

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

QUANTIFICATION DES PRODUITS D'OXYDATION LIPIDIQUES ÉLECTROPHILES À
L'AIDE D'UNE SONDE NUCLÉOPHILE PRÉ-FLUORESCENTE

MEMOIRE
PRESENTE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
PRISCILIA DIANE MAMBOUNDOU

NOVEMBRE 2022

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais témoigner ma reconnaissance envers toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Professeur Mathieu Frenette, sans qui ce travail n'aurait été possible. Il a su me faire confiance en m'acceptant dans son équipe et en me confiant ce projet. Merci pour sa disponibilité, ses excellents conseils tout au long de ces années et la diversité des angles d'approches qu'il m'a suggérés. 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 au corps professoral et administratif du département de Chimie pour la richesse et la qualité de leurs enseignements; qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Merci à tous les anciens et présents membres du labo Frenette qui ont participé à l'accomplissement de ce mémoire de près ou de loin : Antoine Juneau, Taylor Hope, Iannick Lepage, Jason Malenfant, Mohamed El-Akhrass, Yohan Gagné, Lucille Kuster, Steven Mories, Asma Boushah, Michel Lord St-Vincent, Samuel Parent-Vézina et Alex Benoit.

Finalement je remercie mes parents, et ma sœur, pour leur amour et leur appui inconditionnels. Sans vous, mes projets ne se seraient jamais réalisés.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	viii
RÉSUMÉ	ix
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 Mise en contexte	1
1.2 Oxydation lipidique	3
1.3 Les électrophiles carbonyles a,b-insaturés.....	5
1.4 Aspects théoriques des méthodes expérimentales utilisées dans ce travail	8
1.4.1 Spectroscopie d'absorption UV-Visible	8
1.4.2 Processus fondamental des états excités	9
1.4.3 Principe de fluorescence	11
1.5 Notion de molécules fluorescentes: les fluorochromes	14
1.6 Généralité sur les sondes fluorescentes.....	15
1.6.1 Conception des sondes pré-fluorescentes par modification des états excités (transfert d'électrons photoinduit).....	16
1.6.2 Conception des sondes pré-fluorescentes par modification chimique de fluorochromes	18
1.7 Notions de fluorescence des coumarines	20
1.8 Hypothèse	23
1.9 Objectifs.....	23
CHAPITRE 2 : QUANTIFICATION D'ÉLÉCTROPHILES LIPIDIQUES PAR SONDE FLUORESCENTE DANS LES HUILES ALIMENTAIRES.....	24
2.1 Résumé.....	24
2.2 Contribution des auteurs	25

2.3 Abstract	25
2.4 Introduction	26
2.5 Experimental section.....	30
2.5.1 Materials	30
2.5.2 Oil extraction method	30
2.5.3 ‘Electrophilic content’ measurements.....	31
2.5.4 Electrophilic content in heated oils	33
2.5.5 Determination of para-anisidine value (p-AV) and peroxide value (POV).....	33
2.6 Results and discussion	34
2.7 Conclusion	44
CHAPITRE 3: LIMITES DE LA METHODE ET PROSPECTIVES FUTURES.....	46
CONCLUSION.....	47
REFERENCES	57

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Mécanisme partiel de l'oxydation lipidique.....	5
Figure 1.2 : Oxydation primaire des lipides polyinsaturés en hydroperoxydes suivie d'une oxydation secondaire en électrophiles portant le groupement de carbonyles α,β -insaturés.	6
Figure 1.3: Deux des modes de protection par le glutathion (GSH):(A) Réduction des hydroperoxydes et (B) Attaque nucléophile du glutathion pour désactiver un électrophile dérivé d'oxydation de lipides.....	7
Figure 1.4 : Schéma de principe du spectromètre UV-Vis	9
Figure 1.5 : Diagramme de Jablonski présentant les transitions radiatives et non-radiatives entre les états singulets (S) et triplet (T)	10
Figure 1.6 : Schéma d'un fluorimètre avec source lumineuse, monochromateur d'excitation, échantillon (un puits de microplaque), monochromateur d'émission et détecteur.	12
Figure 1.7: Spectres d'absorption (ligne bleue) et d'émission (ligne verte) de la fluorescéine.....	13
Figure 1.8 : Exemple de fluorochromes avec la couleur de leur émission et le rendement quantique (Ff)	15
Figure 1.9 : Sonde pré-fluorescente basée sur la réaction d'une 7-hydroxycoumarine modifiée pour contenir un groupe fonctionnel phosphine. (A) Les hydroperoxydes vont oxyder la phosphine ce qui cause une augmentation de la fluorescence. (B) Au départ, la fluorescence est atténuée par un mécanisme de transfert d'électron (PET) dû au doublet libre de la phosphine, mais cette fluorescence peut être récupérée par l'oxydation de la phosphine par les hydroperoxydes.	17
Figure 1.10 : Mécanisme de détection préférentielle du Cys versus le Hcy avec une sonde pré-fluorescente dérivée du fluorochrome BODIPY.....	19
Figure 1.11 : La DCFH non fluorescente devient fluorescente dans les cellules après hydrolyse et oxydation radicalaire pour générer la 2,7-dichlorofluorescéine fluorescente.....	20
Figure 1.12 : Substitution à la position 7 avec des groupes donneurs d'électrons C-OH et C-SR.	21
Figure 1.13 : (gauche) Mécanisme de désactivation de la fluorescence du C-SH dû à la perte de proton à l'état excité et à sa conversion rapide vers l'état triplet (T1). (droite) L'excitation du C-SR ne permet pas une perte de proton à l'état excité et donc peut émettre de la fluorescence. ...	22
Figure 1.14 : Absorption (ligne pleine) et émission (ligne pointillée) du C-SH (rouge) et du C-SMe (bleu) dans le chloroforme	22
Figure 2.1 : Résumé graphique du chapitre, représentant la détection d'un électrophile par la sonde pré-fluorescente C-SH.	25

Figure 2.2: Examples of electrophiles with deleterious effects on human health and their mechanism of action.	27
Figure 2.3: The oxidation of polyunsaturated lipids (LH) generates electrophiles with α,β -unsaturated carbonyl moieties (highlighted in red) which can react with nucleophiles present in biological systems.	28
Figure 2.4: (A) Glutathione is a nucleophilic peptide that reacts with lipid derived electrophiles. (B) Description of the general idea, whereby a thiol with low fluorescence becomes fluorescent after reaction with a lipid derived electrophile. (B) The pre-fluorescent probe 7-mercapto-4-methylcoumarin (C-SH) displays low fluorescence in solvents capable of accepting protons. Alkylation of C-SH with lipid derived electrophiles forms C-SR which cannot lose a proton in the excited state and displays increased fluorescence.	29
Figure 2.5: Protocol for sample preparation and data acquisition.	32
Figure 2.6: (A) Reaction conditions. (B) Typical data obtained in microplate reader kinetic experiments showing the fluorescence increase ($I_{exc} = 365$ nm, $I_{mon} = 420$ nm) of C-SH (1 mM) reacting with different concentrations of <i>trans</i> -2-nonenal (from 0 to 0.1 mM) catalyzed by L-proline (4 mM) in 1:1 (v/v) ethanol and chloroform solvent.	36
Figure 2.7: Rate of fluorescence increase of the mixture of C-SH (1 mM), L-proline (4 mM) in chloroform:ethanol 1:1 (v/v) as a function of <i>trans</i> -2-nonenal concentration. In red, with oil addition and in blue, without added oil.	37
Figure 2.8: Measurement of electrophilic content, expressed as <i>trans</i> -2-nonenal equivalents, for canola oil heated at 180°C.	40
Figure 2.9: Comparison of electrophilic content, expressed in <i>trans</i> -2-nonenal equivalents, for extracted oils from French fries from 6 restaurants in the Montreal area (McDonald's, Vulcano, Burger King, <i>La Belle Province</i> , Valentine and Lafleur). The approximate error in the measurement is given in the first column.	43

