2-nonéanal connu sous le nom de HNE un aldéhyde α,β -insaturé produit par peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés (acide arachidonique et linoléique) se caractérise par une importante réactivité due à la conjugaison de la double liaison avec la fonction aldéhyde ce qui fait du carbone en position 3 un puissant centre électrophile (Carini, Aldini, & Facino, 2004).

Le *trans*-2-nonéanal est préféré au *trans*-4-hydroxy-2-nonéanal, car son coût est moins élevé et la molécule est plus stable en solution (Figure 16). Le 4-hydroxynonéanal n'est pas stable, car sa fonction hydroxy peut attaquer l'aldéhyde intramoléculaire ou intermoléculaire. L'autre problème que l'on aurait à utiliser le 4-hydroxynonéanal sera qu'il ne se vend pas sous cette forme, mais bien sous la forme de diméthylester. De plus c'est une molécule multifonctionnelle (groupe électrophile C-3 et carbonyle), elle peut former des liaisons avec des sites nucléophiles comme chez les protéines ou le C-SH via une addition de Michael.

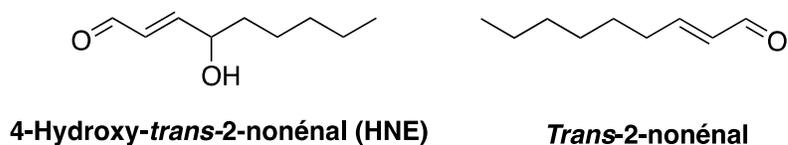


Figure 16 - Structure du *trans*-4-hydroxy-2-nonéanal et *trans*-2-nonéanal.

La cinétique de la réaction du *trans*-2-nonéanal (électrophile étalon), sera comparée avec la cinétique des électrophiles contenus dans une huile alimentaire ou des patates frites. Ainsi, le *trans*-2-nonéanal a été choisi comme analyte standard puisqu'il imite les électrophiles formés par son groupement aldéhyde α,β -insaturé et permet alors d'exprimer la réactivité d'un échantillon d'huile en concentration équivalente de *trans*-2-nonéanal.

2.1.4 Choix du solvant

L'éthanol a été choisi comme co-solvant puisque le C-SH a besoin d'un solvant qui peut accepter un proton pour accepter le proton du *C-SH dans l'état excité. Une fois sous forme anionique déprotonée le *C-S⁻ passe rapidement vers l'état triplet sans émettre de lumière. Malheureusement, l'éthanol pur ne dissout pas bien les huiles et donc, un deuxième solvant moins polaire doit être ajouté pour nos analyses (Figure 17). Le chloroforme (CHCl₃) a plusieurs utilités, la première est que le rendement quantique du C-SR dans ce solvant est plus élevé (Frenette, 2009). Plus le rendement quantique est élevé, plus la fluorescence sera forte. Il est donc beaucoup mieux d'avoir un solvant composé d'un mélange de ces deux substances qui ont leur utilité. Un mélange un pour un de chloroforme et éthanol est donc utilisé pour la méthode.

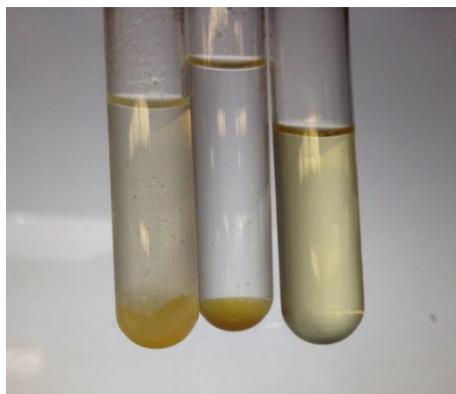


Figure 17 – À gauche le mélange de l'huile dans l'éthanol, au centre dans le méthanol et à droite dans le mélange 1 :1 (v/v) d'éthanol et chloroforme.

Un mélange de chloroforme et éthanol 1 :1 (v/v) fut alors utilisé pour toutes les analyses. Ce choix est préféré au mélange de méthanol et dichlorométhane pour ralentir l'évaporation; il est à noter que l'évaporation peut tout de même causer des problèmes dans l'analyse de nos résultats. Pour minimiser ces effets d'évaporation, les plaques de 96-puits sont remplies rapidement et le temps d'analyse est limité à 1020 secondes.

Plusieurs types de films scellants furent testés sans succès pour prévenir cette évaporation—le solvant prévenait une adhésion adéquate du film sur les microplaques. Les microplaques de polypropylène doivent aussi être utilisées dans ces analyses puisque le polystyrène se dissout par la présence du chloroforme.

2.1.5 Choix du catalyseur

La L-proline a été utilisée comme catalyseur. L'avantage de la proline est qu'elle agit non seulement comme catalyseur, mais aussi comme tampon puisqu'elle comporte une fonction amine qui est basique ainsi qu'une fonction acide carboxylique qui est acide. La proline permet aussi à notre standard le *trans*-2-nonéanal de devenir un meilleur électrophile (Figure 18). Ainsi, la L-proline sert de catalyseur pour activer le carbone en position β par rapport au carbonyle du C-SH (Figure 19).

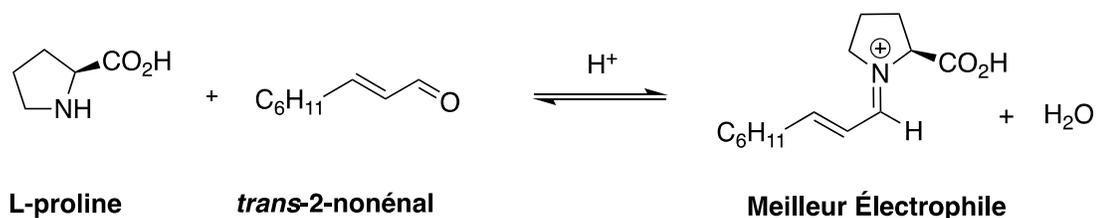


Figure 18 – Réaction de la L-proline avec le *trans*-2-nonéanal.

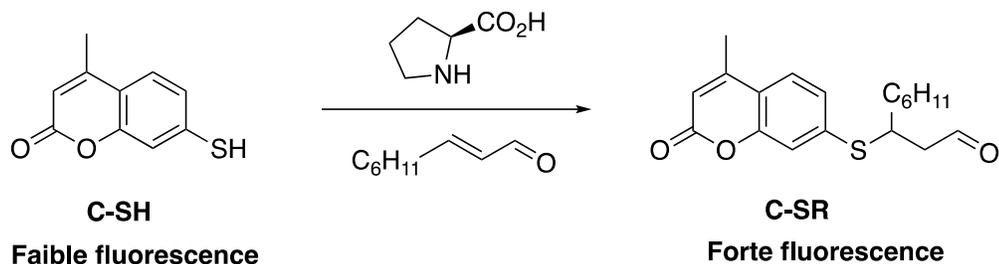


Figure 19 - Réaction d'addition du C-SH sur le *trans*-2-nonéanal catalysée par la L-proline.

2.2 Méthodes

2.2.1 Optimisation de la longueur d'onde

La longueur d'onde a été choisie selon plusieurs critères. Tout d'abord, il est nécessaire de sélectionner une longueur d'onde d'excitation résulte en émission de fluorescence. Puisque l'huile analysée absorbe dans l'UV, une longueur d'onde près de la lumière visible a été choisie. La longueur d'onde d'excitation choisie est 365 nm. De cette longueur d'onde, il est possible d'observer le spectre de fluorescence du C-SR qui connaît un maximum à 415-420 nm. Avec cette observation, il a été facile de choisir la longueur d'onde d'émission à mesurer. L'observation se fait donc à 415 nm pour la méthode développée avec les croustilles et à 420 nm pour les huiles de cuisson Canola, car les huiles qui sont de couleur jaune et donc absorbent dans le bleu. La longueur d'onde du bleu se situe près du 415 nm utilisé pour l'analyse alors selon l'intensité de cette couleur il est possible que la fluorescence soit légèrement absorbée par la solution elle-même. Toutefois, l'analyse cinétique élimine ce facteur d'erreur puisque même si la fluorescence est absorbée, elle devrait augmenter au même rythme, ce n'est que la valeur absolue qui est touchée.

2.2.2 Extraction des huiles à partir des croustilles

La méthode d'extraction de l'huile utilisée est une méthode classique. L'aliment duquel est extraite l'huile a été trempé dans le dichlorométhane et agité. Ensuite, le dichlorométhane a été filtré dans un entonnoir avec du coton. Plusieurs rinçages ont été faits pour entrainer toute l'huile et le tout a été recueilli dans un ballon avec un col pour fixer sur un évaporateur rotatif. Le solvant a été donc évaporé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Puisque le dichlorométhane a un point d'ébullition très bas et que la pression

est très basse à l'intérieur de l'appareil, l'évaporation est facile et rapide. Une fois le solvant complètement évaporé, le ballon ne contient que l'huile extraite. Cette huile peut ensuite être diluée dans le solvant d'analyse (chloroforme:éthanol (1:1)).

2.2.3 Indice d'électrophilicité dans les patates frites

Le 7-mercapto-4-méthylcoumarine ou C-SH (pureté >97%) de Sigma-Aldrich est purifié par recristallisation dans un mélange d'hexane et de dichlorométhane. Les solutions stock de 7-mercapto-4-méthylcoumarine (28,8 mg dans 25 mL, 6 mM) et de L-proline (69,0 mg dans 25 mL, 24 mM) sont fraîchement préparées la journée de l'analyse. Toutes les solutions sont préparées avec un mélange chloroforme:éthanol (1:1 v:v) comme solvant. La solution stock de *trans*-2-nonénel est préparée en diluant d'abord 50 µL de *trans*-2-nonénel pur dans 10 mL, puis 1 mL de cette solution est dilué dans 100 mL pour une concentration finale de 0,3 mM. Pour l'extraction d'huile des croustilles ou patates frites, environ 100 g de patates frites ou croustilles sont pesés dans un erlenmeyer de 1 L auquel environ 200 mL de dichlorométhane est ajouté. La solution est brassée pendant environ 15 minutes. La solution est filtrée sur un coton ouaté puis évaporée sur l'évaporateur rotatif pour obtenir l'huile pure. Une approche similaire est utilisée pour l'extraction d'huile de croustilles.

À partir de la solution stock de *trans*-2-nonénel (0,3 mM), six solutions filles de 0,03 mM à 0,24 mM sont préparées dans des ballons de 10 mL. Sur une microplaque de 96 puits, chaque puits analysé contient 50 µL de la solution de proline, 100 µL d'une des solutions de *trans*-2-nonénel et 50 µL de solvant ou d'une solution diluée de l'huile (environ 1:10 huile:solvant). Le temps de réaction est démarré lorsque 100 µL de la solution de 7-mercapto-4-méthylcoumarine est ajouté par une multipipette à 8 canaux. La plaque est alors remplie de façon à avoir une plage de concentrations de 0 à 100 µM de *trans*-2-nonénel avec et sans huile pour obtenir les deux courbes de calibrations

nécessaires à l'analyse du contenu d'électrophiles. Le volume total du puits est de 300 μL . La plaque est en polypropylène (le polystyrène n'est pas utilisable avec le chloroforme) est mesurée au lecteur à microplaque (SpectraMax Plus, Molecular Devices) avec une longueur d'onde d'excitation de 365 nm et une longueur d'onde d'émission de 415 nm. Une mesure est faite toutes les 30 secondes jusqu'à au moins 1020 secondes.

2.2.4 Indice d'électrophilicité dans les huiles canola

L'oxydation d'huile de canola (marque *sans nom*^{MD}, achetée à l'épicerie Provigo, 3421 Park Ave, Montréal) a été réalisée en chauffant celle-ci avec un agitateur magnétique à une température d'environ 180°C pendant quelques heures et en prélevant des échantillons à certains intervalles dans des bouteilles de verre clair. Ces échantillons ont ensuite été mis au congélateur à -20°C jusqu'à analyse. Les solutions stocks de 6 mM de 7-mercapto-4-méthylcoumarine (Sigma-Aldrich), de 30 mM de *trans*-2-nonénaal (Sigma-Aldrich) et de 24 mM de L-proline (Sigma-Aldrich) sont préparées le jour même dans un mélange de solvant chloroforme:éthanol (1:1 v:v). Les solutions d'huile, typiquement diluées 1:10, sont préparées dans le même solvant. L'analyse des solutions préparées dans une microplaque de polypropylène opaque à 96 puits (8 rangées de 12 puits) est effectuée avec le lecteur à microplaque Infinite M200 (Tecan) avec $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm et $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm. La microplaque est d'abord remplie à l'aide d'une pipette automatique à 8 canaux de la solution de *trans*-2-nonénaal (0 à 100 μL), puis sont rajoutés 50 μL de solution de L-proline et 50 μL de solution d'huile diluée. À cela sont rajoutés 100-200 μL de solvant. Enfin, 50 μL de solution de C-SH sont rapidement ajoutés et la lecture de la fluorescence est lancée tout de suite après. Le volume final de chaque puits est 300 μL .

Pour comparer notre méthode avec une méthode plus établie dans l'analyse de lipides oxydés, l'indice de *p*-anisidine (*p*-AV) a été obtenu selon la méthode ISO 6885:2012 (ISO, 2012). La *p*-anisidine réagit avec les aldéhydes en milieu acide pour former une base de Schiff qui absorbe à 350 nm (Figure 20). Pour ces analyses, 50 mg d'huile sont dilués dans 10 mL d'isooctane. Ensuite, une solution de *p*-anisidine (obtenue au magasin de chimie de l'UQAM) dans l'acide acétique glacial a été préparée. L'absorbance de cette solution d'huile à 350 nm a été comparée à celle de la solution d'huile à laquelle on y a ajouté à un rapport 1:5 v/v de solution de *p*-anisidine. Dix minutes après cet ajout, l'absorbance se fait à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis Biochrom Libra S6+. Il est noté que l'acide est connu pour causer des clivages de Hock à partir d'hydroperoxydes (Brinkhorst, Nara, & Pratt, 2008), donc, l'indice *p*-AV quantifie probablement les produits d'oxydation primaires en plus de ceux issus de l'oxydation secondaire.

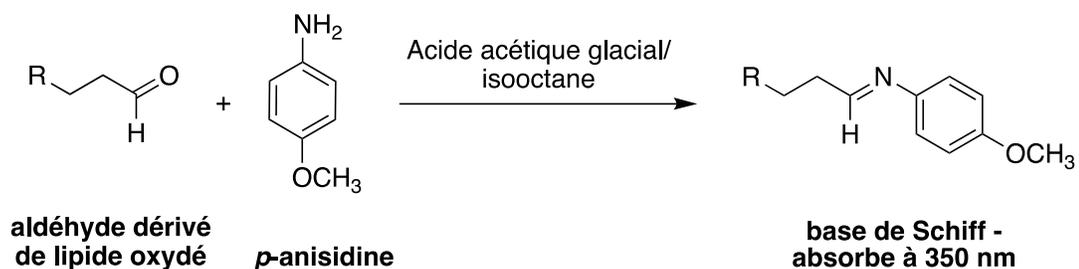


Figure 20 - Réaction de la *p*-anisidine avec un aldéhyde dérivé de lipide oxydé en milieu acide pour former un chromophore qui absorbe à 350 nm.

2.2.5 Acquisition des données

Pour la mesure de l'indice d'électrophilicité des huiles avec le C-SH, la cinétique de la réaction sera étudiée et l'obtention d'une courbe d'étalonnage linéaire de pseudo-premier ordre ($R^2 > 0,99$) est réalisée à l'aide de l'augmentation de la fluorescence dans le temps rapporté à la concentration de *trans*-2-nonéal. Dès que les ajouts dosés sont

terminés, la plaque est placée dans un lecteur de microplaque qui prendra une lecture de la fluorescence de chaque puits toutes les 30 secondes pendant 20 minutes.