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'-Dichlorofluorescein diacétate
ADN	Acide désoxyribonucléique
UV-vis	Spectroscopie d'absorption de lumière ultraviolet et visible
GC	Chromatographie en phase gazeuse (Gas chromatography)
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance (High performance liquid chromatography)
TBARS	Substances réactives de l'acide thiobarbiturique
ROOH	Hydroperoxyde
k	Constante de vitesse
E	Électrophile
EtOH	Éthanol
MeOH	Méthanol
p-AV	p-Anisidine Value
POV	Indice de peroxyde
ISO	International Organization for Standardization

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

u.a.	Unité arbitraire
e	Électron
g	Gramme
C	Concentration
S	Seconde
Min	Minute
h	Heure
°C	Degré Celsius
M	Mol/L
mM	Millimolaire (10^{-3} M)
μ M	Micromolaire (10^{-6} M)
Φ_F	Rendement quantique de fluorescence
%	Pourcentage

RÉSUMÉ

Les aliments que nous consommons quotidiennement ont un apport calorique et nutritionnel pour notre organisme. Ceux-ci sont constitués des glucides, lipides, protéines, vitamines etc. qui sont indispensables à la santé. Parmi les lipides, il y a les acides gras polyinsaturés qui jouent un rôle préventif pour l'organisme contre de nombreuses maladies cardio-vasculaires. Cependant, lorsque ceux-ci sont en contact avec l'oxygène et/ou chauffés, ils engendrent un processus d'oxydation conduisant à la formation des composés carbonyles α,β -insaturés. Ces composés carbonyles α,β -insaturés se comportent comme des électrophiles très réactifs dans l'organisme et vont ainsi subir des attaques nucléophiles par les sites thiols des protéines et molécules d'ADN. Ces modifications covalentes sont suspectées d'être la cause de certaines maladies dégénératives. Afin de prévenir ces effets néfastes, dû à l'exposition de notre organisme par les molécules électrophiles, plusieurs chercheurs se sont intéressés à suivre le processus d'oxydation des lipides afin d'évaluer leurs taux d'oxydation.

Selon la littérature, plusieurs méthodes analytiques sont utilisées afin de quantifier les produits d'oxydations lipidiques. Les plus connus sont l'indice de peroxyde (POV), l'indice de p-anisidine (p-AV), l'indice de TBARS (substances réactives de l'acide thiobarbiturique) et les méthodes chromatographiques (chromatographie en phase gazeuse, chromatographie en phase liquide à haute performance). Toutefois, ces méthodes pour la plupart ne sont pas complètes car elles ne permettent pas d'obtenir les informations sur le large éventail des molécules générées durant l'oxydation lipidique mais aussi, certaines requièrent un haut niveau d'expertise et une préparation assez laborieuse des échantillons pouvant altérer leurs propriétés tel que lors des méthodes chromatographiques.

Ainsi, une méthode fluorométrique a été développée à l'aide d'une sonde pré-fluorescente, capable de détecter les composés carbonyles α,β -insaturés. Cette méthode analytique est basée sur une molécule peu fluorescente qui est le 7-mercapto-4-méthyl-coumarine (C-SH), dont la fluorescence augmente lorsque celle-ci se lie à des carbonyles α,β -insaturés. Cette méthode 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. Les résultats

rapportés ne définies pas ainsi la concentration réelle des électrophiles mais l'indice d'électrophilicité qui est la mise en relation de la réactivité de tous les électrophiles contenu dans un échantillon par rapport à la concentration de l'électrophile standard, le *trans*-2-nonenal. Avec cette nouvelle technique en main, il a été possible de comparer le montant d'électrophile dans certains beurres d'arachides et des frites de 6 restaurants où un montant élevé d'électrophiles dans les croustilles du restaurant « Lafleur » a pu être observé. Le suivi du processus d'oxydation sur une huile chauffée et un sac de croustilles en fonction de son temps de stockage a été fait afin de mettre en évidence les facteurs affectants la peroxydation lipidique.

L'avantage de cette méthode est que l'analyse est rapide, et elle permet d'évaluer l'ensemble des électrophiles plus directement. En effet, dans la mesure où la cinétique du mélange d'électrophiles est évaluée, les électrophiles qui réagissent plus rapidement, donc potentiellement plus toxiques, vont avoir une prépondérance dans les mesures effectuées.

Pour la validation de cette méthode fluorométrique, une comparaison de celle-ci a été faite dans les mêmes conditions optimales avec les méthodes standardisées ISO 3960:2017 d'indice de peroxyde (POV) et ISO 6885:2012 d'indice de p-anisidine (p-AV). Cette comparaison a permis d'évaluer la réponse de la présente méthode par rapport aux méthodes usuelles et ainsi démontrer la précision de celle-ci. Le but ultime étant d'envisager son utilisation dans l'industrie agroalimentaire afin de quantifier la proportion d'électrophiles dans les produits alimentaires. Les résultats ont permis de souligner la haute sélectivité de cette méthode quant à sa capacité de détecter les électrophiles dans un échantillon d'huile.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Les huiles végétales ont de nombreux avantages nutritionnels qui sont essentielles pour la cuisine et dans une variété de produits alimentaires. Elles solubilisent plusieurs vitamines et acides gras essentiels qui leur permettent de fournir à l'organisme un gain d'énergie, de protéger le système cardiovasculaire et pour la synthèse de membranes lipidiques qui entourent toutes les cellules. Cependant, les acides gras insaturés sont sensibles à l'oxydation radicalaire et aboutissent à l'accumulation d'hydroperoxydes. Les hydroperoxydes étant eux même très instables peuvent subir une deuxième oxydation pour générer une variété de cétones et aldéhydes sous la forme de carbonyles α,β -insaturés. Ce sont ces produits qui sont souvent associés à la dégradation des produits gras par leurs changements d'odeurs, de textures et de couleurs. Il est possible de postuler que cette « alerte » menée par les sens est reliée au fait que ces molécules sont néfastes pour la santé—les cétones α,β -insaturés agissent comme électrophiles dans le corps humain. Les produits d'oxydation lipidiques électrophiles peuvent réagir avec les thiols et amines nucléophiles des protéines et bases d'ADN provoquant ainsi des modifications nocives pour l'organisme (Grootveld et al., 2001; Obach & Kalgutkar, 2018).

L'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes car elle est susceptible de se produire à tous les stades de la transformation, de la conservation et de l'utilisation des produits alimentaires contenant des lipides insaturés, dès lors qu'ils sont exposés à des élévations de température, à la lumière ou en contact avec l'oxygène (Manar, 2012). Étant un processus inévitable, il peut toutefois être ralenti par l'ajout des antioxydants. En effet ceux-ci vont permettre de stabiliser les radicaux libres prévenant ainsi la propagation de la chaîne de réaction et aussi une éventuelle oxydation secondaire. Mais encore, vu la durée de vie limitée des antioxydants dans les produits alimentaires, l'exposition de l'organisme par ces substances électrophiles est inéluctable. D'où l'intérêt de développer des méthodes capables de quantifier les produits d'oxydation lipidiques dans divers produits alimentaires.

De nos jours, plusieurs méthodes ont été développées afin de suivre le processus d'oxydation des produits alimentaires dont certaines sont utilisées en industrie agroalimentaire. Parmi ces méthodes, il y a celles qui ciblent les produits d'oxydations primaires (hydroperoxydes) dont la plus commune est l'indice de peroxyde (POV). Celle-ci mesure la quantité d'oxygène chimiquement lié à une huile ou un corps gras sous la forme de peroxydes (ISO 6885, 2012; Jeuge et al, 2012). D'autres méthodes ciblent les produits d'oxydation secondaires tels que l'indice de TBARS qui mesure les substances réactives à l'acide thiobarbiturique tel que les malondialdéhydes. Une approche de la quantification d'électrophiles implique l'indice de p-anisidine (p-AV) qui est sensible aux aldéhydes (Barriuso et al, 2013; Chu, 1991; Shahidi & Wanasundara, 2002; Wrolstad et al, 2005; Rahharjo & Sofos, 1993). Bien que ces méthodes de détermination des produits d'oxydation secondaires ne fournissent que des informations sur une partie des molécules électrophiles formées, il existe des méthodes analytiques plus précises capable de mesurer les composées volatiles qui sont des bons indicateurs de l'état d'oxydation d'un produit comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) (Ross & Smith, 2006; Raharjo & Sofos, 1993).

Les techniques chromatographiques sont plus complexes à mettre en œuvre du fait de leurs couts et leurs préparations d'échantillons laborieuses. En effet, l'échantillon à analyser doit être modifié, car celui-ci étant un mélange complexe de graisses qui ne peuvent pas être injecté dans les colonnes chromatographiques au risque d'endommager l'appareil. Notamment, les traitements de transestérification et de saponification vont réagir avec les électrophiles que la méthode vise à quantifier.

Pour remédier à ce qui est perçu comme un « angle mort » important dans l'analyse des produits d'oxydation des lipides, une technique simple et rapide permettant d'évaluer le taux d'électrophiles dans les produits alimentaires à l'aide d'une sonde pré-fluorescente, le 7-mercapto-4-méthylcoumarin (C-SH) a été développée. La méthode proposée permet de rapidement évaluer l'ensemble des électrophiles dans des huiles extraites sans modifications particulières. L'avantage de cette méthode est l'utilisation de la fluorescence qui est une technique très sensible et sélective aux électrophiles par son mécanisme d'action. En effet, le C-SH est une molécule peu fluorescente à la base, mais en présence d'électrophiles cétone α,β -insaturé, il y a une réaction nucléophile par

le groupe fonctionnel thiol qui attaque la double liaison de l'électrophile cétone α,β -insaturé pour créer un C-SH alkylé (dénomé C-SR) très fluorescent, alors facile à détecter par fluorescence.

1.2 Oxydation lipidique

L'oxygène est un gaz réactif qui est bénéfique pour la respiration, cependant qui cause beaucoup de réactions secondaires, parfois néfastes. En effet, tous les lipides contenant des acides gras insaturés, quelle que soit la source (huile végétale, huile de poisson, graisse animale etc.) s'oxydent en présence d'oxygène pour générer un processus d'oxydation lipidique. Ainsi, l'oxydation lipidique est un phénomène général entre les lipides insaturés et l'oxygène moléculaire, qui affecte la conservation des aliments mais aussi qui est responsable du développement de plusieurs maladies. Étant donné que l'oxygène peut exister dans deux états, l'état fondamental ($^3\text{O}_2$) et l'état excité ($^1\text{O}_2$), la peroxydation des lipides peut se produire par deux réactions différentes. L'une implique ($^3\text{O}_2$) qui est une réaction radicalaire en chaîne en 3 étapes (initiation radicalaire, propagation et terminaison). L'autre impliquant l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est une réaction rapide qui incorpore l'oxygène directement à la double liaison d'un acide gras (Cillard & Cillard, 2006). Les deux réactions conduisent à la formation d'hydroperoxydes comme produit principal (Figure 1). Les hydroperoxydes, étant instables, vont donner une myriade de réactions secondaires produisant ainsi des alcools, acides, aldéhydes, cétones etc (Figure 1.1). Le processus général de ce mécanisme se déroule en 3 phases: initiation, propagation et terminaison (Frankel, 2005).

Initiation

L'abstraction d'un atome d'hydrogène (H) de l'acide gras situé sur un carbone placé entre deux doubles liaisons en présence d'un initiateur, conduit à la formation d'un radical alkyle (R^\bullet) ou un radical libre lipidique (L^\bullet). Plusieurs espèces peuvent causer la perte d'atome d'hydrogène dont le radical hydroxyle (HO^\bullet), l'hydroperoxyde (HOO^\bullet), alkoxy (RO^\bullet), et peroxy (ROO^\bullet) (Manar, 2012). Le radical hydroxyle, étant le plus réactif, peut oxyder toutes molécules organiques par ce mécanisme :



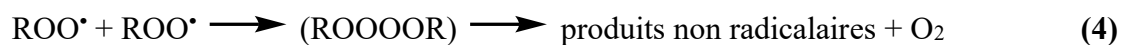
Propagation

Les radicaux libres d'acides gras insaturés ainsi formés réagissent rapidement avec l'oxygène moléculaire (O_2) pour former des radicaux peroxydes (ROO^\bullet) instables (2). Ces derniers réagissent avec une molécule lipidique (RH) voisine pour former un hydroperoxyde (ROOH) et un nouveau radical (R^\bullet) qui assure la propagation de la réaction (3).



Terminaison

La dernière étape consiste en la formation de composés issus de l'association de deux espèces radicalaires pour former un produit non radicalaire stable (4).



La phase de terminaison conduit à la formation de différents produits terminaux dont des composés volatils (aldéhydes, alcools, cétones, furanes etc.) et des composés non volatiles (oxy-monomères, oxy-dimères etc.) (Manar, 2012; Cillard & Cillard, 2006).