2.2.6 Traitement des données

Comme ce fut expliqué dans l'introduction, le 7-mercapto-4-méthylcoumarine devient fluorescent lorsqu'une chaîne alkyle est ajoutée sur l'atome de soufre en position 7 (C-SR). Comme toute réaction, les composés ne se transforment pas instantanément, la réaction prend un certain temps à se compléter. En se fiant à la formule établissant la vitesse d'une réaction $A + B \rightarrow C + D$ (Moore & Pearson, 1981):

$$v = k \times [A] \times [B] \quad (2.1)$$

Nous supposons donc que la vitesse de réaction dépend de la concentration des réactifs. Si on ajoute un assez grand excès de C-SH par rapport à la concentration des électrophiles, sa concentration ne changera que très peu. Ainsi, la vitesse de la réaction (et l'augmentation en fluorescence) ne devrait dépendre que de la concentration de l'électrophile. En faisant un étalonnage des vitesses avec le *trans*-2-nonéanal comme électrophile, il sera possible d'ensuite établir la concentration équivalente à celle en *trans*-2-nonéanal. Bien sûr, les électrophiles n'ont pas tous la même constante de vitesse pour la réaction avec le C-SH. C'est pourquoi la concentration établie est une équivalence au *trans*-2-nonéanal. Selon l'équation de la réaction (Figure 15), la vitesse de la réaction est donc proportionnelle à la fois à la concentration du C-SH et du *trans*-2-nonéanal (électrophile étalon). Chaque lecture de chaque puits formera une droite avec les intensités de signal selon le temps à la lecture. La pente de chacune de ces droites sera un point dans la droite représentant la pente selon la concentration de *trans*-2-nonéanal. Cette droite deviendra la référence pour établir l'indice d'électrophilicité en équivalents de *trans*-2-nonéanal. La vitesse d'augmentation de la fluorescence est liée à

la concentration de C-SR et par conséquent à la vitesse de la réaction. Selon cette logique, les graphiques obtenus devraient ressembler à ceci :

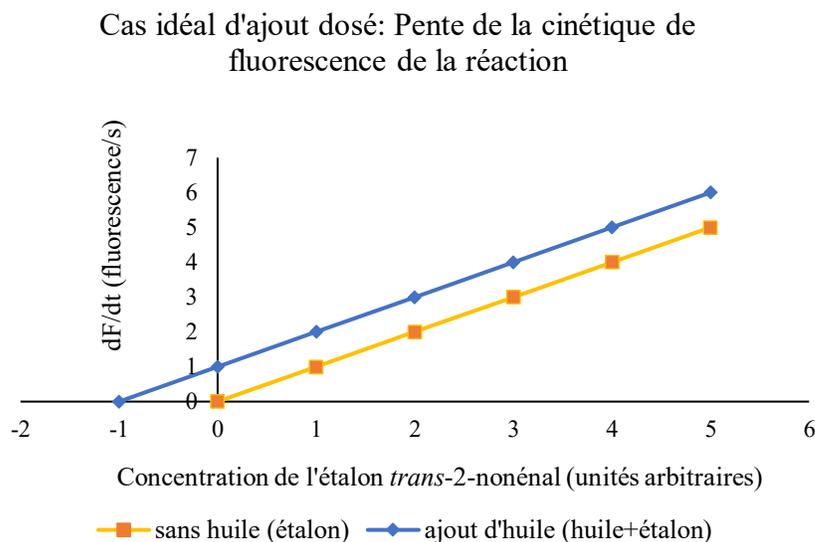


Figure 21 - Cas idéal d'ajouts dosés (Pente de la cinétique de fluorescence de la réaction en fonction de la concentration du *trans*-2-nonénil)

La droite supérieure est un ajout dosé avec lequel il est possible d'estimer la concentration d'électrophile, selon l'indice précédemment décrit, en établissant une extrapolation pour trouver où cette dernière croise l'abscisse. Exactement comme dans la méthode d'ajouts dosés excepté que cette fois-ci la substance ajoutée n'est pas exactement la même que celle analysée, mais plutôt une substance de référence qui est le *trans*-2-nonénil.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Quantification des électrophiles dans les patates frites par sonde pré-fluorescente

3.1.1 Optimisation de la méthode

Comme décrit dans le chapitre d'introduction, l'oxydation des huiles de cuisson est un domaine de recherche complexe avec plusieurs approches qui tente de quantifier ce processus. De plus en plus d'études démontrent que les produits néfastes de l'oxydation des huiles sont des électrophiles comportant le groupe fonctionnel cétone α,β -insaturée (Grootveld et al., 2001). Notre approche analytique utilise le 4-méthyl-7-mercaptocoumarine (C-SH) qui est peu fluorescente en milieu protique, mais qui devient fluorescente lorsqu'elle réagit avec les cétones α,β -insaturées (Figure 22).

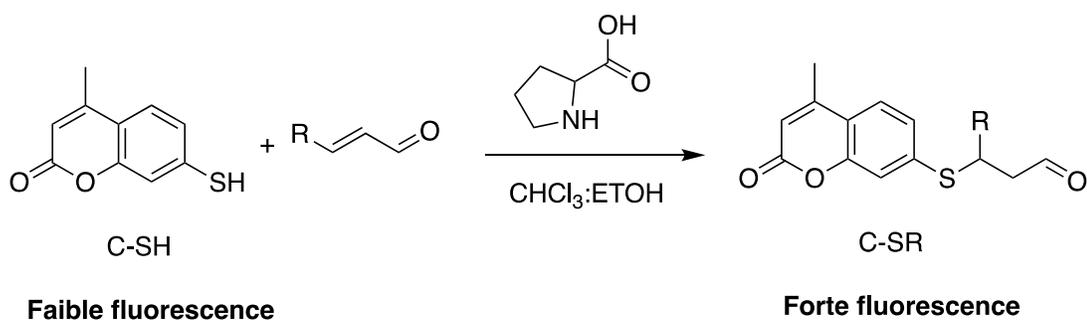


Figure 22 - Réaction du C-SH avec un produit électrophile d'oxydation

Le graphique en Figure 23 permet de comparer l'absorption et la fluorescence du C-SH avec celles du C-SH méthylé (C-SMe) dans le chloroforme. Nous observons

premièrement un déplacement du maximum d'absorption et de fluorescence à des longueurs d'ondes plus longues suite à la méthylation. Ce spectre rouge permet d'exciter préférentiellement les produits alkylés versus le C-SH. Les longueurs d'ondes d'analyses pour nos essais quantitatifs furent optimisées à 365 nm et 415 nm (ou parfois 420 nm) pour l'excitation et l'émission, respectivement.

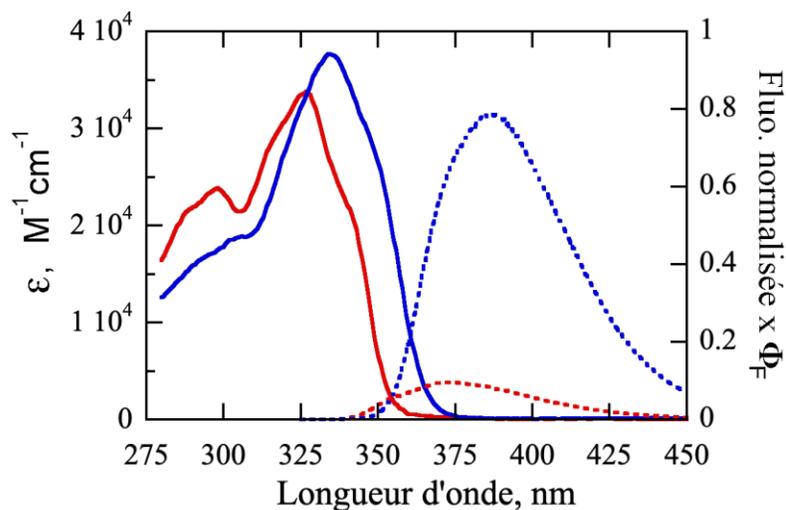


Figure 23 - Spectre d'absorption et d'émission du C-SH dans le chloroforme (ligne continue : absorption, ligne en pointillée : émission de fluorescence). Le spectre rouge est celui du C-SH et le bleu du C-SMe.

Dans le graphique ci-dessus, le spectre d'émission du C-SH dans l'éthanol s'étalerait sur la ligne de base puisque la fluorescence du C-SH est largement anéantie par la perte de proton dans l'état excité du C-SH (Frenette, 2009; Lanterna et al., 2017). Pour cette raison et pour bien solubiliser les huiles, un mélange de solvant de chloroforme:éthanol 1:1 (v/v) fut choisi.

La méthode d'analyse par fluorescence a été utilisée pour être adaptée au criblage à haut débit afin d'analyser plusieurs échantillons en parallèle en utilisant une microplaque comme récipient de réaction. Nous avons choisi une approche cinétique

d'analyse et les conditions de réactions ont été choisies pour être suffisamment rapides pour limiter le temps d'analyse, mais assez lentes pour permettre une distinction entre la réactivité de différentes sources d'électrophiles étudiés. Plusieurs conditions de réactions testées (différentes bases, acides et catalyseurs, systèmes de solvants, température, électrophiles modèles, etc.) pour aboutir à des conditions satisfaisantes avec 1 mM C-SH et 4 mM L-proline comme catalyseur. Il est important de noter que l'ajout d'acide cause une augmentation de fluorescence du C-SH et que la base accélère la formation de disulfures C-SS-C due à l'oxydation du C-SH déprotoné par l'oxygène. Ce produit secondaire, heureusement, n'est pas fluorescent et n'interfère pas dans nos analyses. Pour quantifier la présence du mélange d'électrophiles dans les huiles, l'électrophile étalon *trans*-2-nonénal est choisie et les électrophiles présents dans les huiles sont mesurés contre ce standard. Un exemple de données brutes de la cinétique de la réaction est présenté en Figure 24.

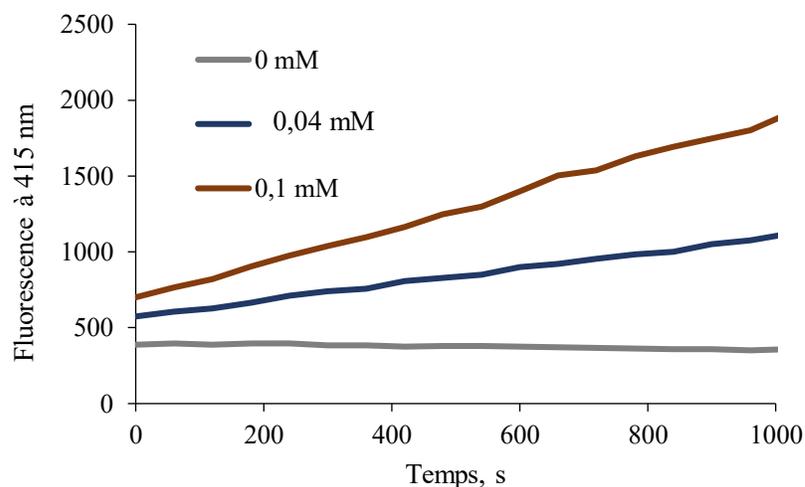


Figure 24 - Exemple de données obtenues pour la fluorescence du C-SH (1 mM) réagissant avec trois concentrations de *trans*-2-nonénal (0, 0,04 et 0,1 mM) catalysé par la L-proline (4 mM) dans un mélange d'éthanol et chloroforme 1:1 (v/v).

Dans le graphique ci-dessus, nous observons l'augmentation de la fluorescence du milieu réactionnel en fonction du temps de réaction avec trois concentrations différentes de l'électrophile étalon *trans*-2-nonénel. Il est possible de remarquer sur le graphique que la concentration de *trans*-2-nonénel fait augmenter progressivement la pente, car la concentration de *trans*-2-nonénel fait augmenter la vitesse de la réaction. Après, la pente de chaque solution est calculée entre le temps 60 secondes et 1020 secondes. Ces pentes sont comparées avec la concentration de *trans*-2-nonénel (Figure 25). Un ajout dosé d'huile alimentaire est ajouté dans un même système d'analyse pour obtenir une courbe idéalement parallèle, mais surélevée. Il est ensuite simple de faire l'extrapolation du point d'interception où l'axe des y est 0 pour obtenir le taux d'électrophiles dans l'huile en équivalents de *trans*-2-nonénel.

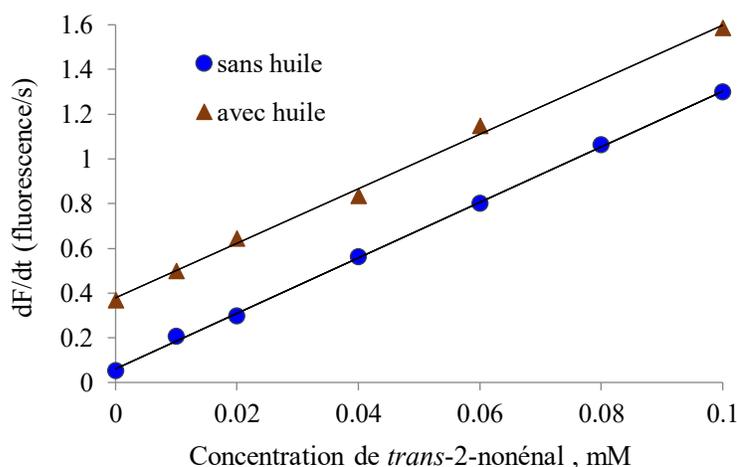


Figure 25 - Vitesse d'augmentation de la fluorescence du mélange de C-SH (1 mM), L-proline (4 mM) dans le chloroforme:éthanol 1:1 (v/v) en fonction de la concentration de *trans*-2-nonénel. En rouge, avec ajout d'huile et en bleu, sans huile.

Les pentes de la fluorescence représentent la vitesse initiale de la réaction entre le C-SH et les électrophiles. Ces valeurs donnent d'excellentes courbes d'étalonnage versus l'électrophile typique *trans*-2-nonénel. Pour l'analyse du contenu électrophiles des huiles alimentaires, un ajout dosé de l'huile équivalent à environ 1-2% du volume

d'analyse est ajouté au milieu réactionnel. La présence d'électrophiles dans les huiles augmente la pente de fluorescence en fonction du temps par rapport à la courbe d'étalonnage sans ajout d'huile (Figure 25). Il est alors possible d'observer deux droites: la première est celle des solutions ne contenant pas d'huile et la deuxième, celle contenant l'huile. Les deux ordonnées à l'origine sont soustraites, puis divisées par la pente de la droite "avec huile" pour obtenir une valeur finale qui est exprimée en équivalent de *trans*-2-nonéol c'est la concentration en électrophiles.

Cette logique est représentée mathématiquement à partir de la formule (3.1) :

$$\frac{dF}{dt} = \frac{d[CSR]}{dt} = k[CSH][E] \quad (3.1)$$

où F est la fluorescence, t le temps, k est la constante de vitesse et $[E]$ la concentration d'électrophile *trans*-2-nonéol. Pour faciliter l'analyse, un grand excès de C-SH est utilisé. La quantité de C-SH qui réagit devient donc négligeable par rapport à la concentration initiale des électrophiles. Cela permet de considérer cette concentration comme une constante. La réaction d'ordre 2 devient alors une réaction de *pseudo* ordre 1 et l'équation devient alors:

$$\frac{dF}{dt} = \frac{d[CSR]}{dt} \approx k[CSH]_0[E] \quad (3.2)$$

L'augmentation de la fluorescence est donc linéaire en fonction d'électrophile ajouté et idéalement, traverse l'origine au point 0,0. Pour l'analyse d'échantillons, nous ajoutons un petit volume d'huile dans le mélange réactionnel. Celle-ci contient différentes concentrations d'électrophiles, $[E_2]$, $[E_3]$, *etc.*, qui réagissent avec différentes constantes de vitesses, k_2 , k_3 , *etc.*, donc la cinétique de la réaction avec l'ajout d'huile devient:

$$\frac{dF}{dt} = \frac{d[CSR]}{dt} = [CSH]_0(k[E] + k_2[E_2] + k_3[E_3] + \dots) \quad (3.3)$$

Ainsi l'objectif est de comparer la cinétique d'augmentation de la fluorescence en fonction de la concentration de *trans*-2-nonéнал avec et sans huile ajouté. Cette comparaison va permettre d'évaluer la réactivité des électrophiles dans l'huile par rapport à une certaine concentration de *trans*-2-nonéнал. Le résultat final est alors exprimé en équivalent de *trans*-2-nonéнал. Notre méthode d'analyse affiche une valeur plus importante pour les électrophiles plus réactifs (avec k élevés) mais plus faible pour ceux moins réactifs (avec k plus faible). En général, les électrophiles plus réactifs sont plus toxiques, mais ceci n'est pas pour dire que la toxicité absolue sera évaluée pour un échantillon d'huile, car celle-ci dépend de nombreux paramètres. Cependant, la technique vise à comparer la réactivité/quantité des électrophiles entre deux échantillons d'huile alimentaire exprimée en équivalent de *trans*-2-nonéнал. Globalement, cette valeur donne un « indice d'électrophilicité » d'un échantillon, un peu comme d'autres techniques donnent le « taux d'hydroperoxydes » avec le titrage à l'iode ou le contenu en cétones avec l'analyse avec *p*-anisidine (White, 1995).

3.1.2 Indice d'électrophilicité dans les patates frites

L'oxydation des acides gras polyinsaturés entraîne leur transformation en électrophiles qui peuvent s'avérer nuisibles pour la santé. Une source importante de lipides oxydés est les frites. Ainsi, une analyse de différentes patates frites provenant de divers restaurants dans la région de Montréal, a été réalisé et comparé comme point de départ de cette méthode.

Tout d'abord, des patates frites du restaurant McDonald ont été testées dans deux conditions différentes. Les frites ont été testées directement après l'achat (Figure 26) et le lendemain après 24 heures. Elles ont toutefois été réfrigérées jusqu'au lendemain.

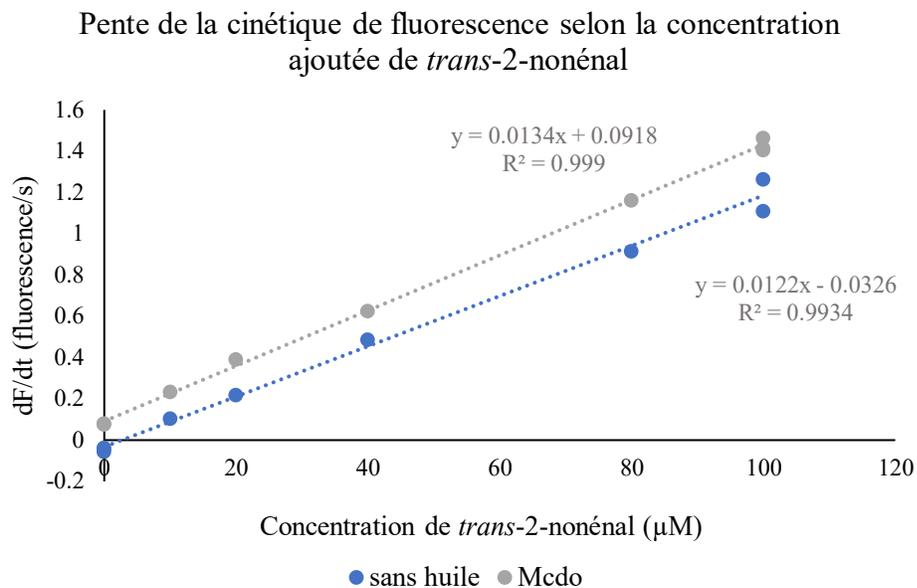


Figure 26 - Graphique de l'analyse des frites McDonald directement après l'achat.

Les deux droites sont pratiquement parallèles et les coefficients de corrélation sont très proches. Après calculs pour corriger la dilution de l'huile, la concentration d'électrophile équivalente en *trans*-2-nonéнал est de 0,217 mM par rapport à l'huile extraite.