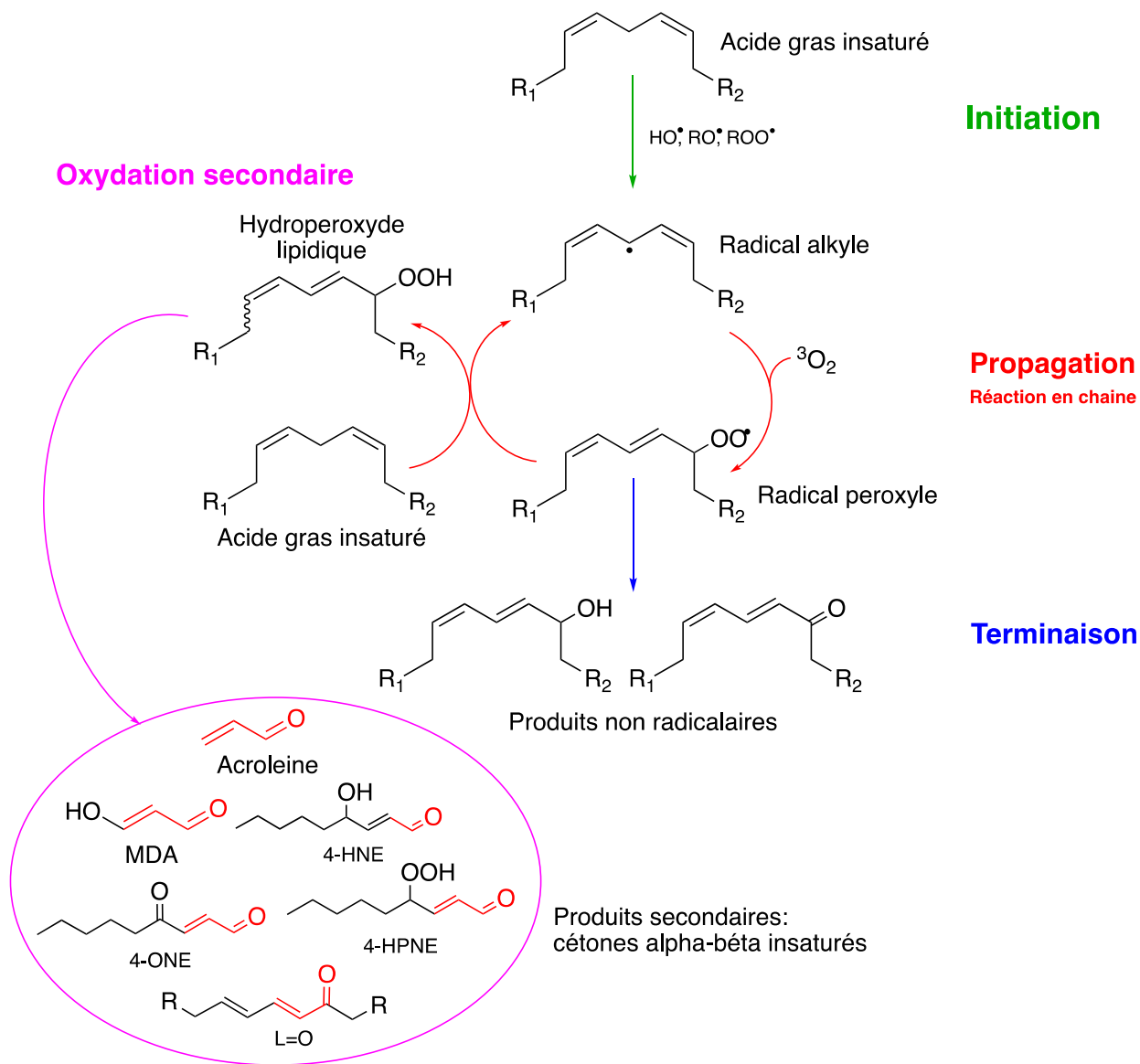


Figure 1.1 : Mécanisme partiel de l'oxydation lipidique.

1.3 Les électrophiles carbonyles α,β -insaturés

La décomposition des hydroperoxides donnent de nouveaux radicaux libres, mais aussi des molécules réactives dites carbonyles α,β -insaturés (aldéhydes, cétones, acides carboxyliques liées à une double liaison C=C) (Figure 1.2). Ces carbonyles α,β -insaturés sont des composés électrophiles à la fois au niveau du carbone carbonyle, qu'au niveau du carbone β . En effet, selon

les conditions, l'un des sites peut se lier aux groupes amines et thiols des protéines et des acides nucléiques via une réaction d'addition de Michael (Cillard & Cillard, 2006). Ces modifications covalentes sont dommageables pour l'organisme car elle altère les propriétés biologiques de la membrane tel le degré de fluidité et peut aussi mener à l'inactivation d'enzymes et de récepteurs liés à la membrane, risquant ainsi d'affecter le fonctionnement cellulaire normal et entraîner la formation de cellules cancéreuses (Dalle-Donne et al, 2006). Mais aussi, elles sont suspectées de contribuer au phénomène du vieillissement et semble responsable du développement de nombreuses maladies reliées à l'âge, dont de diverses maladies chroniques tels que les maladies pulmonaires, arthritiques et cardio-vasculaires. (Stojiljkovic et al, 2002; Spiteller, 2007).

Dans les aliments, la décomposition des hydroperoxydes peut entraîner des changements au goût et à la texture dont nous sommes très sensibles. La peroxydation lipidique est un problème majeur dans l'industrie alimentaire et la santé humaine car elle est associée à de nombreuses maladies. Les antioxydants peuvent empêcher ou retarder la peroxydation des lipides par différents mécanismes.

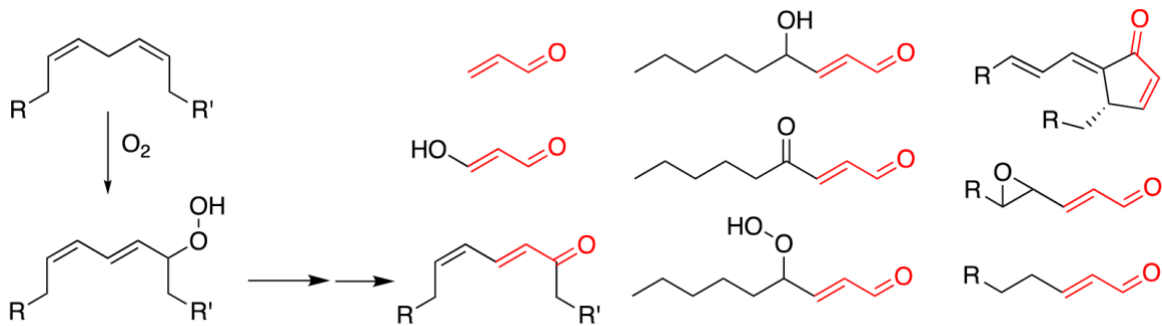


Figure 1.2 : Oxydation primaire des lipides polyinsaturés en hydroperoxydes suivie d'une oxydation secondaire en électrophiles portant le groupement de carbonyles α,β-insaturés (Boushah, 2020).

Selon B. Halliwell (1995), un antioxydant est une substance qui retarde ou prévient de manière significative l'oxydation d'un substrat oxydable. Ainsi, les antioxydants susceptibles de protéger les lipides de l'oxydation sont les antioxydants préventifs qui vont empêcher la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou intercepter la décomposition des hydroperoxydes lipidiques (Buettner, 1993). 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 3), agissant ainsi comme agent protecteur pour empêcher la réaction de modification des protéines et de l'ADN (Frenette, 2009). Mais aussi, le glutathion peut réduire les hydroperoxydes lipidiques en alcool par l'action de l'enzyme glutathion peroxydase (Thomas et al, 1990). Ces protections limitent fortement la toxicité de la peroxydation lipidique car le mécanisme de propagation en chaîne est arrêté en réduisant les hydroperoxydes en dérivés hydroxylés correspondants non toxiques et la formation des produits secondaires sera limitée (Figure 1.3) (Thomas et al, 1990).

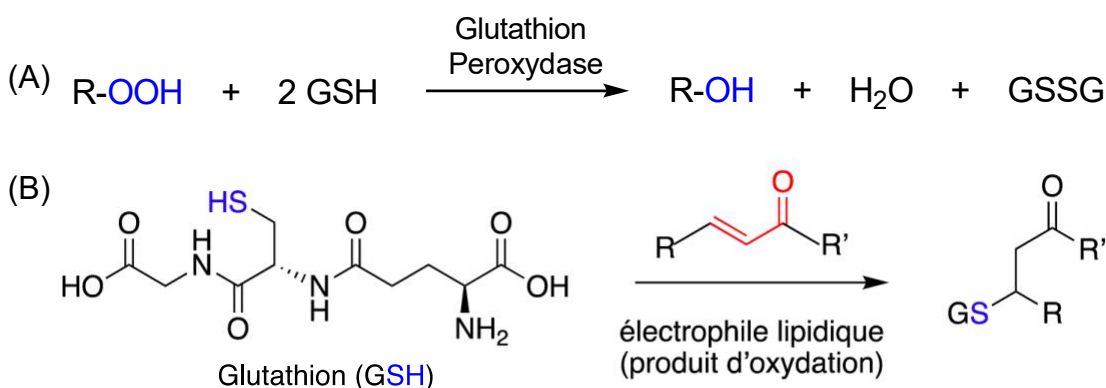


Figure 1.3: Deux des modes de protection par le glutathion (GSH) : (A) Réduction des hydroperoxydes et (B) Attaque nucléophile du glutathion pour désactiver un électrophile dérivé d'oxydation de lipides.

Les antioxydants par leur effet de ralentissement de l'oxydation des lipides vont par conséquent jouer un rôle important dans la prévention et la propagation des dommages oxydatifs. Cependant, étant toujours un des défis majeurs pour la santé publique et l'industrie alimentaire, il est important de déterminer la quantité d'électrophile dans les produits alimentaires que nous consommons. Ainsi, une méthode analytique basé sur une sonde pré-fluorescente a été développée afin de d'évaluer le montant d'électrophile dans différents produits alimentaires.

1.4 Aspects théoriques des méthodes expérimentales utilisées dans ce travail

1.4.1 Spectroscopie d'absorption UV-Visible

La spectroscopie d'absorption de lumière dans les domaines de l'ultraviolet (190 – 400 nm) et du visible (400-800 nm) est souvent simplement appelée « UV-Vis » (Yann, 2008). Cette technique quantitative permet de mesurer la concentration de substances chimiques qui absorbent la lumière. Cela se fait en mesurant l'intensité de la lumière qui traverse un échantillon par rapport à l'intensité de la lumière à travers un échantillon de référence ou un blanc (Figure 1.4). Selon la loi de Beer-Lambert, la fraction de lumière absorbée par rapport à un blanc est reliée à la concentration de molécule(s) qui absorbe cette longueur d'onde dans l'échantillon, ainsi qu'au trajet optique parcourue par la lumière à travers l'échantillon. Pour faire simple, plus une solution est concentrée, plus elle absorbe la lumière. En termes mathématiques, la loi de Beer-Lambert donne :

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

A_{λ} : Absorbance ou densité optique (DO) à une certaine longueur d'onde λ

I_0 : Intensité de la lumière transmise d'un blanc à la longueur d'onde d'intérêt

I : Intensité de la lumière transmise de l'échantillon à la longueur d'onde d'intérêt

T : Fraction de la lumière transmise

ϵ_{λ} : Coefficient d'absorption molaire or absorptivité molaire du composé ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

l : Longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu considéré, typiquement 1 cm

C : Concentration de la molécule responsable de l'absorption ($mol \cdot L^{-1}$)

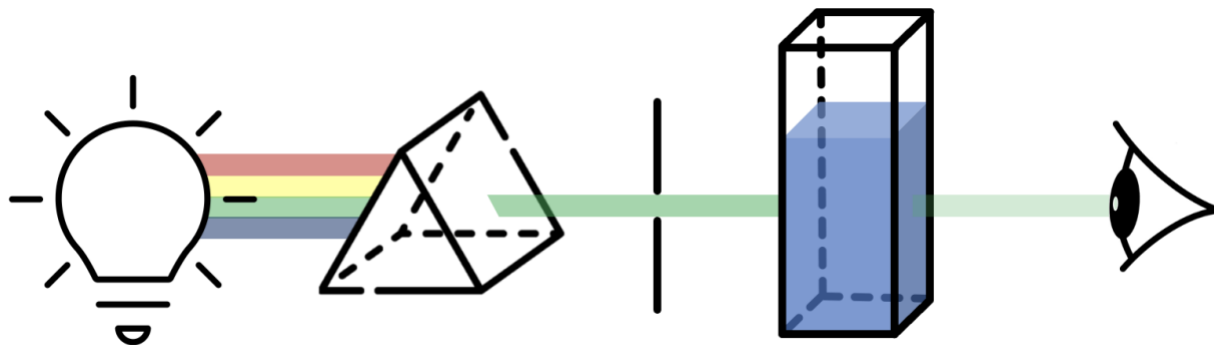


Figure 1.4 : Schéma de principe du spectromètre UV-Vis

Le spectrophotomètre UV-Vis mesure l'intensité de la lumière transmise à travers l'échantillon par rapport à une mesure de référence de la source lumineuse incidente. Tous ces instruments sont constitués d'une lampe (source de rayonnement) émettant dans le spectre UV-Vis (par exemple avec une lampe à arc au tungstène ou au xénon), d'un monochromateur et d'un détecteur du rayonnement final. Le monochromateur peut choisir la longueur d'onde de travail. Il est basé sur le principe du réseau de diffraction, qui permet de séparer les longueurs d'onde comme un prisme (Yann, 2008). Le tout est relié à un ordinateur qui permet le contrôle puis reporte l'absorbance de l'échantillon sur un graphique.

1.4.2 Processus fondamental des états excités

Ce qui est réellement observé par spectroscopie UV-vis est l'absorbance de l'énergie lumineuse qui excite un électron de l'état fondamental à un état excité, typiquement singulet, d'un composé ou matériau (Hehre, 2003). En effet, lorsque la lumière incidente frappe la matière, elle peut être absorbée, réfléchiée ou transmise. L'absorbance du rayonnement dans la gamme UV-Vis provoque une excitation atomique, qui fait référence à la transition des molécules d'un état fondamental de faible énergie à un état excité ($S_0 \rightarrow S_1$). Cependant, avant qu'une molécule puisse changer d'état d'excitation, elle doit absorber des niveaux de rayonnement suffisants pour qu'un électron se déplace vers des orbitales moléculaires plus élevées (McEwen, 2010). Seules certaines longueurs d'ondes de la lumière sont possibles pour l'absorbance, c'est-à-dire des longueurs d'ondes qui ont des énergies qui correspondent à la différence d'énergie entre deux états propres différents de la

molécule particulière (McEwen, 2010; Lindon et al, 2016). Ainsi, l'énergie nécessaire aux molécules pour subir ces transitions est chimiquement spécifique. Un spectrophotomètre UV-Vis utilise ce principe pour quantifier les analytes dans un échantillon en fonction de leurs caractéristiques d'absorption.