Les frites ont été réfrigérées jusqu'au lendemain et une autre portion a subi l'extraction de l'huile par le dichlorométhane, l'évaporation, la dilution et l'analyse. Le test de l'huile réfrigérée pendant 24 heures permet de voir si les frites s'oxydent rapidement ou si elles peuvent se conserver une journée au réfrigérateur sans augmenter son indice d'électrophilicité (Figure 27).

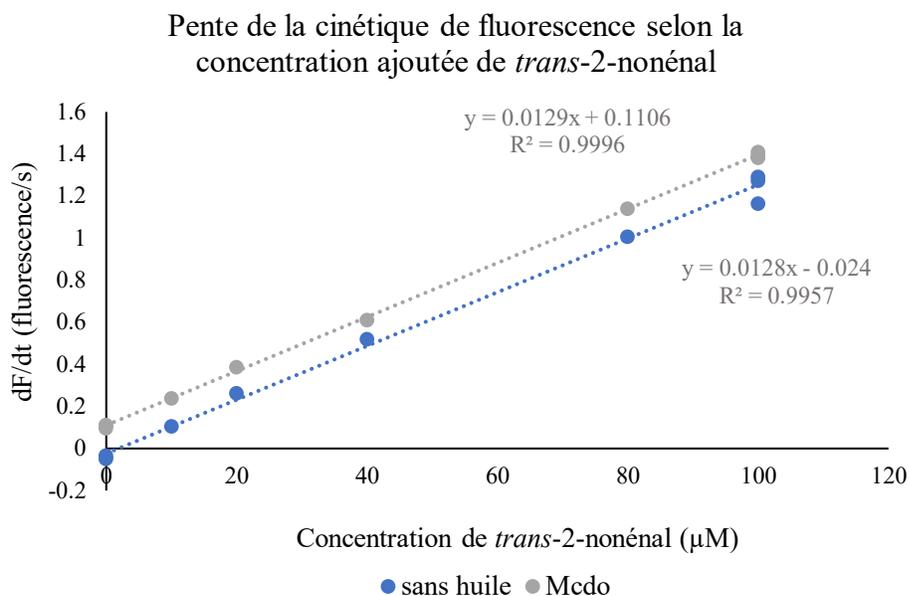


Figure 27 - Graphique de l'analyse des frites McDonald réfrigérée 24 heures.

On remarque que les pentes des deux droites sont pratiquement identiques, on peut dire que l'analyse est fiable. Une fois les calculs faits, la concentration d'électrophile équivalente en *trans*-2-nonénel est de 0,835 mM. Le taux d'électrophiles a presque quadruplé depuis la veille! Il est donc clair que les frites McDonald ne se conservent pas très bien dans le temps en termes d'oxydation. Ainsi, il est probablement plus nocif de manger des frites McDonald le lendemain de leur achat vu l'augmentation remarquable de la quantité en électrophiles en 24 heures. D'un point de vue personnel, le goût de frites du McDonald est certainement moins agréable le lendemain ou avec une baisse en température. Est-ce que ce changement de goût serait lié aux produits d'oxydation des huiles ?

Nous avons ensuite comparé le taux d'électrophiles de l'huile extraite des patates frites provenant de 6 restaurants en proximité du Département de chimie de l'Université du Québec à Montréal (McDonald, A&W, Burger King, Belle Province, Valentine, Lafleur) et le restaurant Vulcano à Terre-Bonne, Québec (Figure 28).

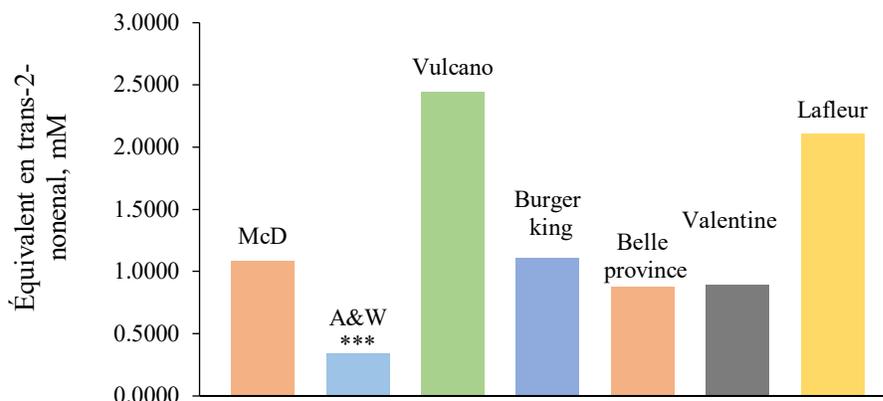


Figure 28 - Comparaison du contenu d'électrophiles, rapporté en équivalents de *trans*-2-nonenal, pour les huiles extraites de patates frites provenant de 7 restaurants de la région de Montréal. Les frites provenant du restaurant Vulcano ont été achetées la veille tandis que ceux provenant des autres restaurants ont été achetés la journée de l'analyse.

Le contenu le plus élevé en électrophiles est observé pour l'huile des frites des restaurants Lafleur sur Sainte-Catherine et Vulcano de Terre-Bonne. Tout d'abord, les frites Vulcano ont été achetées la veille de l'analyse (vu que la position du restaurant est loin), donc elles ont subi une oxydation due au contact prolongé avec l'oxygène. La concentration d'électrophile équivalente en *trans*-2-nonénal calculée est de 2,424 mM dans l'huile. Cette concentration est beaucoup plus élevée que les frites provenant du McDonald qui ont été achetées la journée même. Ce chiffre signifie donc que les frites du restaurant Vulcano sont potentiellement plus nocives. L'huile extraite des frites A&W était très jaune et cette couleur interfère avec l'analyse de la fluorescence provenant des produits de C-SH alkylés. Donc l'explication qui paraît la plus plausible est l'effet d'écran causé par une trop forte absorbance de la lumière absorbée et émise par la sonde fluorescente. Ainsi, les frites A&W fournissent un résultat qui ne peut être considéré comme valide. L'huile des frites provenant du Burger King présente une concentration d'électrophiles équivalente en *trans*-2-nonénal de 1,154 mM. Les frites

du Burger King ont donc environ deux fois moins d'électrophiles que les frites du Vulcano conservées une journée. Le calcul de la concentration d'électrophiles équivalente en *trans*-2-nonéol pour les frites provenant du restaurant Valentine donne un résultat de 0,894 mM. On note que moins d'huile fut extraite de ces frites et qu'elles sont moins concentrées en électrophiles. Les frites provenant du restaurant Lafleur sont un peu plus concentrées en électrophiles que les précédentes. En effet, en calculant la concentration d'électrophiles équivalente en *trans*-2-nonéol, la valeur est de 2,104 mM. Cette concentration est comparable à celle dans l'huile des frites Vulcano. Finalement, l'huile de friture provenant du restaurant la Belle Province a une concentration d'électrophiles équivalente en *trans*-2-nonéol de 0,872 mM. Les frites du restaurant Belle Province sont donc les moins potentiellement nocives parmi les différentes frites testées cette journée.

En outre, il est important de noter que la teneur en électrophiles des patates frites de sources différentes peut varier selon plusieurs facteurs. Le contenu en électrophiles d'huile de friture peut être affecté par la date du changement de l'huile, l'heure de la journée, le nombre de clients ayant commandés des patates frites, *etc.* Par exemple, une huile végétale fraîchement ouverte ne contient pas d'électrophiles selon la méthode d'analyse présentée.

La méthode a permis de tester plusieurs huiles. Les tests suivants ont été effectués sur l'huile extraite des croustilles de la marque « Lays » achetées de l'épicerie Provigo (3421 Park Ave, Montréal). Les croustilles Lays ont été testées dans deux conditions différentes. La première condition testée est directement après l'ouverture du sac. Comme les sacs de croustilles sont fermés de façon hermétique sous atmosphère d'azote, les acides gras présents dans les croustilles ne peuvent pas s'oxyder. La deuxième condition testée est après quelques jours de l'ouverture du sac. Un sac de croustilles laissé sur le comptoir permet aux acides gras de s'oxyder en présence d'oxygène. Le caractère électrophile devrait donc augmenter (Figure 29).

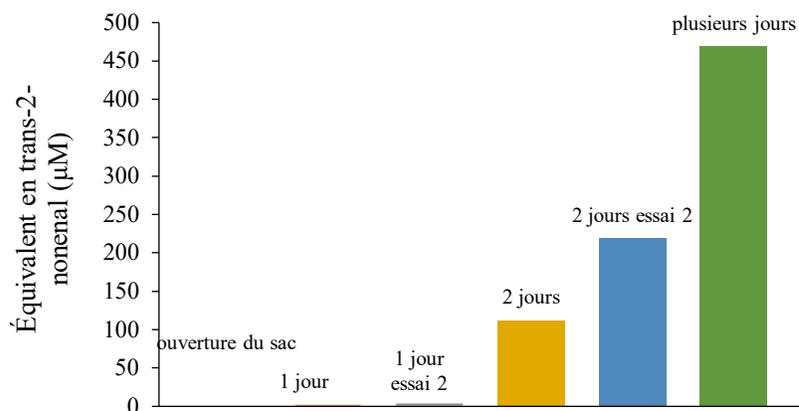


Figure 29 - Comparaison du contenu en électrophiles de l'huile de croustilles Lays® immédiatement après l'ouverture du sac et en fonction du temps.

On remarque l'augmentation de la quantité d'électrophiles dans un sac de croustilles lorsque les croustilles sont exposées à l'air libre. Les sacs de croustilles sont remplis avec de l'azote afin d'éviter le contact avec l'oxygène avant l'ouverture du sac. Pour cette raison, la quantité d'électrophiles initialement présente dans l'huile est très faible puisque peu d'oxydation a eu lieu. Cependant après avoir laissé ouvert le sac pendant plus d'un jour, de plus en plus d'électrophiles sont détectés. Comme les électrophiles sont des produits d'oxydation secondaires, leurs concentrations augmentent lentement au début puis s'accroissent au fur à mesure que les produits d'oxydation primaires (hydroperoxydes) se décomposent.

3.2 Indice d'électrophilicité dans les huiles canola

3.2.1 Étude de la cinétique de la fluorescence des huiles canola chauffées

Nous avons refait la même étude cinétique comme expliquée en 3.1.1 pour ce type d'échantillons (l'huile de cuisson canola). Selon l'équation de la réaction du C-SH, la

vitesse de la réaction est proportionnelle à la fois à la concentration du C-SH et du *trans*-2-nonéol. En utilisant un excès de C-SH (1 mM de C-SH ajouté versus au maximum 0,1 mM de *trans*-2-nonéol), la vitesse devient alors de pseudo premier ordre. De la même façon, la vitesse d'augmentation de la fluorescence est liée à la concentration de C-SR et par conséquent à la vitesse de la réaction et donc on obtient l'équation finale (équation 3.4).

$$\frac{dFluo}{dt} = k' [trans - 2 - nonéol] \quad (3.4)$$

Ensuite, nous avons établi la courbe d'étalonnage de *trans*-2-nonéol avec plusieurs concentrations. Le résultat assez linéaire obtenu confirme expérimentalement la réaction de pseudo premier ordre avec l'augmentation de la fluorescence pendant 1020 secondes environ (Figure 30 et 31).

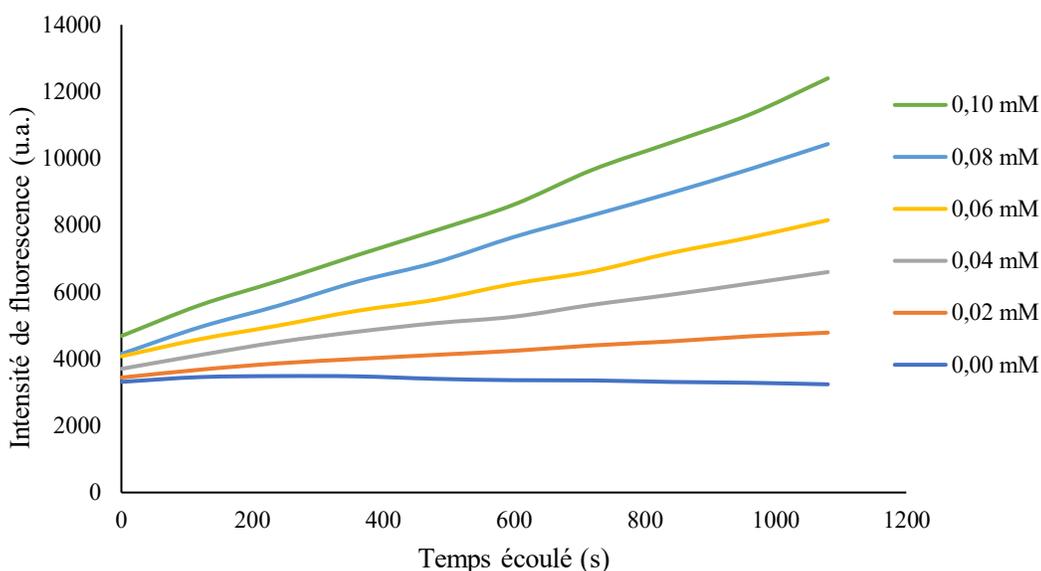


Figure 30 - Cinétique de la fluorescence de la réaction du C-SH avec plusieurs concentrations de *trans*-2-nonéol dans le $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 1:1 v/v. La longueur d'onde d'excitation est de 365 nm et la longueur d'onde d'émission est de 420 nm.

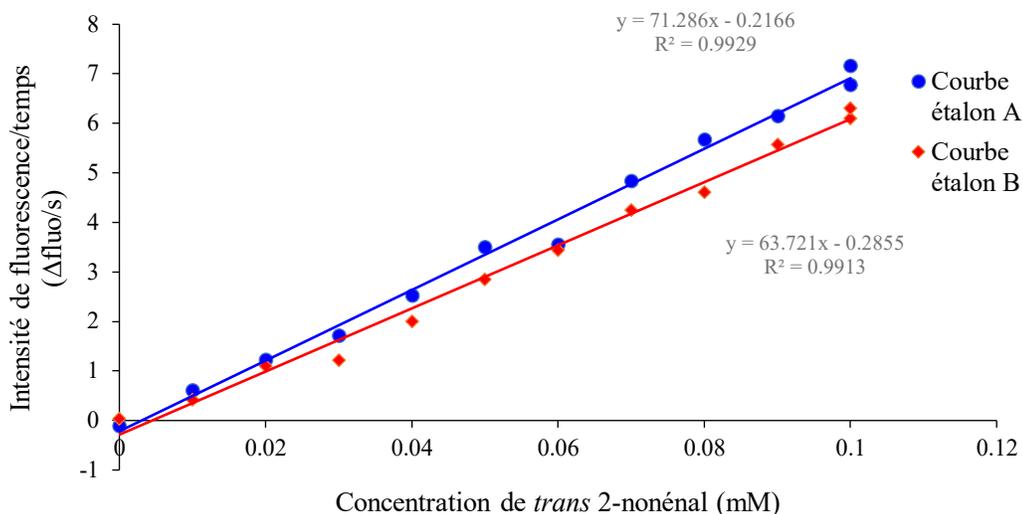


Figure 31 - Courbes d'étalonnage de la pente de la vitesse de variation d'intensité de fluorescence par rapport au temps selon la concentration de *trans*-2-nonénel de 0 à 840 s.

En premier lieu, plusieurs échantillons d'huiles de Canola, chauffées à 180 °C avec agitation de 0 à 16 h, ont été testés et les teneurs en électrophiles calculées. La teneur équivalente en électrophiles des huiles de Canola chauffées a été comparé avec notre étalon (Figure 32). La vitesse de la réaction ne dépend que de la concentration d'électrophiles présents dans l'huile. En faisant un étalonnage des vitesses avec le *trans*-2-nonénel comme électrophile étalon, il est possible d'établir la concentration équivalente à celle en *trans*-2-nonénel et ainsi d'évaluer la réactivité des électrophiles dans l'huile étudiée.

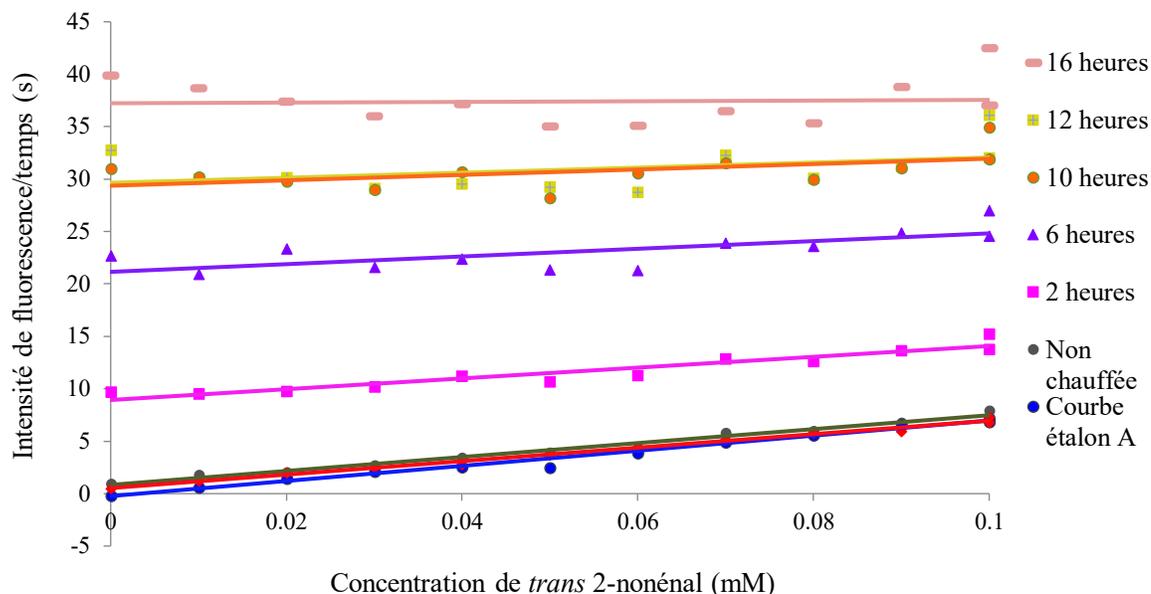


Figure 32 - Courbes d'ajouts dosés de solutions d'huile de canola chauffées pendant 0 à 16 heures de 10% (v/v).