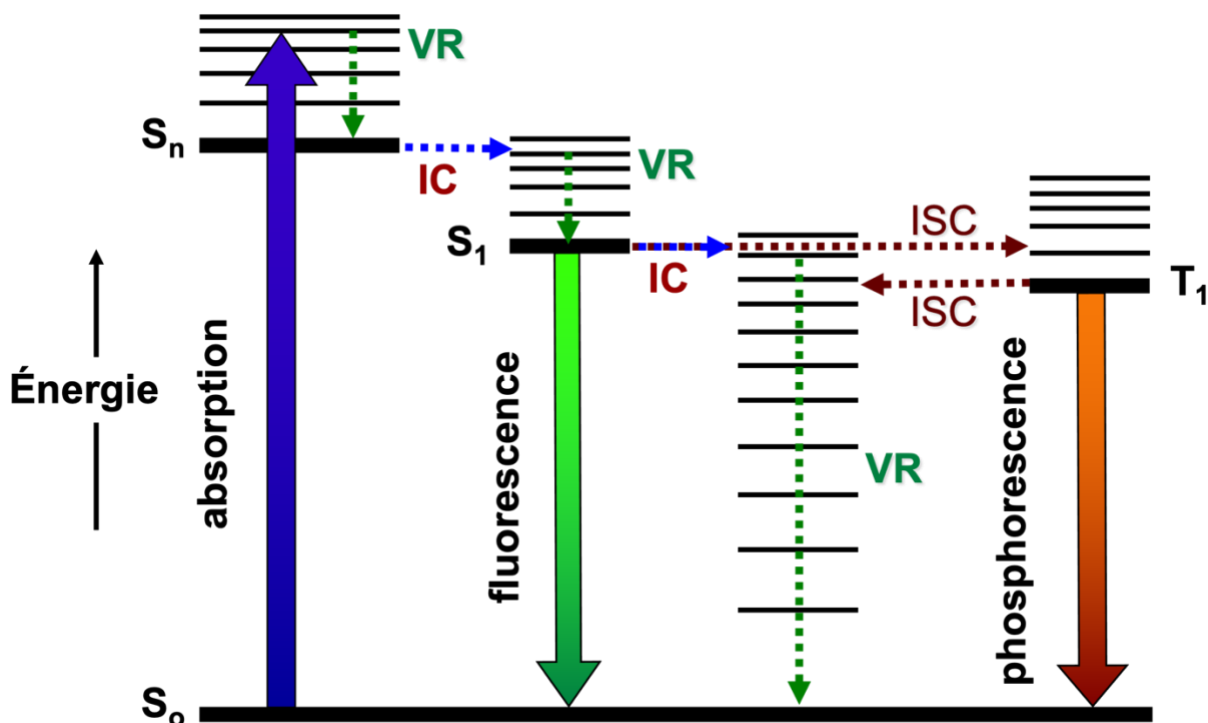


Figure 1.5 : Diagramme de Jablonski présentant les transitions radiatives et non-radiatives entre les états singulets (S) et triplets (T). VR = *vibrational relaxation*, IC = *internal conversion*, ISC = *intersystem crossing*

Une fois qu'un électron est excité, il existe plusieurs manières dont l'énergie peut être dissipée. La première est la relaxation vibrationnelle, qui est un processus non radiatif. Ceci est indiqué sur le diagramme de Jablonski sous la forme d'une flèche pointillée verte entre les niveaux vibrationnels (Figure 1.5). Cette relaxation se produit uniquement entre les niveaux vibrationnels. Cependant, si les niveaux d'énergie vibrationnelle chevauchent fortement les niveaux d'énergie électronique, il est possible que l'électron excité puisse passer d'un niveau de vibration dans un état électronique à un autre niveau de vibration dans un autre état électronique inférieur (McEwen, 2010). Ce processus est appelé conversion interne, et il est également indiqué par une ligne pointillée bleue sur le diagramme de Jablonski, entre deux niveaux vibrationnels dans des états électroniques

différents (Figure 1.5). Mais aussi, il y a une autre voie permettant aux molécules de gérer l'énergie reçue des photons, celle-ci consiste à émettre un photon. Cette émission lorsqu'elle a lieu s'appelle la fluorescence qui est un retour radiatif de l'état excité à l'état fondamentale ($S_1 \rightarrow S_0$), ou la phosphorescence qui est le passage de l'état excité à un état triplet ($S_1 \rightarrow T_1$).

1.4.3 Principe de Fluorescence

La fluorescence est la lumière émise par un atome ou une molécule une petite durée après l'absorption d'un photon (10^{-9} - 10^{-7} s). Plus précisément, l'émission de la lumière provient du retour transitionnel de l'espèce excitée à partir de son premier niveau singulet électronique à son niveau électronique à son état fondamental ($S_1 \rightarrow S_0$). Au premier état excité, la fluorescence peut rivaliser en termes d'échelles de temps avec d'autres processus non radiatifs, car l'énergie du photon émis en fluorescence est la même énergie que la différence entre les états propres de la transition; cependant, l'énergie des photons fluorescents est toujours inférieure à celle des photons excitants (McEwen, 2010; Amrut et al, 2014). Cette différence est due au fait que l'énergie est perdue dans la conversion interne et la relaxation vibrationnelle, où elle est transférée loin de l'électron (Valeur, 2003; McEwen, 2010). En raison du grand nombre de niveaux de vibration qui peuvent être couplés dans la transition entre les états électroniques, l'émission mesurée est généralement répartie sur une gamme de longueurs d'onde (Valeur, 2003).

La Figure 1.6 montre la configuration typique d'un spectrofluoromètre, aussi simplement appelé fluorimètre. La lumière source est introduite dans un monochromateur d'excitation, où une lumière d'excitation monochromatique est produite par un réseau de diffraction et deux fentes (entrée et sortie). L'excitation est divisée en un faisceau d'irradiation et un faisceau de référence à l'aide d'un séparateur de faisceau. Le faisceau de référence est utilisé pour déterminer l'intensité lumineuse d'excitation pendant la détection et le traitement du signal (Amrut et al, 2014). L'échantillon est excité à la longueur d'onde choisie et celui-ci émet une gamme de longueurs d'onde qui sont filtrées à nouveau à la longueur d'onde d'intérêt puis est détecté.

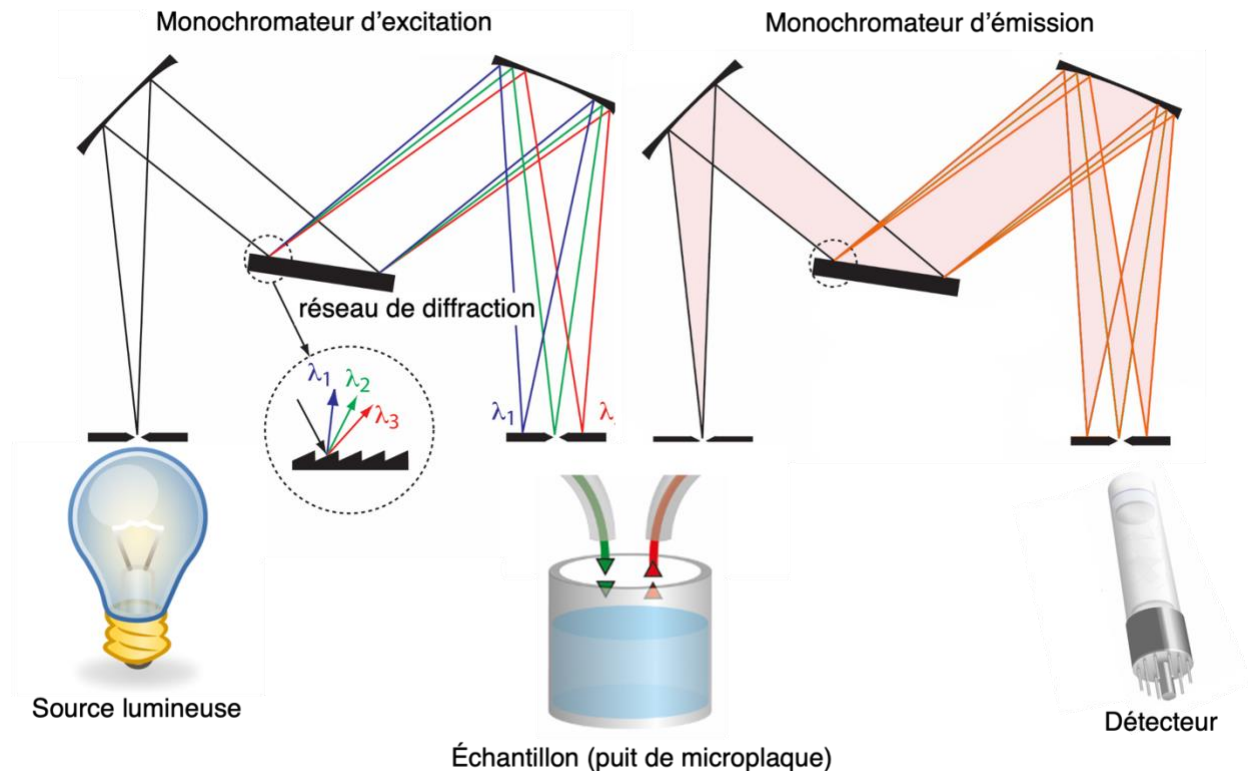


Figure 1.6 : Schéma d'un fluorimètre avec source lumineuse, monochromateur d'excitation, échantillon (un puits de microplaque), monochromateur d'émission et détecteur.

La fluorescence est caractérisée par son spectre (longueurs d'onde d'excitation et d'émission) et son intensité (Figure 1.7). En effet, il est possible d'enregistrer deux types de spectres en fluorescence : le spectre d'excitation (en fixant la longueur d'onde d'émission de fluorescence et en balayant la longueur d'onde d'excitation) et le spectre d'émission (en fixant la longueur d'excitation et en balayant la longueur d'onde d'émission de fluorescence). Entre autres, l'intensité de fluorescence dépend de la concentration de l'échantillon, de la longueur d'onde d'excitation et de son rendement quantique. Les molécules possédant des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ ont un coefficient d'absorption molaire et un rendement quantique de fluorescence plus élevé que les molécules aillant une transition principale $n \rightarrow \pi^*$. Dans beaucoup de cas, augmenter la conjugaison des électrons π se traduit en augmentation du rendement quantique de fluorescence ainsi que la longueur d'onde d'émission.

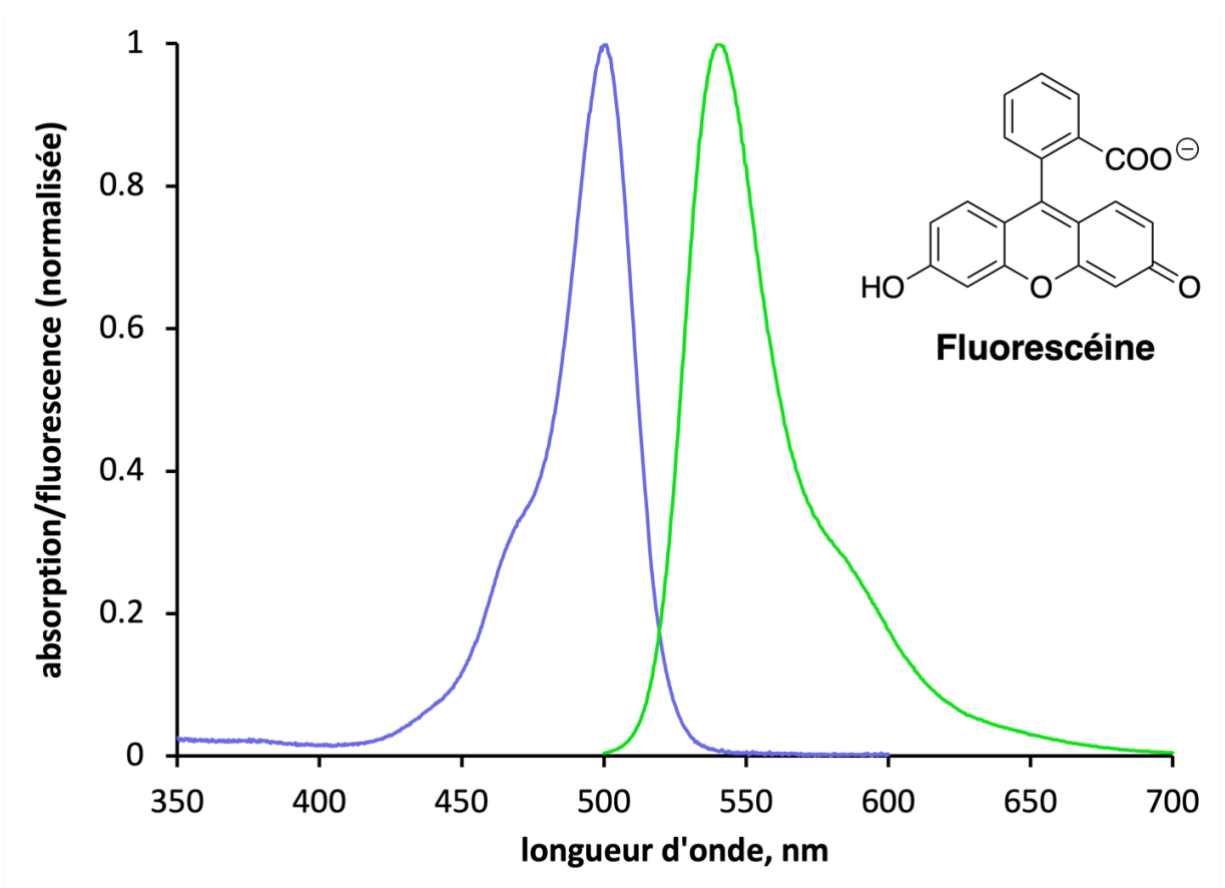


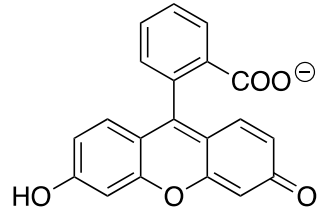
Figure 1.7: Spectres d'absorption (ligne bleue) et d'émission (ligne verte) de la fluorescéine (données expérimentales de photochemcad.com)

Toutefois, la fluorescence est très particulière car bien qu'elle augmente proportionnellement à la concentration, lorsque celle-ci atteint une certaine concentration la fluorescence commencera à diminuer. Ceci est expliqué par l'effet d'auto-extinction dû à l'interaction de deux molécules entre elles pour se stabiliser. En effet, cette interaction entre la forme excitée de la molécule et la forme non excitée crée une baisse des niveaux d'énergie pour une meilleure stabilisation de celle-ci (Valeur, 2003). Les niveaux d'énergie étant plus bas, la fluorescence est donc empêchée. Ainsi, plus la concentration sera élevée, plus cet effet sera présent et moins la fluorescence sera intense.