Nous remarquons que les huiles oxydées au-delà de 6 h dépassent la région de linéarité de la méthode. On en conclut qu'il existe un effet d'écran pour huiles chauffées longtemps (il y a absorption de lumière bleue émise) et auto-atténuation à forte concentration de C-SR. Ainsi, il est important de diluer encore plus l'huile.

3.2.2 Dilution des huiles de canola chauffées

Nous avons utilisé deux échantillons d'huiles chauffées pendant 10 et 13h afin de déterminer la concentration idéale de la solution d'huile adéquate pour nos expériences. Les huiles chauffées pendant 10 h et 13 h ont été diluées à des concentrations de 5,0; 1,0 et 0,5% (v/v). Leur teneur en équivalents de *trans*-2-nonéнал fut mesurée (Tableau 1). La Figure 33 montre le graphique des pentes obtenues pour ces huiles hautement oxydées (10h et 13h de chauffage).

Solutions	Pente ($\text{mM}^{-1} \times \text{s}^1$)	Concentration équivalente en <i>trans</i> -2-nonénal (mM)
Étalon A	48,88	0,00
Étalon B	46,99	0,00
Huile chauffée 10h (5% v/v)	29,43	0,40
Huile chauffée 10h (1% v/v)	44,70	0,06
Huile chauffée 10h (0,5% v/v)	43,15	0,03
Huile chauffée 13h (5% v/v)	37,28	0,32
Huile chauffée 13h (1% v/v)	39,13	0,07
Huile chauffée 13h (0,5% v/v)	43,94	0,03

Tableau 1 - Concentration équivalente en *trans*-2-nonénal des huiles de canola chauffées 10 et 13h à des concentrations de 5,0; 1,0 et 0,5% (v/v).

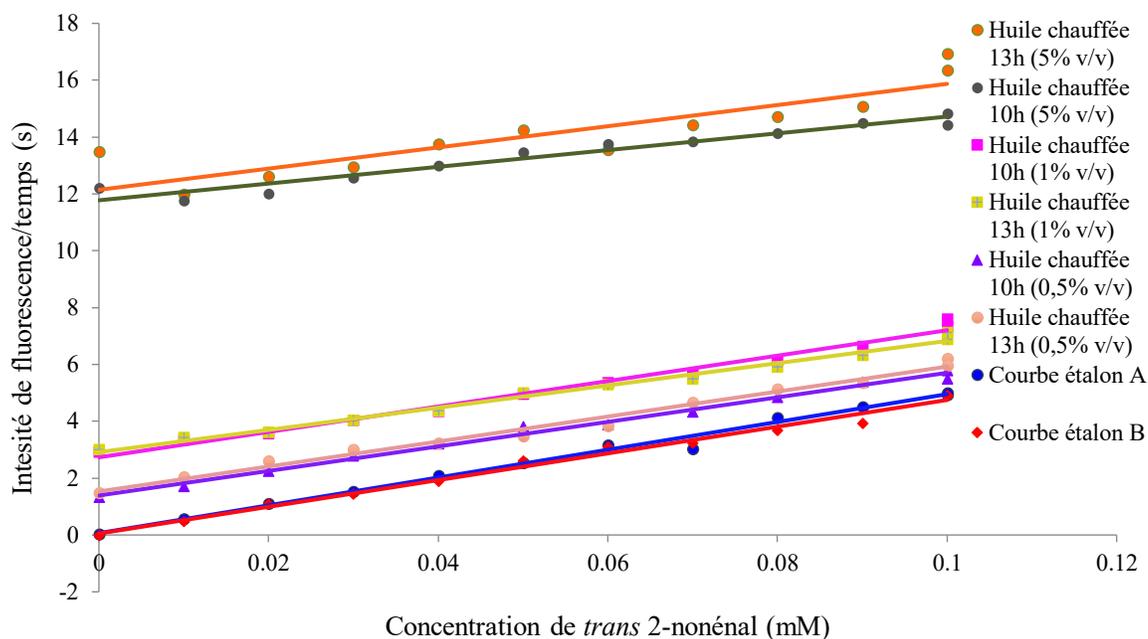


Figure 33 - Courbes d'ajouts dosés de solutions d'huile de canola chauffées pendant environ 10 et 13 heures à diverses concentrations volumiques.

Le graphique ci-dessus montre que pour une concentration en huile chauffée de 0,5% (v/v), les droites sont pratiquement parallèles et les coefficients de corrélation sont très proches avec la courbe étalon. Ainsi, une concentration de 0,5% (v/v) a été choisie pour les huiles très oxydées puisque les résultats sont compris dans le domaine de linéarité choisi.

Par la suite, nous avons choisi l'utilisation d'une masse équivalente à 50 mg dans un ballon de 10 mL (0,5% m/v) car il est difficile de prélever correctement 50 μ L d'huile visqueuse. Ainsi, l'étude des huiles de canola chauffées (0,5% m/v) entre 0 et 6h a démontré que l'huile chauffée pendant 6 heures contient l'équivalent d'environ 3 fois la concentration en électrophiles que l'huile non chauffée (Figure 34). En faisant un étalonnage des vitesses avec le *trans*-2-nonénal comme électrophile étalon, nous avons aussi établi le graphique des ajouts dosés (Figure 35).

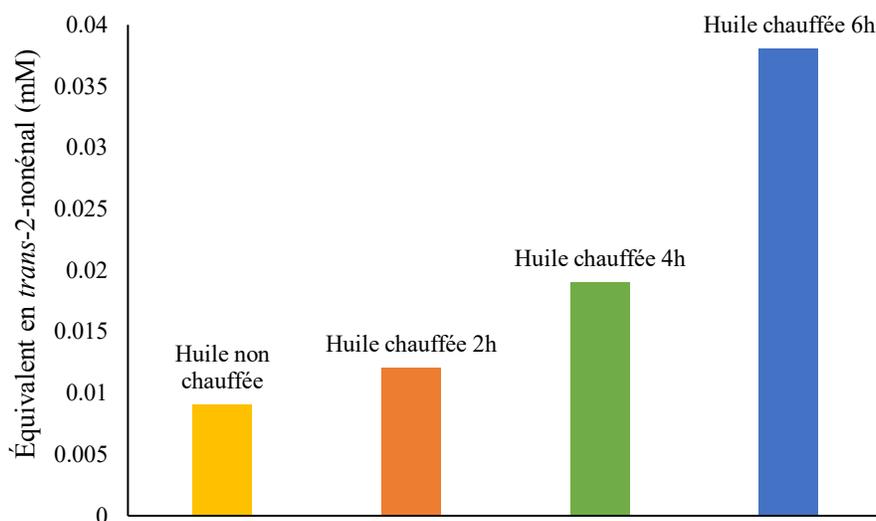


Figure 34 - Comparaison du contenu d'électrophiles, rapporté en équivalents de *trans*-2-nonénal pour les huiles de canola chauffée à 180°C de 0 h à 6 h.

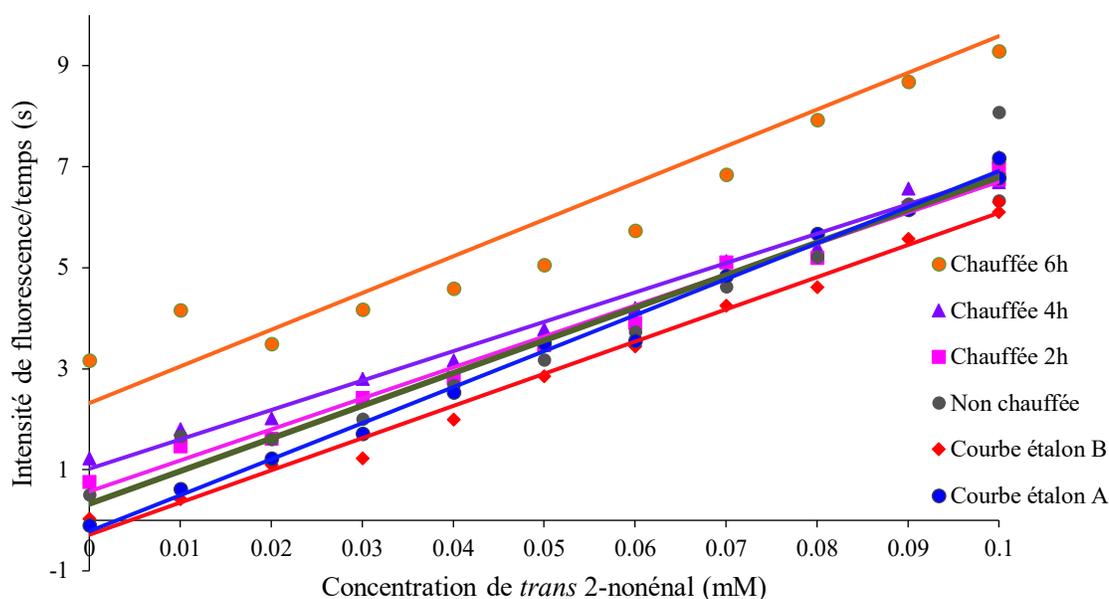


Figure 35 - Courbes d'ajouts dosés de solution d'huiles de canola chauffées de 0 à 6 h, diluées à 0,5 % (m/v).

Les courbes obtenues suite aux ajout dosés (Figure 35) présentent un faible coefficient de corrélation ($R^2 < 0,98$) alors ces résultats doivent être considérés au mieux comme qualitatifs. Il est fort probable que ces manques de corrélation soient causés par l'évaporation rapide du solvant tout au long de l'analyse et de la préparation de la microplaque.

Avec les courbes presque superposées des huiles chauffées de 0-4 h, nous avons tenté d'estimer la limite de détection de la méthode (LDM). Le calcul du ratio de conformité R nous permet de déterminer la validité d'une démarche pour l'établissement d'une limite de détection. Généralement, le ratio de conformité R de la moyenne des répliques sur la LDM calculée peut être acceptable s'il est supérieur à 4 (CEAEQ, 2015). Si l'on suppose que l'incertitude du signal est égale à l'écart-type, on obtient un ratio de conformité $R \leq 3$ (Tableau 2) pour nos huiles chauffées de 0 à 6h, qui se situe hors de

l'intervalle acceptable ($4 < R < 10$). Dès lors, il n'a pas été possible d'estimer la limite de quantification.

Huile	Pente ($\text{mM}^{-1} \times \text{s}^1$)	Concentration en <i>trans</i> 2-nonéanal extrapolée (mM)	Masse d'huile (mg)	Concentration d'électrophile dans l'huile ($\mu\text{mol/g}$)	R
Étalon A	71,3	0	50	0	
Étalon B	63,7	0	50	0	
Non chauffée (0h)	64,7	0,009 \pm 0,005	50	10 \pm 6	1
Chauffée 2h	61,3	0,012 \pm 0,002	48	15 \pm 3	2
Chauffée 4h	58,2	0,019 \pm 0,002	51	22 \pm 3	3
Chauffée 6h	72,6	0,038 \pm 0,008	67	34 \pm 7	3

Tableau 2 - Équivalent en *trans*-2-nonéanal dans les huiles de canola oxydées et calculs du ratio de conformité.

3.2.3 Analyse par détermination de l'indice de *p*-anisidine

La méthode de l'indice d'anisidine (*p-AV*) mesure les composés d'oxydation secondaires comme les aldéhydes dans une substance lipidique polyinsaturée selon la norme ISO 6885. Pour déterminer *p-AV*, une solution de l'huile dans l'isooctane est mise à réagir avec de la *p*-anisidine dans de l'acide acétique glacial pour former des produits de réaction jaunâtres. L'indice d'anisidine (*p-AV*) est ensuite déterminé à partir de l'absorbance mesurée à 350 nm, avant et après réaction. L'indice de *p*-anisidine a été obtenu pour ces huiles de canola chauffées de 0 à 6h (Tableau 3). Ceci nous a permis de comparer qualitativement notre méthode de C-SH à la méthode normalisée ISO (Figure 36). On remarque une tendance croissante linéaire de l'indice de *p*-anisidine en fonction du temps de chauffage.

Huile	Masse (mg)	Absorbance sans <i>p</i> -anisidine	Absorbance avec <i>p</i> -anisidine	<i>p</i> -AV moyen
Non chauffée (0h)	60,0	0,013	-0,005	-2,71 ± 0,6
	56,0	0,015	0,002	
Chauffée 2h	73,0	0,106	0,643	80 ± 20
	49,0	0,095	0,348	
Chauffée 4h	53,0	0,077	0,767	157 ± 3
	49,0	0,050	0,676	
Chauffée 6h	57,0	0,136	1,054	197 ± 2
	57,5	0,115	1,033	

Tableau 3 - Indice de *p*-anisidine moyen des huiles de canola chauffées à 180°C de 0h à 6h.

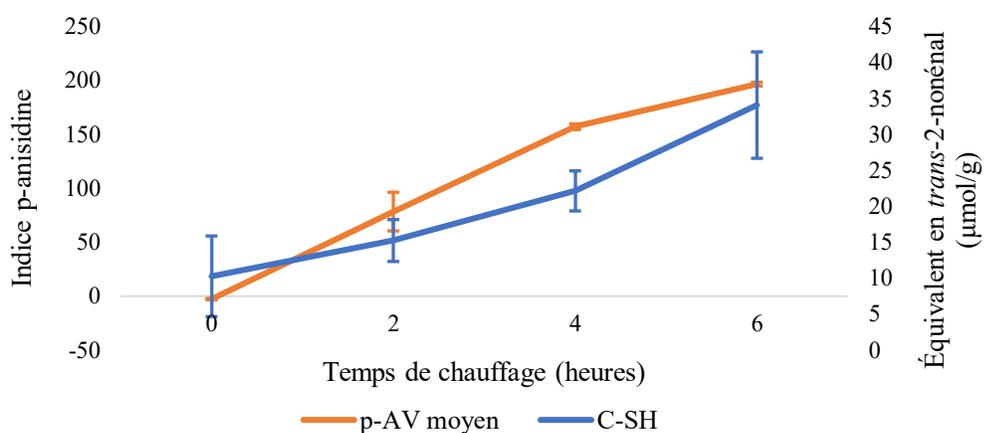


Figure 36 - Comparaison des valeurs d'indice de *p*-anisidine et de concentration de *trans*-2-nonénel dans l'huile de canola chauffée à 180°C de 0h à 6h.

Les premières lectures d'absorbance pour l'huile non chauffée présentent des valeurs négatives. Il est fort probable que l'huile n'ait pas assez d'aldéhydes pour obtenir un signal qui dépasse le bruit de fond (Plard, Le Dréau, Rébufa, & Dupuy, 2016). La *p*-anisidine utilisée pour ces expériences présentait des impuretés ce qui risque de

modifier le coefficient d'extinction molaire de la solution et son absorbance. Un grand désavantage de cette méthode couramment utilisée est que la *p*-anisidine s'oxyde facilement en produits très foncés, ce qui causent évidemment des interférences dans la mesure de l'absorption. Cependant, on a réussi à développer une méthode éventuellement comparative à celle du C-SH que nous avons développé.

3.3 Limites de la méthode

Dans nos analyses, nous assumons que tous les adduits du C-SH sur les électrophiles donnent des produits avec rendement quantique de fluorescence semblables à celui du C-SR. Cette hypothèse, quoique non vérifiée, semble valide puisque le système aromatique responsable pour la fluorescence est le même pour tous les produits.

Comme mentionné avant, un des plus grands problèmes avec la méthode est l'évaporation du solvant. Le solvant choisi doit être capable de dissoudre à la fois l'huile, la proline et le C-SH. De plus, le solvant doit être capable d'accepter le proton du thiol du C-SH afin de former l'anion à l'état excité qui n'émet pas de fluorescence. Le chloroforme:éthanol 1:1 (v/v) est le meilleur choix parmi ceux testés en laboratoire, mais ce solvant est tout de même assez volatil. Ainsi, il est nécessaire de travailler très rapidement lors de la préparation des microplaques—ceci rend la méthode difficile à exécuter de façon reproductible et précise.

En outre, la méthode est encore loin d'être optimisée : le système de solvant très volatil a un impact significatif sur l'obtention des résultats adéquats, car à trop grande concentration, l'augmentation de la fluorescence n'est plus linéaire due à l'effet d'écran et à des phénomènes de réabsorption de photons émis. Donc un des problèmes majeurs

rencontrés était l'effet écran de la couleur de l'huile. Étant donné que la longueur d'onde d'émission se situe entre 415 et 420 nm, une couleur jaune trop intense est capable d'absorber la fluorescence émise ou encore le rayon incident à 365 nm. Certaines huiles, dont celle de frites A&W, n'avaient pas de résultats concluants, car l'absorption de l'huile jaunâtre était trop intense pour compléter l'analyse. Généralement, ce problème peut être contourné en diluant davantage l'huile. Cependant une trop grande dilution diminue la concentration d'électrophiles en dessous de la limite de détection. Une sonde fluorescente capable d'absorber des longueurs d'onde plus élevées serait idéale pour contourner ce problème. Cependant, un thiol conjugué présentant un système aromatique plus conjugué souffrira certainement d'oxydation prononcée—le C-SH s'oxyde lentement en disulfure, mais heureusement ce produit ne contribue pas à la fluorescence.

Une sonde idéale absorberait à des longueurs d'ondes plus longues, soit dans le visible, pour qu'il n'y ait pas d'interférence par les autres espèces absorbantes. Avec une telle sonde, il serait envisageable et très désirable de l'utiliser pour faire la détection d'électrophiles en milieu cellulaire ou biologiques.

4. CONCLUSION

Nous avons développé une sonde nucléophile pré-fluorescente le 7-mercapto-4-méthylcoumarine (C-SH) qui peut détecter les électrophiles dans les huiles alimentaires. Un grand avantage de la méthode par sonde fluorescente par rapport aux techniques HPLC ou GC est la rapidité des analyses et le peu de préparations nécessaires avant l'analyse des aliments. En effet, avant d'injecter un échantillon d'huile alimentaire sur une colonne chromatographique, plusieurs étapes de préparation sont nécessaires. Une de ces étapes préparatoires pourrait réduire le taux d'électrophiles de façon importante : la saponification des triglycérides. La présence de base et de chaleur pourrait certainement causer une réaction avec les cétones α,β -insaturées ce qui diminuerait la valeur du taux d'électrophiles reportés.

Pour notre méthode d'analyse par fluorescence, le protocole pour l'analyse des électrophiles dans les patates frites, par exemple, ne requiert qu'une extraction au dichlorométhane suivie d'une évaporation à basse température. L'analyse par fluorescence des huiles peut être effectuée sans traitement additionnel.

La technique développée se base sur l'ajout dosé d'un électrophile standard, le *trans*-2-nonenal, qui sert à quantifier les électrophiles trouvés dans nos échantillons pour en reporter un « indice d'électrophilicité ». La cinétique de l'augmentation de fluorescence dans notre système est proportionnelle à la concentration de ces électrophiles et peut être reportée en « équivalents de *trans*-2-nonenal ».

Globalement, les résultats présentés permettent de prouver que notre méthode a le potentiel d'être une méthode analytique standardisée pour quantifier le degré

d'oxydation des huiles alimentaires. Avec cette méthode, il deviendrait facile pour les entreprises d'ajouter le test d'électrophilicité à leur test de routine sur leurs aliments vendus. Éventuellement, cette mesure du taux d'électrophilicité des différents aliments pourrait informer les consommateurs comme sur cet aspect de la qualité nutritionnelle des aliments ou le fait quantité de gras trans. Si plus de tests sont effectués sur les effets des électrophiles sur la santé, il serait envisageable d'afficher cette donnée sur les étiquettes des produits alimentaires. Il est toujours intéressant d'avoir des informations sur les produits que l'on consomme. Nous avons réussi à étudier la cinétique de premier ordre de la réaction ainsi que déterminer la concentration idéale pour des huiles très oxydées. Néanmoins, il n'a pas été possible d'estimer la limite de détection de la méthode. Aussi, la méthode proposée d'analyse du C-SH permet d'évaluer la concentration d'électrophiles dans l'huile sans avoir à manipuler un acide fort comme l'acide acétique glacial contrairement à l'indice de *p*-anisidine ou par une étape de saponification comme demande les méthodes chromatographiques.

Les recherches démontrent de plus en plus que les électrophiles sont nocifs pour la santé. Serait-il possible d'ajouter une molécule aux huiles qui neutraliserait les électrophiles avant que ceux-ci ne réagissent avec nos protéines ou notre ADN? Un peu comme les antioxydants, ces molécules ajoutées seraient des anti-électrophiles qui réagiraient avec les électrophiles. Bien sûr, cette molécule anti-électrophile ne doit pas être nocif pour la santé. Certainement, beaucoup de développements sont à venir dans l'étude de l'oxydation des huiles et de leurs effets sur notre santé.

PARTIE B. DÉVELOPPEMENT D'INDICATEUR COLORIMÉTRIQUE IRRÉVERSIBLE DE TEMPÉRATURE CRITIQUE

5.1 Introduction

La température est un facteur déterminant affectant la qualité et la sécurité de plusieurs produits alimentaires. Lorsque stockés ou transportés à l'extérieur de la plage de température requise, les aliments ou médicaments peuvent voir leur durée de vie diminuer de manière significative. La sécurité alimentaire devient un sujet de plus en plus important pour les réseaux d'approvisionnement mondiaux. Par conséquent, il est essentiel de surveiller la température dès les premières étapes de fabrication jusqu'à l'utilisation du produit (Gooch & Felfel, 2014). Pour certains vaccins et produits pharmaceutiques, la « chaîne du froid » est absolument critique lors du transport. Cette chaîne de froid est particulièrement difficile à maintenir dans les pays chauds d'Afrique.

Le problème à contrôler l'historique de la température des produits alimentaires ou pharmaceutiques rend difficile la prévision précise de la durée de conservation. Les indicateurs temps-température (TTI) fournissent un résumé visuel de l'historique de la chaîne de refroidissement accumulé d'un produit, enregistrant les effets du temps et de la température (Prusik, Arnold, & Piechowski, 2003).

Des tentatives ont été faites pour développer un prototype d'indicateur temps-température. Certains dispositifs sont fondés sur la diffusion d'un colorant à travers un papier filtre, tandis que d'autres sont basés sur une réaction enzymatique. Ces derniers sont basés sur un changement de couleur provoqué par une diminution du pH, due à

une hydrolyse enzymatique contrôlée d'un substrat lipidique. Avant l'activation, la lipase et le substrat lipidique sont dans deux cellules distinctes ou compartiments. À l'activation, la barrière qui les sépare est cassée, l'enzyme et le substrat sont mélangés et le changement de couleur se produit (Giannakourou & Taoukis, 2003), c'est le cas de l'indicateur VITSAB CheckPoint® Time Temperature Indicator (Figure 37). Un autre type de TTI sur le marché, le « TypCyro », est basé sur la croissance de souches de bactéries non pathogènes productrices d'acides qui causent un changement de couleur avec la baisse en pH (Robertson, 2012). Deux autres TTI commerciaux sont basés sur une réaction de photo-activation d'une benzopyridine photochromatique qui change de couleur avec la lumière pour être activée et suivi d'un deuxième changement de couleur, lorsqu'exposé à une température élevée. Les TTI « Fresh meter » et « Onvu » fonctionnent sur ce principe. Il existe aussi le TTI à base de polymère, il s'assombrit de manière irréversible plus rapidement à haute température et plus lentement à basse température. L'intensité du polymère coloré est produite par polymérisation de monomères c'est l'exemple de l'indicateur « Fresh check » (Wang et al., 2015).

Dans tous les cas, le TTI doit être activé manuellement à basse température pour prévenir une réaction de l'indicateur avant qu'il soit affixé sur l'item. Le TTI doit ensuite changer de couleur lorsqu'une température critique est atteinte et, idéalement, entreprendre un deuxième changement de couleur qui indique combien de temps cette température critique fut dépassée. Notre projet tente de répondre à ces critères de façon simple et économiquement viable.

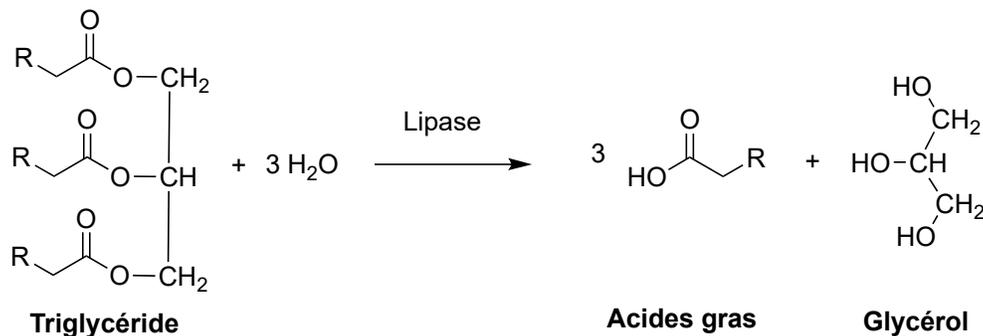


Figure 37 - Fonctionnement du TTI Enzymatique : L'hydrolyse du triglycéride provoque la libération d'acides carboxyliques et la chute de pH induit le changement de couleur d'un indicateur du vert foncé au rouge orange.

5.1.1 Objectif de la recherche

Le but du projet consiste à développer un indicateur de temps et température peu coûteux, pouvant montrer un changement facilement mesurable, dépendant du temps et de la température, et indiquant de manière cumulative l'historique de la température du produit à partir de la fabrication jusqu'au consommateur. Dans la mesure où les changements physiques dans l'indicateur correspondent au taux de dégradation du produit, l'indicateur va aider à indiquer une dégradation probable et irréversible de l'aliment ou du produit pharmaceutique.

5.1.2 Théorie du projet

Idéalement, notre intégrateur de temps et température pourra détecter le dépassement d'une température critique avec un changement de couleur irréversible, puis un deuxième changement de couleur si ce dépassement est maintenu pour un temps donné. La détection du dépassement de la température critique repose sur le point de fusion— tout simplement, notre solution indicatrice demeure solide jusqu'à ce que la température critique soit atteinte, et ensuite, devient liquide. Le point critique de fusion est la température à laquelle notre substance passe de l'état solide à l'état liquide sous la pression atmosphérique. Le substrat contient une solution basique et causera un changement immédiat avec les indicateurs de pH. Après quelques heures, la couleur va changer irréversiblement. L'indicateur pH le plus connu est le papier pH et nous utilisons ce matériel comme point de départ pour bâtir notre intégrateur de temps et température. Notre conception de TTI sera basée sur un changement de couleur pour alerter l'utilisateur que la température critique de fusion fut atteinte et ainsi que le produit est inutilisable. Globalement, le changement de couleur dépend du temps de réaction et de la température. Le TTI représente l'historique temps-température du produit. Dans la Figure 38, le protocole initial des essais sur lequel repose le concept du TTI est schématisé, avant l'atteinte du point critique de fusion et après.

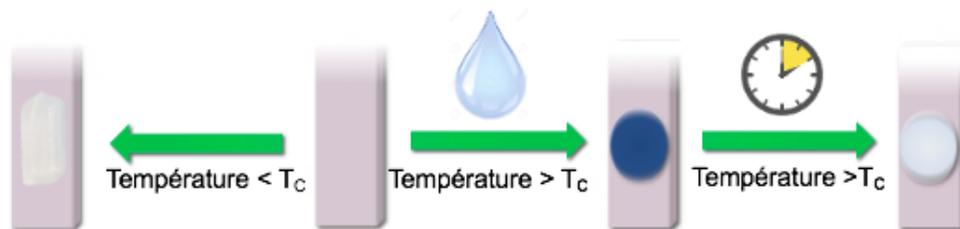


Figure 38 - Protocole et concept général du TTI : à gauche la réaction lorsque la température est inférieure à la température critique il n'y a aucun changement (le

substrat reste cristallisé), à droite la réaction lorsque la température critique de fusion est atteinte.

Ainsi, l'indicateur ou « Time Temperature Indicator » (TTI) est un appareil qui représente un résumé visuel de l'historique de la chaîne de refroidissement accumulé d'un produit, enregistrant les effets du temps et de la température suivant des changements colorimétriques.

Idéalement notre design de TTI devrait avoir les propriétés suivantes :

- Un système basé sur une réaction colorimétrique de fusion irréversible
- Un changement colorimétrique graduel avec des indicateurs pH ou colorants
- Un système qui dépend seulement du temps et température
- Une méthode d'activation claire et simple
- Un appareil petit, peu coûteux et facile à intégrer dans l'emballage alimentaire/pharmaceutique
- Un appareil non toxique en raison de sa proximité avec les produits alimentaires/pharmaceutiques

5.2 Matériels et méthodes

5.2.1 Matériels utilisés

La température critique est déterminée par le point de fusion d'une solution basique (KOH) de mélange dodécanol : décanol qui peut donner un TTI activé entre 3°C et 25°C. Le dodécanol (98% pureté) décanol (99%) et l'hydroxyde de potassium solide (85%) ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich.

Le dodécanol est un alcool gras sous forme de solide incolore a été choisi à cause de sa température de fusion 24°C. Le décanol est aussi un alcool gras sous forme de liquide visqueux incolore présentant une température de fusion de 6,4°C. Ces alcools ont été choisis puisqu'ils ont une faible toxicité et qu'ils peuvent former des mélanges avec différents points de fusion (Figure 39).

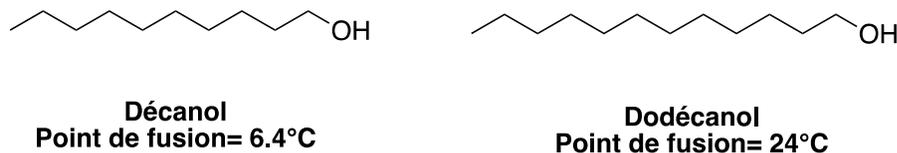


Figure 39 - Structure des alcools utilisés.

L'hydroxyde de potassium est dissous dans ces alcools pour causer les changements de couleur du papier pH. Un équilibre acido-basique entre le KOH et les alcools est attendu (Figure 40).



Figure 40 - Réaction entre le dodécanol et l'hydroxyde de potassium.

Comme dans plusieurs exemples cités, dans notre approche nous allons utiliser des indicateurs pH pour obtenir des changements de couleurs clairs. Certains indicateurs pH sont connus pour être instables à pH élevé par exemple, la phénolphthaléine passe de clair à mauve à pH élevé, mais devient incolore avec le temps. Ainsi la sélection de ces indicateurs s'est basée sur leur zone de virage, car on cherche un indicateur qui vire au rouge à la forme basique. On a eu les meilleurs résultats avec l'*Alizarine Yellow R*. Pour obtenir une couleur bleu verdâtre du départ, nous avons testé plusieurs indicateurs, mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec le thymolphthaléine et le vert de malachite. Le thymolphthaléine est incolore en milieu acide et bleu en milieu basique. Le vert de malachite est utilisé comme indicateur coloré dans les dosages acido-basiques. Ce dernier possède trois formes différentes caractérisées par différentes couleurs donc sa forme très acide est verte, la forme classique est aussi verte et tandis qu'en milieu basique il devient incolore.

Le thymolphthaléine : zone de virage (pH 9,3 à pH 10,5), l'*Alizarine Yellow R* (pH 10,1 à pH 12,2) et le vert malachite oxalate (pH 1,8 à pH 13,2), ont aussi été achetés auprès de Sigma-Aldrich (Figure 41).

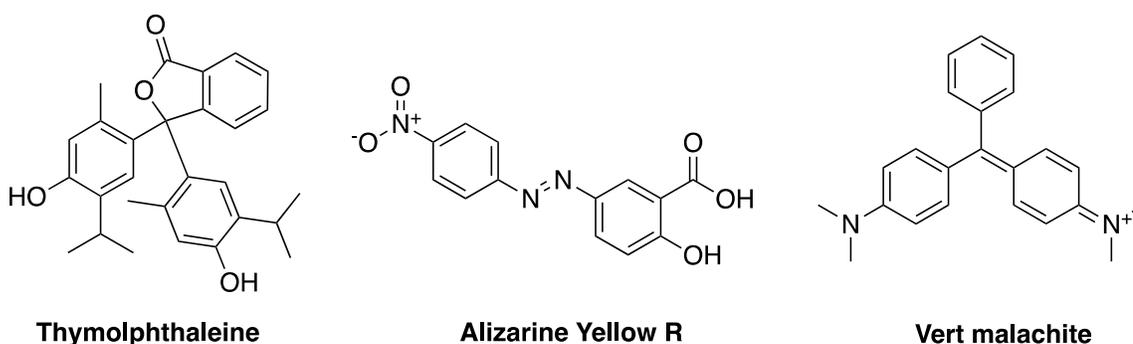


Figure 41- Structures des indicateurs colorés de pH utilisés.

Dès l'atteinte de la température critique de fusion, le TTI va changer de couleur irréversiblement grâce à l'action des indicateurs colorimétriques.

5.2.2 Méthodes

Les points de fusion ont été déterminés par calorimétrie différentielle à balayage marque «Mettler Toledo» (connu sous l'acronyme *DSC* pour *Differential Scanning Calorimetry*). Cette technique d'analyse thermique mesure les différences des échanges de chaleur entre une référence et un échantillon à analyser. Les analyses sont réalisées sous balayage d'un gaz (l'azote, l'hélium ou l'argon) afin d'éviter toute réaction entre l'échantillon à étudier avec l'atmosphère du four. Lors de l'analyse, la position de certains matériaux (ou échantillons) à l'intérieur de la DSC peut varier, car l'appareil subit des changements de température importants. Ainsi, il est important de bien calibrer les échantillons à analyser avant de commencer (Dean & Dean, 1995). Les résultats fournis par DSC sont réalisés par rapport à un thermocouple positionné entre l'échantillon et la référence : le zinc dans notre cas et l'ensemble des calculs sera traité par l'interface informatique de l'appareil.

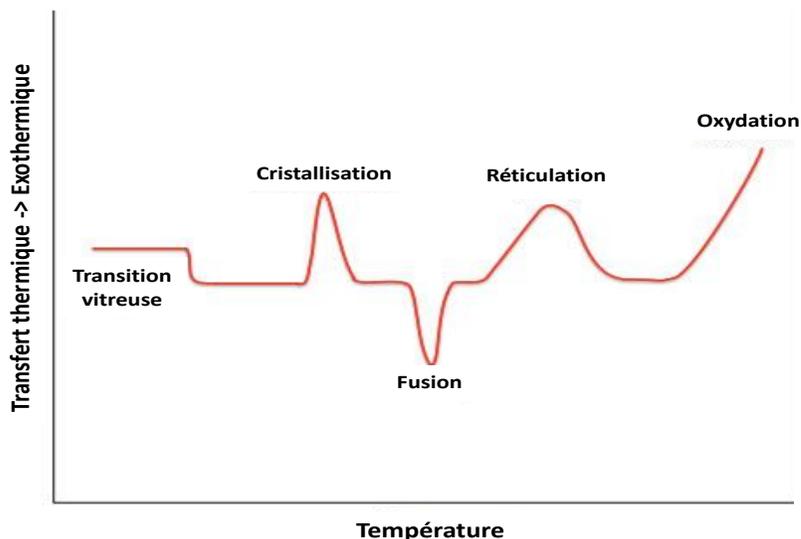


Figure 42 - Exemple de thermo gramme DSC et les différents échanges de chaleur possibles avec cette méthode.

Ainsi, la calorimétrie différentielle à balayage représente une méthode d'essai standard pour les températures de transition, les enthalpies de fusion et de cristallisation de différents matériels (polymères, cristaux liquides, etc). Cette technique a été choisie pour précisément mesurer les transitions de phases entre les échantillons de différentes proportions de dodécanol et décanol et l'estimation des points de fusion de différents mélanges à analyser.

Comme les indicateurs TTI doivent être lus par le changement de couleur, l'analyse visuelle fut la méthode principale utilisée. Un environnement d'illumination contrôlé a été fabriqué pour obtenir des photos reproductibles et comparables de jour à jour. Pour les changements de couleur qui se sont produits en solution, la spectroscopie UV-Visible fut employée. En utilisant la spectroscopie UV-Visible (longueur d'onde 200 à 800 nm), on a pu comparer la détérioration ou le pâlissement des applications sur papier pH ou filtre au cours du temps.

5.2.3 Description des méthodes

Nous avons préparé des solutions d'alcools (mélanges de décanol et/ou dodécanol) avec du KOH sur différents substrats (papier pH, papier filtre, modification avec indicateur, etc). Les premières expériences ont été réalisées sans hydroxyde de potassium.

Dans la deuxième partie, plusieurs concentrations d'hydroxyde de potassium ont été testées, les meilleurs résultats ont été obtenus avec 0,4 M de KOH. Cette teneur a été ajoutée à chaque échantillon avant l'analyse DSC. Les tests sont décrits dans le tableau 4.

Échantillon	Dodécanol (μL)	Décanol (μL)
A	1000	0
B	800	200
C	600	400
D	400	600
E	200	800
F	0	1000

Tableau 4 - Mélanges testés pour estimation des points de fusion par DSC sans KOH.

En résumé, pour obtenir le changement de couleur nous avons utilisé le papier pH initialement avec la base et par la suite il y a eu introduction des indicateurs colorimétriques (Figure 43). Avec un indicateur, on prépare des solutions diluées des indicateurs colorés avec de l'éthanol puis on imbibe les papiers pH (ou filtre) avec la solution de l'indicateur coloré qui sont ensuite laissés sécher à l'air. On fait l'ajout des mélanges basiques déjà préparés pour obtenir un changement de couleur transitionnel (du vert ou bleu vers le rouge idéalement), chaque couleur indiquerait un laps de temps précis depuis que le produit a atteint la température critique de fusion.

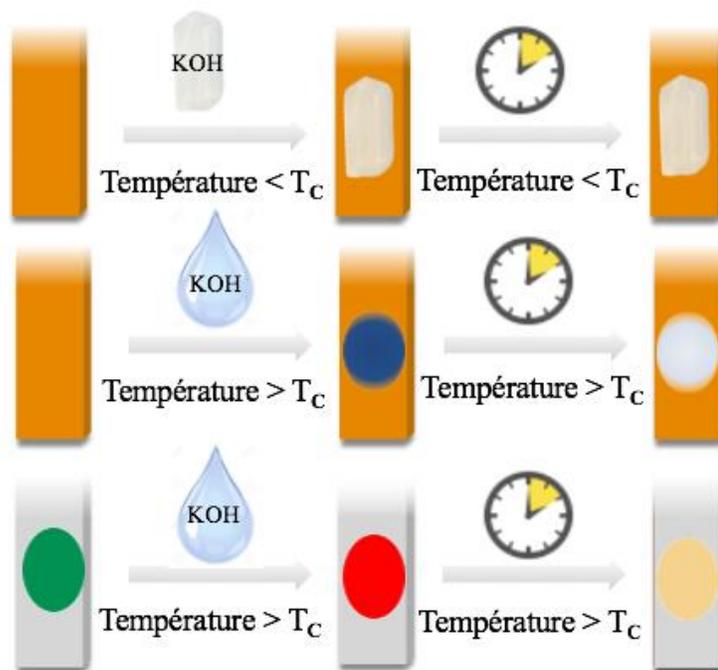


Figure 43 - Protocole de fonctionnement du TTI : en haut la réaction sur papier pH lorsque la température est inférieure à la température critique il n'y a aucun changement, en deuxième position la réaction lorsque la température critique de fusion est atteinte, en bas la réaction sur papier filtre avec l'Alizarine Yellow R et le vert malachite lorsque la température critique de fusion est atteinte.

La préparation de l'appareil TTI se fait par l'ajout d'une solution d'éthanol contenant l'indicateur sur le papier filtre qui est ensuite laissée évaporée. Le mélange approprié des matériaux choisis (e.g., dodécanol, décanol, KOH) est ensuite fondu et homogénéisé. Pour les tests, une goutte du mélange basique, qui est liquide à température ambiante, est ajoutée sur la partie colorée du papier filtre pour démarrer le temps « zéro » de l'expérience. Les changements de couleurs sont mesurés par photographie en fonction du temps.

5.3 Résultats et discussions

5.3.1 Estimation des températures de fusion

Pour déterminer la quantité idéale de chaque alcool à mettre dans notre TTI (sans ajout de l'hydroxyde de potassium), pour que ce dernier reste cristallisé en dessous de la température critique de fusion, nous avons utilisé la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Ainsi, nous avons pu obtenir les points de fusion des solutions de dodécanol et décanol (Figure 44).

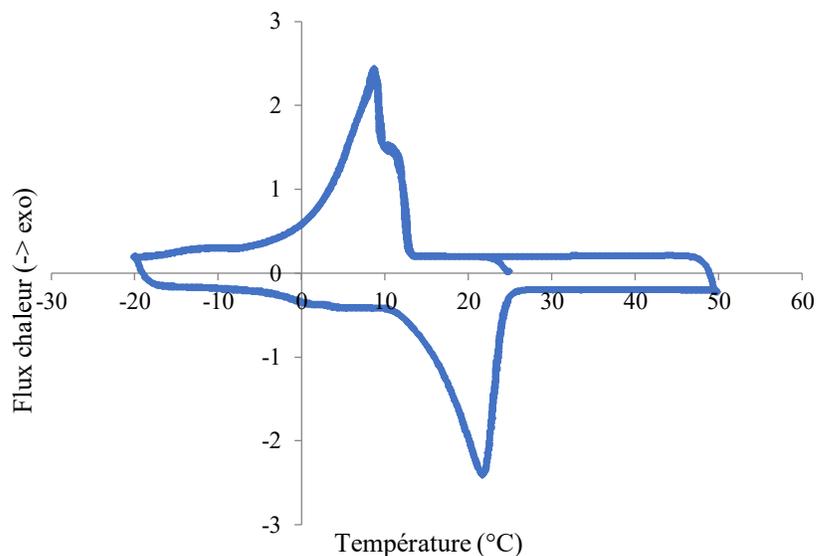


Figure 44 - Exemple de thermogramme obtenu avec le mélange de dodécanol/décanol 9:1 (v/v), sans KOH; le pic en bas représente la température de fusion et celui du haut indique la température de cristallisation pour ces expériences.

À partir des valeurs données par ces thermogrammes nous avons construit le graphique des températures de fusion du mélange dodécanol : décanol (Figure 45). Ces analyses ont été répétées plusieurs fois pour obtenir des résultats reproductibles.

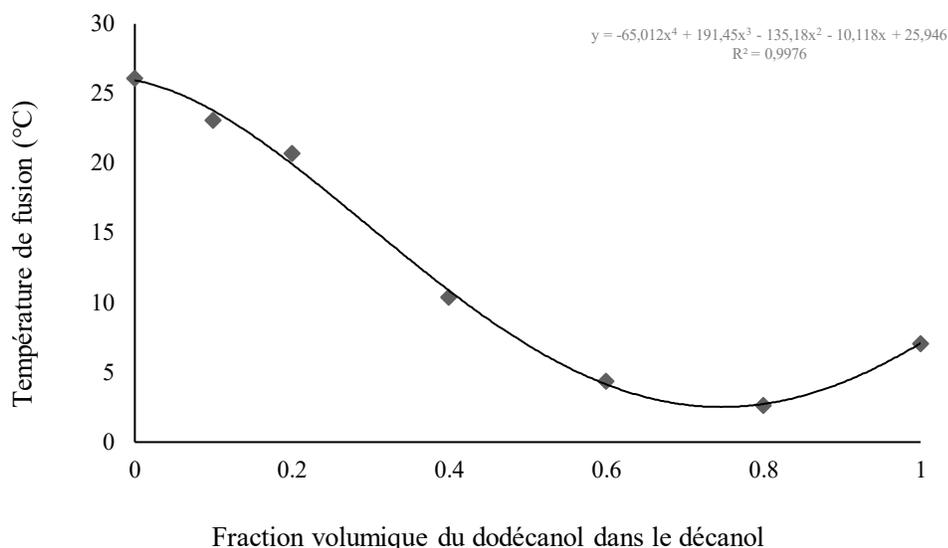


Figure 45 - Température de fusion obtenue par DSC pour des mélanges de décanol et dodécanol.

Nous remarquons que les températures de fusion varient de 3°C pour 4:1 (v/v) de dodécanol:décanol jusqu'à 26°C pour le dodécanol pur. La fraction volumique de 3:2 (v/v) en dodécanol:décanol montre un point de fusion de 5 à 8°C qui est idéal pour le monitorat d'aliments/vaccins/etc qui doivent demeurer au réfrigérateur (typiquement 4°C). Si l'indicateur est réchauffé au-dessus de 8°C, le mélange de dodécanol:décanol va fondre et permettra une réaction colorimétrique.

Dans notre cas, nous avons optimisé les changements de couleur avec une base forte, soit le KOH à 0,4 M. En plus de causer les changements de couleur d'indicateurs par le changement de pH (le TTI vire au bleu), cette concentration élevée de base cause un changement de couleur secondaire lié à la dégradation chimique de l'indicateur. Ce deuxième changement de couleur servira comme rapporteur de temps au-delà de la température critique. Les températures de fusion des mélanges dodécanol:décanol en

présence de 0,4 M de KOH furent aussi mesurées par les mêmes analyses DSC (Figure 46).

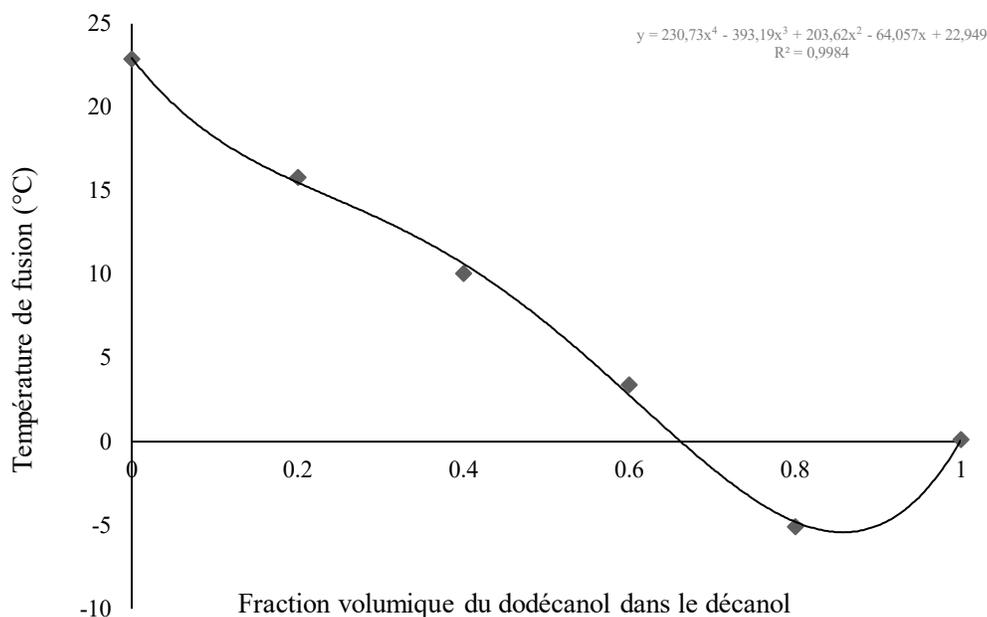


Figure 46 - Température de fusion obtenue par DSC pour des mélanges de décanol et dodécanol avec 0,4 M KOH.

Les températures critiques varient de -5°C pour 3:2 (v/v) de dodécanol: décanol et de 23°C avec du dodécanol/KOH. On remarque que les points de fusion diminuent considérablement avec l'introduction de la base. Cet effet s'explique par la propriété colligative de la solution chimique. Cette caractéristique correspond à la différence entre une propriété colligative donnée d'un solvant pur liquide et la même propriété de ce solvant en présence d'un soluté. La propriété colligative dans notre cas est l'abaissement de la température de fusion du solvant suivant la loi de la cryométrie (McQuarrie, Rock, & Gallogly, 2011). La loi de la cryométrie permet de quantifier la

diminution de la température de fusion (ou de congélation ou solidification) d'un solvant en fonction de la quantité de soluté ajouté.

5.3.2 Résultats primaires sur papier pH

Notre premier choix d'indicateur colorimétrique fut le papier pH. Celui-ci est composé d'un mélange d'indicateurs pouvant donner un éventail de couleurs en fonction du pH. Neutre, le papier pH est orange et passe au bleu en contact avec la solution de KOH 0,4 M dans la decanol:dodecanol. Ce contraste de couleur est très facilement visible et l'indicateur est peu dispendieux et accessible à grande échelle.

Tout d'abord, nous avons testé plusieurs concentrations d'hydroxyde de potassium avec le mélange (3 : 2 (v/v) dodécanol/décanol). Contre intuitivement, la détérioration du papier pH est plus lente lorsqu'on augmente la concentration de l'hydroxyde de potassium de 0,1 M à 0,4 M (Figure 47).

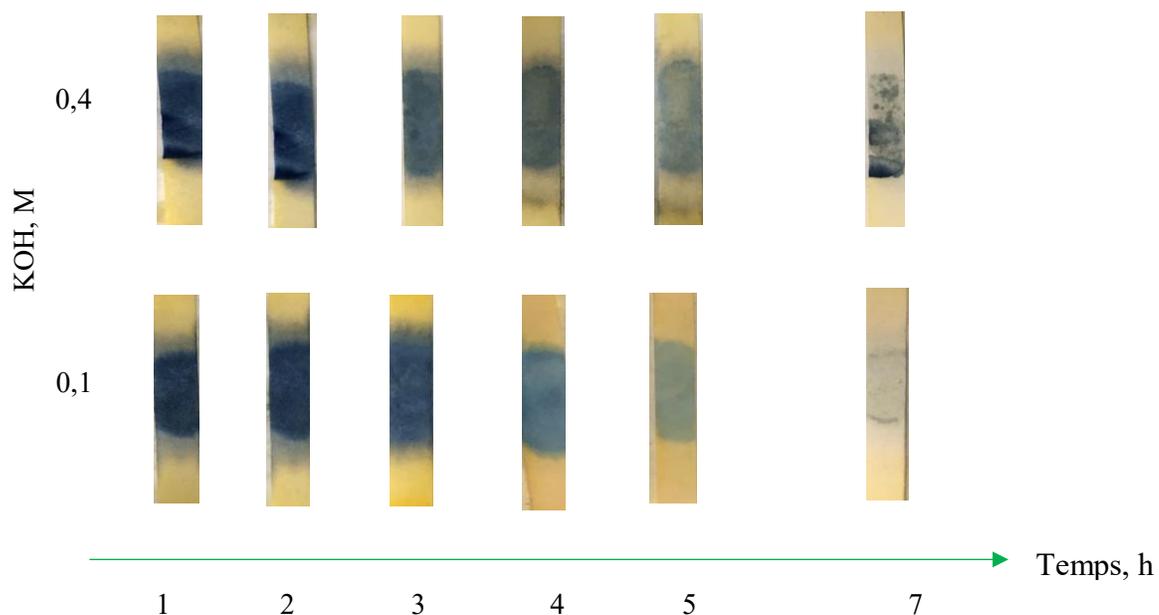


Figure 47 - Photos de languette de papier pH en fonction du temps après l'application d'une goutte de dodécanol:décanol (3:2 v/v) avec 0,4 M (haut) et 0,1 M (bas) de KOH.

Le pâlisement du papier pH est plus rapide à basse concentration de KOH. Ainsi nous avons choisi la concentration de 0,4 M pour nos expériences pour obtenir une calibration du TTI qui dure dans le temps. L'expérience fut répétée plusieurs fois pour déterminer la reproductibilité—un exemple typique est montré en Figure 48.

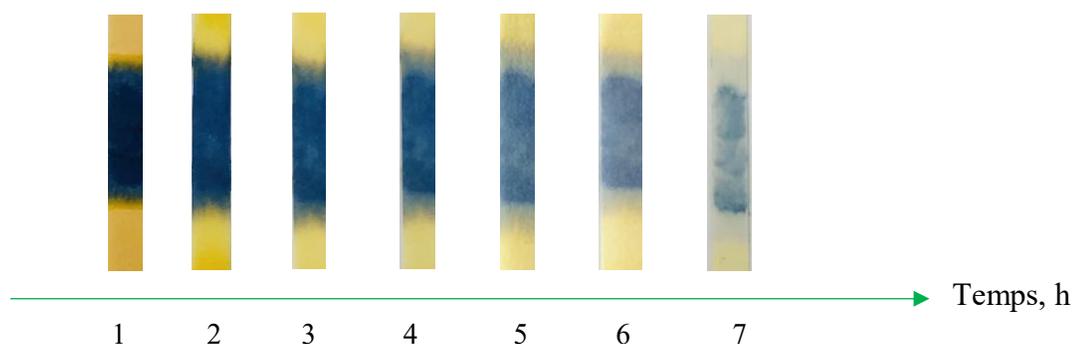


Figure 48 - Détérioration du papier pH à température ambiante avec 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v).

À pH élevé, le pâlisement du papier pH se produit inévitablement avec le temps. Malheureusement, ce deuxième changement de couleur (bleu à bleu pâle) n'est pas aussi clairement visible (Figure 48) et n'est pas idéal pour la conception d'un TTI qui serait lu par un consommateur. L'idéal est d'avoir l'apparition d'une couleur différente après quelques heures.

Un TTI devrait avoir un changement instantané de couleur dès le début de la réaction initié par le dépassement d'une température critique et aussi, un deuxième changement de couleur après quelques heures pour bien calibrer l'historique du temps de l'échantillon au-delà de la température critique. Dans ce but d'obtenir deux changements de couleur facilement lisibles par un consommateur, nous avons exploré

l'utilisation d'une myriade d'indicateurs de pH colorimétriques qui pourrait répondre à nos besoins.

5.3.3 Résultats avec les indicateurs colorés

Nous avons testé plusieurs indicateurs en se basant sur leur zone de virage ; comme le crésol red, le phénol red, le thymol bleu, la curcumine et le clayton yellow car on souhaite que à l'état initial notre TTI est vert ou bleu et à l'état basique il vire au rouge (Tableau 5). Le rouge est une couleur associée à « arrêt » et donc serait bien reconnu comme un danger si l'indicateur indique cette couleur. Le cresol red et le thymol bleu ont fourni des résultats non reproductibles. Ces indicateurs sont très instables avec l'hydroxyde de potassium. Nous présentons ici les meilleurs résultats obtenus spécifiquement avec le thymol phtaléine, l'Alizarine Yellow R et le vert malachite.

Indicateur coloré	Forme acide	Zone de virage	Forme basique
Alizarine Yellow R	Jaune	pH 10,1 à pH 12,2	Rouge
Malachite green	Vert	pH 13,2	Incolore
Cresol Red	Jaune	pH 7 à pH 8,8	Rouge violet
Thymol Bleu	Jaune	pH 8 à 9,6	Bleu
Thymolphtaléine	Incolore	pH 9,3 à pH 10,5	Bleu

Tableau 5 - Différents indicateurs colorimétriques de pH testés et leur zone de virage.

À pH basique l'Alizarine Yellow R vire de jaune à rouge comme le montre cette réaction ci-dessous.

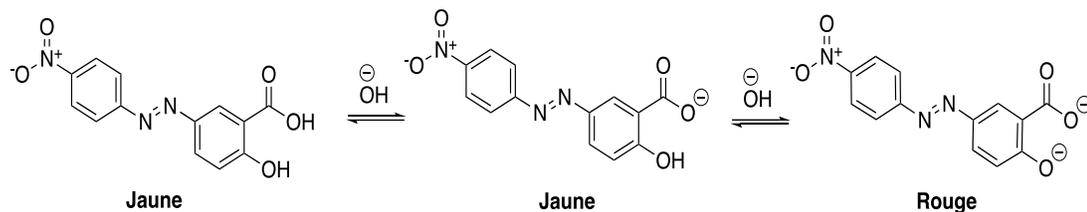


Figure 49 - Réaction de l'Alizarine Yellow R avec l'hydroxyde de potassium.

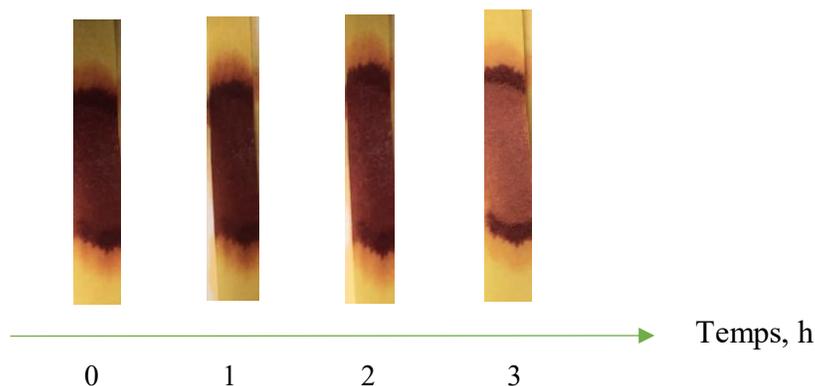


Figure 50 - Applications sur papier pH imbibé d'Alizarine Yellow R avec 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v) à température ambiante.

La première couleur qui apparaît à t_0 est une couleur marron/bordeaux foncé, peu après, il y a apparition de la couleur rouge jusqu'à une couleur rose clair, donc il y a obtention de la couleur rouge souhaitée, mais il n'y a pas un grand changement de couleur après quelques heures. Cependant, grâce à l'Alizarine Yellow R, la couleur sur le papier pH résiste pendant plusieurs heures sans pâlir ou se détériorer contrairement aux premières applications réalisées où la couleur sur papier pH disparaissait complètement après 5 heures.

Le second indicateur coloré de pH testé a été le thymolphtaléine pour obtenir la couleur bleue/verte souhaitée pour le TTI. Le thymolphtaléine est instable, car la couleur bleue ne persiste pas à cause de l'attaque nucléophile du KOH réactif (Figure 51).

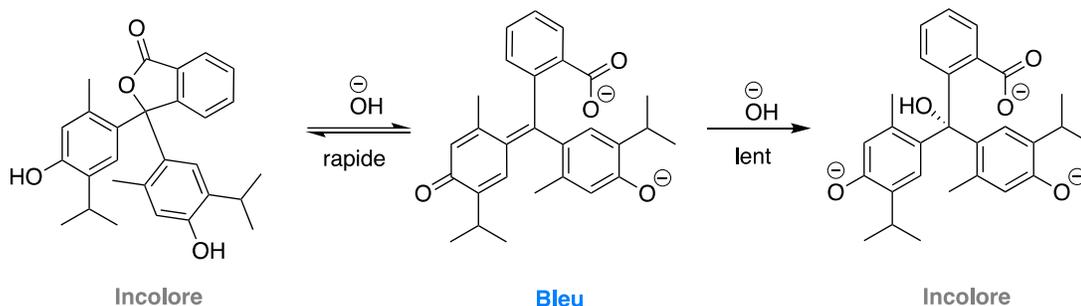


Figure 51 - Réaction du thymolphtaléine avec l'hydroxyde de potassium.

Les prochains essais étaient de mélanger deux indicateurs colorés avec des transitions de couleur différentes, soit l'Alizarine Yellow R (jaune au rouge à pH 10,1 à 12) et le thymol phtaléine (clair au bleu à pH 9,3 à 10,5) pour obtenir un changement colorimétrique claire. En laissant la solution ouverte à l'air, la décoloration de cette solution est plus rapide que lorsqu'elle est déposée sur le papier filtre (Figure 52). Étrangement, la couleur bleue du thymolphthaléine persiste pour des heures si la bouteille à échantillon demeure fermée. On suppose alors que le mécanisme de la dégradation du thymol phtaléine implique l'oxygène de l'air.

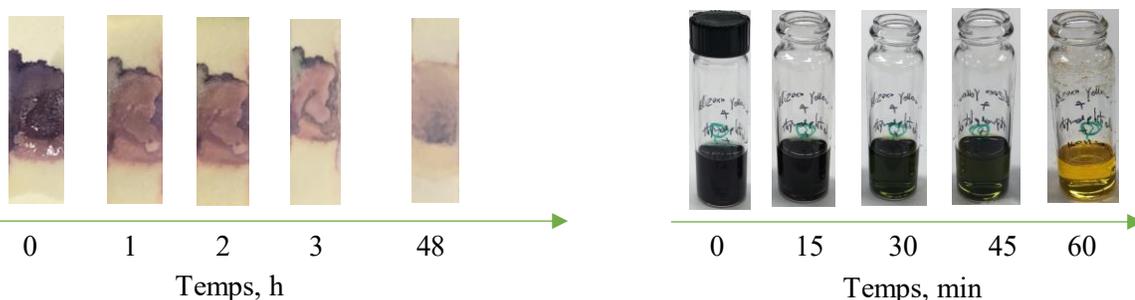


Figure 52 - À gauche : Application sur papier filtre imbibé de solution d'Alizarine Yellow R (0,92 mM) /Thymol phtaléine (0,91 mM) avec 0,4 M KOH dans le dodécaneol:décaneol (3:2 v/v). À droite : Détérioration du même échantillon en phase liquide.

Le spectre d'absorption ci-dessous confirme le même résultat qu'à la Figure 52 : la couleur bleue est instable et se dégrade au cours du temps et que les solutions concentrées en KOH prennent plus de temps à se décolorer. La concentration du KOH dans le mélange est un facteur primordial pour obtenir la meilleure réponse du TTI.

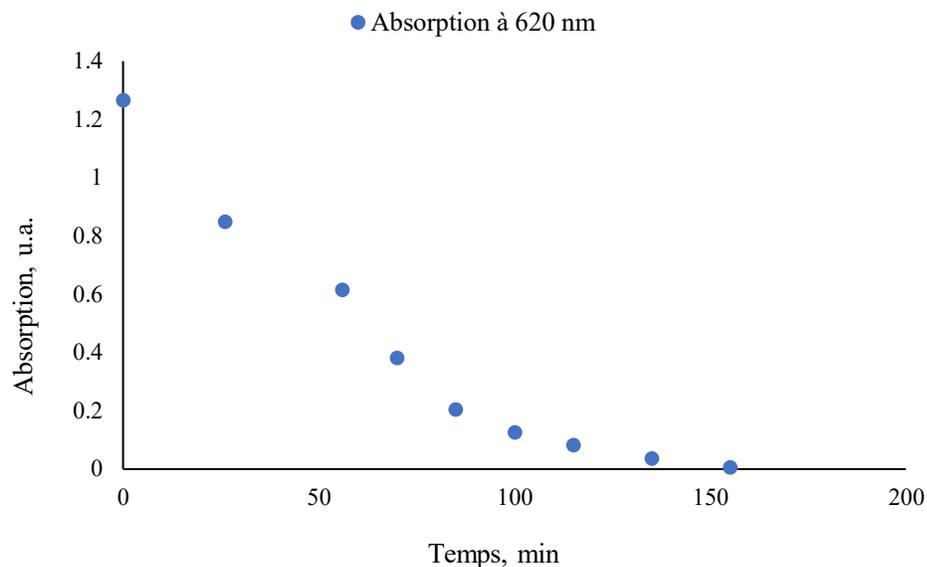


Figure 53 - Absorption à 620 nm de la solution d'Alizarine Yellow R (0,92 mM) et Thymol phtaléine (0,91 mM) en fonction du temps après l'ajout de KOH (0,4 M).

En figure 53, nous observons l'absorption de la couleur rouge de la solution qui diminue jusqu'à extinction ce qui confirme la dégradation de couleur sur papier filtre en fonction du temps. La décoloration au cours du temps fournit une calibration de l'historique de notre indicateur de temps et température. Pour obtenir un changement visuel plus clair sans décoloration, nous avons décidé d'utiliser un autre indicateur de pH.

L'autre indicateur utilisé est le vert malachite qui est un produit chimique principalement connu pour ses qualités de colorant bleu-vert. La délocalisation des électrons et les doubles liaisons conjuguées sont responsables de la coloration verte de la molécule (Figure 54).

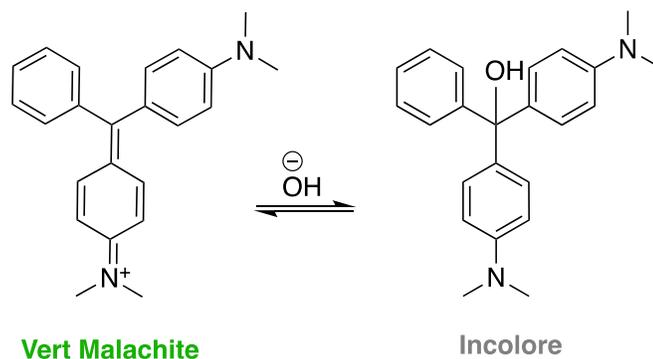


Figure 54 - Réaction du vert malachite avec l'hydroxyde de potassium.

À t_0 , le papier filtre sera imbibé avec un mélange de vert malachite oxalate (vert à pH neutre, puis transparent à pH élevé) et Alizarine Yellow R (jaune à pH neutre, puis rouge à pH élevé), après il se fera l'ajout de la solution basique de départ (Figure 55).

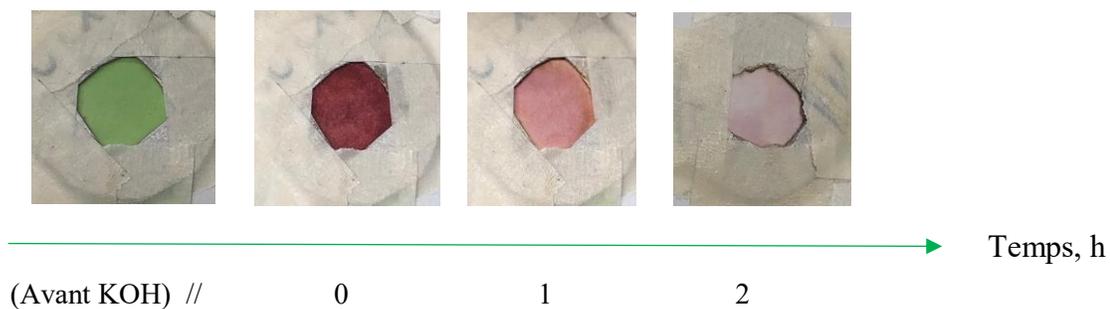


Figure 55 - Changement transitionnel de couleurs avec l'ajout de solutions basiques de 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v) sur papier filtre imbibé d'indicateurs de pH : 900 μL d'Alizarine Yellow R (0,005 M) et 100 μL de vert malachite (0,005 M).

Nous remarquons que le papier filtre donne de meilleurs résultats que le papier pH, il n'altère pas les couleurs des colorants. Aussi, le résultat obtenu après 3 heures n'est pas très prononcé, ainsi que la couleur verte de départ, alors nous avons décidé d'augmenter la teneur en vert de malachite dans la solution.

On refait les mêmes étapes ; la matrice de papier filtre est imbibée de vert malachite et Alizarin Yellow R, cette fois plus concentrés, puis on y ajoute la solution basique de KOH à t_0 . Grâce aux indicateurs utilisés, nous avons réussi à avoir un changement de couleur facilement identifiable : du vert au rouge dès l'atteinte de la température critique de fusion puis au jaune après quelques heures. La persistance de la couleur au fil des heures est meilleure avec ces fractions de volume (Figure 56). La prochaine étape était de confectionner notre appareil le TTI.

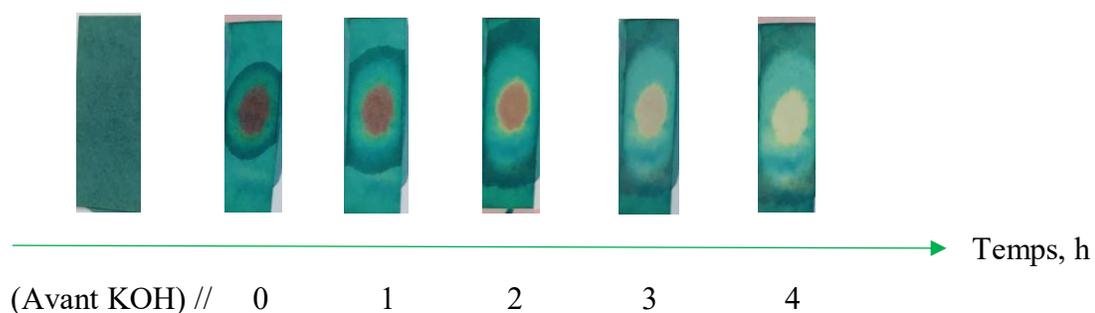


Figure 56 - Changement de couleur d'un papier filtre imbibé d'indicateurs de pH : 800 μL d'Alizarine Yellow R (0,005 M) et 200 μL de vert malachite (0,005 M) après l'ajout d'une goutte de 0,4 M KOH dans le dodécane:décanol (3:2 v/v).

5.3.4 Conception de l'indicateur temps-température

L'inspiration de la conception de notre indicateur temps-température a été le fonctionnement des bâtons lumineux ou « glowstick ». C'est un objet qui produit de la lumière à court terme après une activation mécanique. Ce bâton contient deux liquides différents séparés par une mince paroi. Lorsqu'on brise cette paroi pour activation, les deux substances isolées à l'intérieur du tube plastique se mélangent et réagissent en formant la lumière à travers la chimioluminescence (Kuntzleman, Rohrer, & Schultz,

2012). Cependant, la réaction est considérablement ralentie par les basses températures sous 8°C, car les substances sont à l'état solide à l'intérieur du tube et ainsi pas de mélange et au contraire fortement accélérée par la chaleur (obtenue en agitant le tube avant activation). À l'activation de notre TTI à basse température, le tube capillaire sera brisé sans qu'il y ait une réaction entre la solution basique contenue à l'intérieur qui est toujours à l'état solide. Dès l'atteinte de la température critique de fusion, il y aura réaction de la solution basique avec les indicateurs de pH et ainsi un changement de couleur pour alerter l'utilisateur (Figure 57).

Pour le développement de l'indicateur temps et température nous avons utilisé des films en polypropylène transparents adhésifs de la marque « Greiner sealers » de Sigma-Aldrich, pour bien voir à travers le changement colorimétrique. L'appareil est ensuite sellé par conduction thermique.

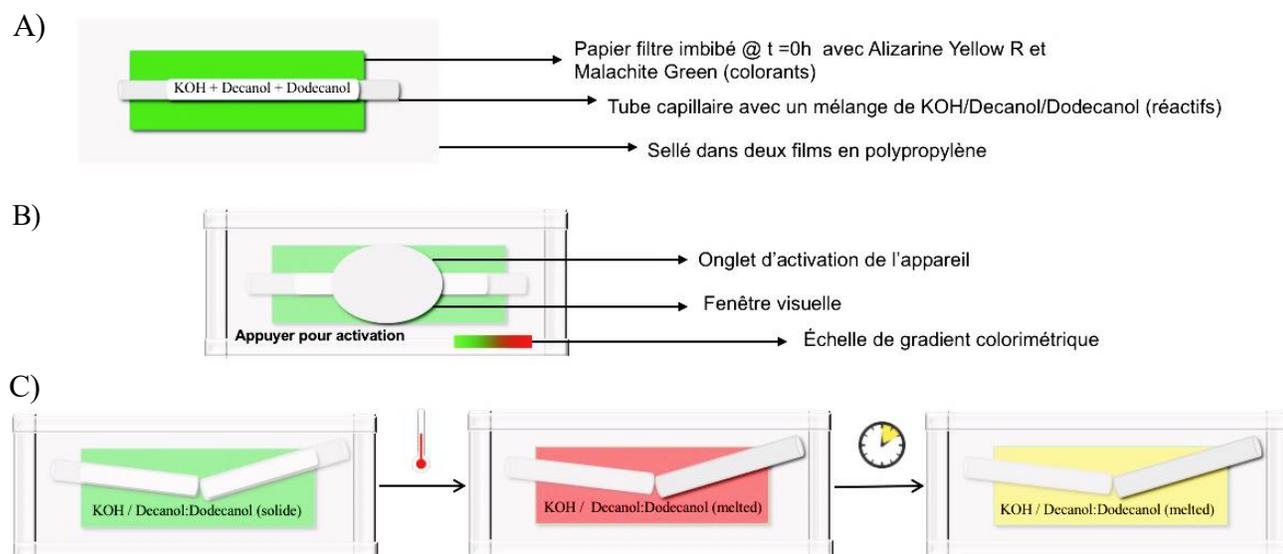


Figure 57 - Schéma montrant la dégradation du film chargé de colorant et ses applications comme indicateur temps-température. A) Conception schématique du dispositif TTI. B) L'appareil sera activé en appuyant sur la languette qui met la solution de base en contact avec le film chargé de colorants. C) Le processus de

changement de couleur de la solution est lié à l'historique d'exposition. Avec le temps, la fenêtre d'affichage passe du rouge à la couleur jaune.

Pour le design de l'indicateur temps-température, l'objectif est qu'il soit simple à comprendre pour l'utilisateur. Le TTI n'est fonctionnel qu'après activation de l'onglet par le bris du capillaire de verre contenant la solution basique. Une fois le capillaire brisé, il peut y avoir une réaction colorimétrique entre la solution basique et les indicateurs dans le papier filtre.

Nous avons effectué des tests de contrôles plusieurs fois pour confirmer l'efficacité du dispositif développé à température ambiante et à température froide (6°C). Il y a un changement de couleur graduel clair après l'activation du TTI à température pièce (Figure 58).

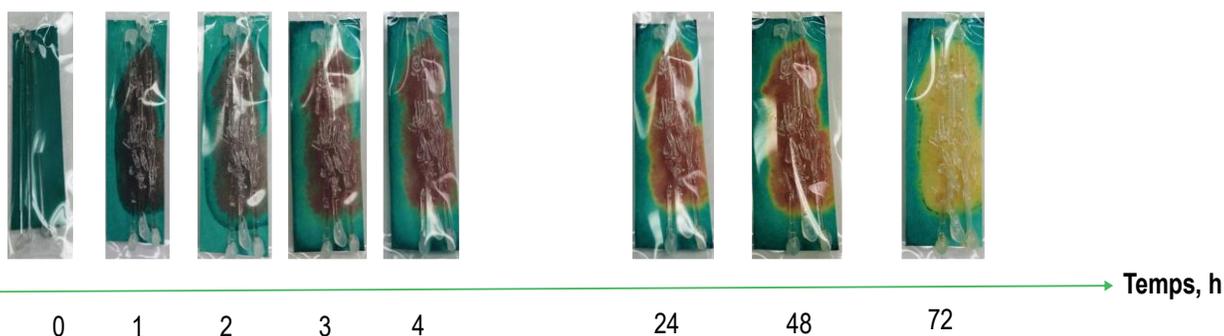


Figure 58 - Résultats du TTI activé à température ambiante avec 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v). Papier filtre imbibé avec 800 μ L d'Alizarine Yellow R (0,005 M) et 200 μ L de vert malachite (0,005 M).

La dégradation de la forme basique de l'Alizarine Yellow R est certainement sensible à l'oxygène de l'air, car on remarque que les changements colorimétriques sont plus lents dans le TTI scellé que pour ceux sur papier filtre en Figure 56.

Le second test était d'évaluer l'efficacité de notre indicateur dans des températures en dessous de la température critique du TTI. Tant que la température de fusion n'est pas atteinte, le dispositif activé devrait demeurer inchangé. Effectivement, il n'a pas eu d'altération colorimétrique du TTI activé à basse température; c'est le résultat recherché (Figure 59). L'utilisation du TTI à basse température ne donne pas de faux positifs.

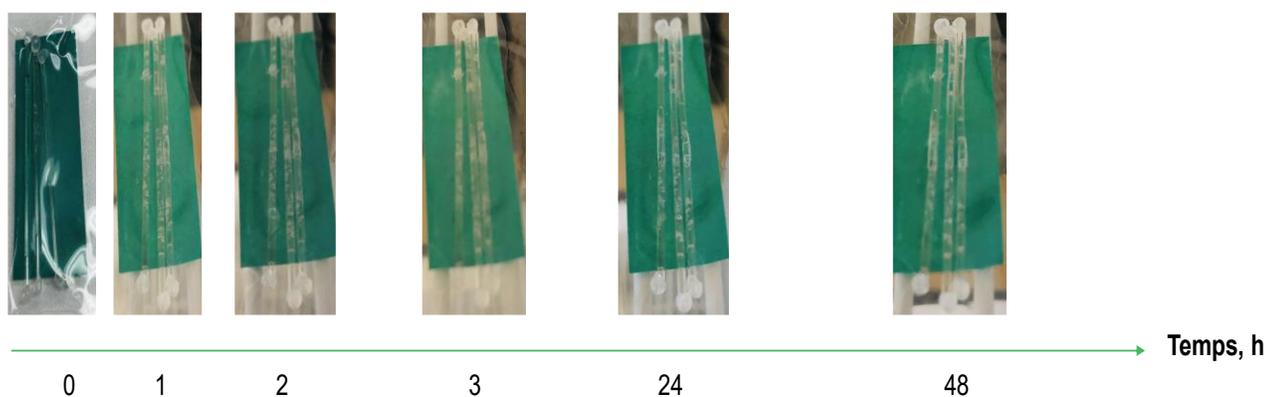


Figure 59 - Résultats du TTI activé à 6°C avec 0,4 M KOH dans le dodécanol:décanol (3:2 v/v) dans le capillaire. Papier filtre imbibé avec 800 μ L d'Alizarine Yellow R (0,005 M) et 200 μ L de vert malachite (0,005 M).

5.4 Conclusion

Le développement d'un indicateur de temps et température peu dispendieux basé sur le changement de couleur est présenté. Les différents mélanges de décanol et de dodécanol donnent des points de fusion bien définis dans la région de température voulue, soit entre 3°C et 25°C. Ainsi ces mélanges des deux alcools peuvent contrôler le point de fusion, et donc, la température critique du TTI.

Les premiers essais utilisent le papier pH comme source d'indicateur de couleur. Ceux-ci donnent un bleu intense immédiatement en contact avec les solutions basiques de décanol:dodécanol et cette couleur disparaît avec le temps, mais le deuxième changement de couleur est trop subtil pour applications commerciales. Après plusieurs essais, nous sommes arrivés au mélange d'indicateurs colorimétriques de vert malachite pour la couleur verte de départ et d'Alizarine Yellow R pour obtenir la couleur rouge après la réaction de fusion. Un deuxième changement de couleur indique qu'un seuil a été dépassé pendant plus de 24 heures lorsque l'indicateur passe du rouge au jaune. Cette étape de dégradation de l'Alizarine Yellow R semble être accélérée par la présence de l'oxygène.

L'indicateur temps et température fournit une calibration visuelle de l'historique du produit auquel il est attaché. Le dispositif fabriqué utilise le point de fusion d'un mélange basique et d'indicateurs pH pour signaler un dépassement de température, mais demeure simple à utiliser. En raison de sa proximité avec des produits alimentaires/vaccins, l'indicateur ou TTI doit être non toxique bien que les indicateurs colorimétriques à l'intérieur soient modérément toxiques à la respiration en forme de poudres pures. Pour ces essais initiaux, nous avons utilisé une concentration élevée de KOH; cette concentration devrait probablement être réduite pour des utilisations commerciales. Les solutions sont maintenues dans un dispositif complètement scellé

pour empêcher le contact avec les produits et l'utilisateur. Ainsi l'utilisateur sera alerté si un événement a affecté la chaîne de froid du produit alimentaire ou pharmaceutique auquel est affixé l'indicateur colorimétrique de temps-température.

6. RÉFÉRENCES

- Adibhatla, R. M., & Hatcher, J. F. (2010). Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, *12*(1), 125-169.
- Barriuso, B., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2013). A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology*, *236*(1), 1-15. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-012-1866-9>
- Bonini, M. G., Rota, C., Tomasi, A., & Mason, R. P. (2006). The oxidation of 2', 7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophecy? *Free Radical Biology and Medicine*, *40*(6), 968-975.
- Bovell-Benjamin, A. C., & Roberts, J. (2016). Naturally occurring toxicants: presence in selected commonly consumed fruits *Regulating safety of traditional and ethnic foods* (pp. 247-282): Elsevier.
- Brinkhorst, J., Nara, S. J., & Pratt, D. A. (2008). Hock cleavage of cholesterol 5 α -hydroperoxide: an ozone-free pathway to the cholesterol ozonolysis products identified in arterial plaque and brain tissue. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(37), 12224-12225.
- Carini, M., Aldini, G., & Facino, R. M. (2004). Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. *Mass Spectrometry Reviews*, *23*(4), 281-305.
- CEAEQ, C. d. e. e. a. e. d. Q. (2015). Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie, DR-12-VMC. *Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques*(Québec), 29.

- Chu, Y.-H. (1991). A comparative study of analytical methods for evaluation of soybean oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(6), 379-384.
- Cillard, J., & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.
- Combe, N., & Rossignol-Castera, A. (2010). Huiles végétales et friture. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 45(6), S44-S51.
- Custot, F. (1959). *TOXICITÉ DES GRAISSES CHAUFFÉES: LE PROBLÈME DES HUILES DE FRITURE*. Communication présentée Annales de la Nutrition et de l'Alimentation.
- Dean, J. A., & Dean, J. (1995). *Analytical chemistry handbook* (Vol. 1): McGraw-Hill New York.
- Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2008). A targetable fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in the mitochondria of living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 130(30), 9638-9639.
- Frackowiak, D. (1988). The Jablonski diagram. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2(3), 399.
- Frankel, E. N. (2014). *Lipid oxidation*: Elsevier.
- Frenette, M. (2009). *Advances in free radical oxidation: Mechanistic studies, fluorescent probe design and radically different antioxidants*. Disponible chez ProQuest Dissertations & Theses Full Text.
- Giannakourou, M., & Taoukis, P. (2003). Application of a TTI - based distribution management system for quality optimization of frozen vegetables at the consumer end. *Journal of food science*, 68(1), 201-209.

- Glindemann, D., Dietrich, A., Staerk, H. J., & Kusch, P. (2006). The two odors of iron when touched or pickled:(skin) carbonyl compounds and organophosphines. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(42), 7006-7009.
- Gooch, M. V., & Felfel, A. (2014). "\$27 BILLION" REVISITED.
- Green, N. J., Pimblott, S. M., & Tachiya, M. (1993). Generalizations of the Stern-Volmer relation. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(1), 196-202.
- Grootveld, M., SILWOOD, C. J. L., ADDIS, P., CLAXSON, A., SERRA, B. B., & VIANA, M. (2001). HEALTH EFFECTS OF OXIDIZED HEATED OILS1. *Foodservice Research International*, 13(1), 41-55. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4506.2001.tb00028.x>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA.
- Haskins, F. A., & Gorz, H. J. (1961). A reappraisal of the relationship between free and bound coumarin in Melilotus. *Agronomy--Faculty Publications*, 255.
- Hehre, W. J. (2003). *A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations* (Vol. 2): Wavefunction Irvine, CA.
- Herman, B. (1998). Fluorescence microscopy. *Current protocols in cell biology*(1), 4.2. 1-4.2. 10.
- Ingold, K. (1961). Inhibition of the Autoxidation of Organic Substances in the Liquid Phase. *Chemical Reviews*, 61(6), 563-589.
- ISO, I. (2012). *Animal and vegetable fats and oils- Determination of anisidine value ISO 6885 ICS:67.200.10*. International Organization for Standardization.
- Kanner, J. (2007). Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Mol Nutr Food Res*, 51(9), 1094-1101. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200600303>

- Kuntzleman, T. S., Rohrer, K., & Schultz, E. (2012). The chemistry of lightsticks: demonstrations to illustrate chemical processes. *Journal of Chemical Education*, 89(7), 910-916.
- Kyriakidis, N. B., & Katsiloulis, T. (2000). Calculation of iodine value from measurements of fatty acid methyl esters of some oils: comparison with the relevant American oil chemists society method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(12), 1235-1238.
- Lantern, A. E., González-Béjar, M., Frenette, M., & Scaiano, J. C. (2017). Photophysics of 7-mercapto-4-methylcoumarin and derivatives: complementary fluorescence behaviour to 7-hydroxycoumarins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 16(8), 1284-1289.
- Lecerf, J.-M. (2011). Les huiles végétales: particularités et utilités: Vegetable oils: Particularities and usefulness. *Médecine des maladies Métaboliques*, 5(3), 257-262.
- Lindon, J. C., Tranter, G. E., & Koppenaal, D. (2016). *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*: Academic Press.
- Marian, C. M. (2012). Spin-orbit coupling and intersystem crossing in molecules. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2(2), 187-203.
- McQuarrie, D., Rock, P., & Gallogly, E. (2011). *Colligative properties of Solutions*. Communication présentée General Chemistry Mill Valley: Library of Congress.
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.
- Moore, J. W., & Pearson, R. G. (1981). *Kinetics and mechanism*: John Wiley & Sons.
- Nakamura, Y., & Miyoshi, N. (2010). Electrophiles in foods: the current status of isothiocyanates and their chemical biology. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(2), 242-255.

- Nicolas, M.-T., & Moreau, M. (2008). Prix Nobel de Chimie 2008 (Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien): Osamu Shimomura. *médecine/sciences*, 24(11), 983-984.
- Obach, R. S., & Kalgutkar, A. (2018). Reactive electrophiles and metabolic activation.
- Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., & Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273(5280), 1392-1395.
- Osamu, S., & Sachi, S. (2017). *Luminous Pursuit: Jellyfish, GFP, and the Unforeseen Path to the Nobel Prize*: World Scientific.
- Parr, R. G., Szentpaly, L. v., & Liu, S. (1999). Electrophilicity index. *Journal of the American Chemical Society*, 121(9), 1922-1924.
- Perkampus, H.-H. (2013). *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*: Springer Science & Business Media.
- Plard, J., Le Dréau, Y., Rébufa, C., & Dupuy, N. (2016). Comparative Study of the Effects of Thermal and Photochemical Accelerated Oxidations on Quality of “Green Type” and “Black Type” French Olive Oils.
- Prusik, T., Arnold, R. M., & Piechowski, A. P. (2003). Activatable time-temperature indicator system: Google Patents.
- Robertson, G. L. (2012). Introduction to food packaging. *Food Packaging: Principles and Practice*, 3rd ed.; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 1-8.
- Schaich, K. M. (2005). Lipid Oxidation: New Perspectives on an Old Reaction. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 1-72.
- Shahidi, F., & Wanasundara, U. N. (2002). Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. *Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology*, 17, 387-403.

- Soh, N., Sakawaki, O., Makihara, K., Odo, Y., Fukaminato, T., Kawai, T., . . . Imato, T. (2005). Design and development of a fluorescent probe for monitoring hydrogen peroxide using photoinduced electron transfer. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(4), 1131-1139.
- Tabee, E., Azadmard-Damirchi, S., Jägerstad, M., & Dutta, P. C. (2008). Effects of α -Tocopherol on Oxidative Stability and Phytosterol Oxidation During Heating in Some Regular and High-Oleic Vegetable Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(9), 857-867. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-008-1274-2>
- Ueno, T., & Nagano, T. (2011). Fluorescent probes for sensing and imaging. *Nature methods*, 8(8), 642-645.
- Valeur, B. (2003). Molecular fluorescence. *Digital Encyclopedia of Applied Physics*, 477-531.
- Wang, S., Liu, X., Yang, M., Zhang, Y., Xiang, K., & Tang, R. (2015). Review of time temperature indicators as quality monitors in food packaging. *Packaging Technology and Science*, 28(10), 839-867.
- White, P. J. (1995). Conjugated diene, anisidine value, and carbonyl value analyses. *Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods*, 159-178.
- Yuste, R. (2005). Fluorescence microscopy today. *Nature methods*, 2(12), 902-904.