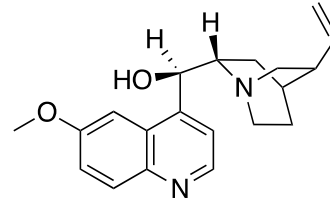
1.5 Notion de molécules fluorescentes: les fluorochromes

Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber un rayonnement lumineux incident (excitation) et de restituer rapidement en quelques nanosecondes, l'énergie absorbée sous forme d'émission de lumière (fluorescence) dans le domaine du visible ou proche UV. Pour cela, les électrons doivent émettre de la fluorescence à partir de l'état π, π^* qui est l'état excité le plus bas et non à partir de l'état n, π^* (Frenette, 2009). Les molécules fluorescentes sont pour la plupart cycliques et rigides ayant ainsi plusieurs liaisons π capable d'émettre de la fluorescence après excitation (Herman, 1998). Elles sont appelées « fluorophores » ou « fluorochromes » (Figure 1.8). Celles-ci sont caractérisées par plusieurs paramètres, tels que : le coefficient d'extinction ou absorption molaire, qui reflète la probabilité d'absorption d'une molécule à une longueur d'onde spécifique ; le rendement quantique, qui représente l'efficacité relative de la fluorescence, c'est-à-dire le nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés; l'intensité de fluorescence, selon la longueur d'onde d'excitation et la durée de vie de l'état excité, qui est la durée caractéristique pendant laquelle la molécule reste dans l'état excité avant de revenir à l'état fondamental (Valeur, 2004).

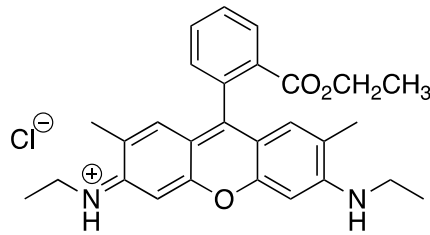
Ainsi, les molécules n'ayant pas le bon état en énergie ne pourront pas ou ne feront que très peu de fluorescence, ce qui est le cas pour la majorité des molécules. Cependant, il est possible de concevoir des sondes fluorescentes en modifiant les états excités de ces molécules par transformation chimique ou en faisant une modification chimique direct du fluorochrome. En effet, de nos jours les molécules qui deviennent fluorescentes après modification chimique sélective gagnent beaucoup d'intérêt et sont appelées sondes pré-fluorescentes (Ueno & Nagano, 2011).



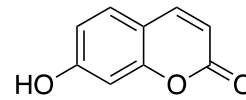
Fluorescéine
fluorescence verte
 $\Phi_f = 0.95$ (0.1 M NaOH)



Quinine
fluorescence bleue
 $\Phi_f = 0.51$ (0.05 M H₂SO₄)



Rhodamine 6G
fluorescence rouge
 $\Phi_f = 0.94$ (éthanol)



7-hydroxycoumarine
fluorescence UV
 $\Phi_f = 0.08$ (méthanol)

Figure 1.8 : Exemple de fluorochromes avec la couleur de leur émission et le rendement quantique (Φ_f) (Brouwer, 2011).

1.6 Généralité sur les sondes fluorescentes

Une sonde fluorescente est une molécule qui possède une propriété de fluorescence, dont le signal peut être capté par des méthodes photométriques dans le but de détecter et d'étudier un analyte de manière sélective (Xia, 2019). Les principaux avantages des sondes fluorescentes sont qu'elles sont très sensibles même à de faibles concentrations, elles sont stables sur de longues périodes et leurs signaux sont spécifiques pour un analyte ciblé. Toutefois, plusieurs exigences doivent être prises en compte lors de la conception d'une sonde moléculaire fluorescente : la sonde doit présenter (1) une excitation efficace avec la plupart des instruments à base de laser; (2) une interférence limitée de l'auto-fluorescence de l'échantillon; (3) une photodégradation limitée; (4) un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique élevés, ce qui peut garantir l'utilisation de concentrations de colorant plus faibles; et (5) la présence de groupes fonctionnels hautement sélectifs, qui reconnaissent la substance chimique cible (Suzuki & Yokoyama, 2015).

Il existe trois principaux types de sondes fluorescentes : les sondes « Light-up », ici dites pré-fluorescentes, qui présentent une fluorescence accrue en présence d'analyte, les sondes « Light-off », qui présentent une fluorescence diminuée en présence d'analyte, et les ligands marqués, à fluorescence permanente ayant une affinité spécifique élevée pour l'analyte (Xiao, 2019). En raison de leur grande sensibilité et de leur mise en œuvre relativement simple, les sondes "Light-up" sont les plus utilisées. Il s'agit d'une molécule « pré-fluorescente », conçu par modification chimique de l'état excité de la molécule en augmentant le transfert de charge lors de l'excitation dû à l'introduction des groupements conjugués aux caractères donneur ou accepteur les plus élevés possible. Mais aussi, en modifiant directement le fluorochrome.

1.6.1 Conception des sondes pré-fluorescentes par modification des états excités (transfert d'électrons photoinduit)

Dans le cas du transfert d'électrons photoinduit (*photoinduced electron transfer*, PET), un électron de l'orbitale moléculaire la plus haute en énergie (HOMO) du fluorophore est promu vers l'orbitale moléculaire inoccupée la plus basse (LUMO). Cela permet au PET de passer de l'HOMO du donneur d'électrons à celui du fluorophore, ce qui provoque l'extinction de la fluorescence de ce dernier (Weller, 1982; Ganguly et al., 2015) (Figure 1.9). C'est lors de la liaison avec la substance chimique cible, que le potentiel redox du donneur est augmenté de sorte que l'HOMO correspondant devient plus faible en énergie que celui du fluorophore (Figure 1.9). Par conséquent, le PET n'est plus possible et l'extinction de la fluorescence est supprimée. En d'autres termes, l'intensité de la fluorescence est augmentée lors de la liaison avec les composés cibles.

Dans la plupart des capteurs PET, le récepteur fait intervenir des amines aliphatiques ou aromatiques qui jouent le rôle de quencheur (Suzuki & Yokoyama, 2015). En effet, les sondes pré-fluorescentes capable de détecter le peroxyde d'hydrogène ont été conçues selon un principe similaire.

Selon l'étude de Soh et al. (2005), le transfert d'électrons photo-induit (PET) a été appliqué à la conception du DPPEA-HC; une sonde pré-fluorescente capable de détecter le peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Dans ce cas, la fonctionnalité diphénylphosphine de cette sonde réagit avec des hydroperoxydes tels que le peroxyde d'hydrogène pour former de l'oxyde de diphénylphosphine (Figure 1.9B). Avant cette réaction, la paire d'électron non appariée de la phosphine éteindra la fluorescence du colorant fluorescent hydroxycoumarine, qui sera récupéré après l'hydrogénation de la phosphine. Ainsi, le fluochrome reste inchangé après la réaction d'oxydation, c'est le "quencher" (phosphine) lié de manière covalente qui subit des transformations.

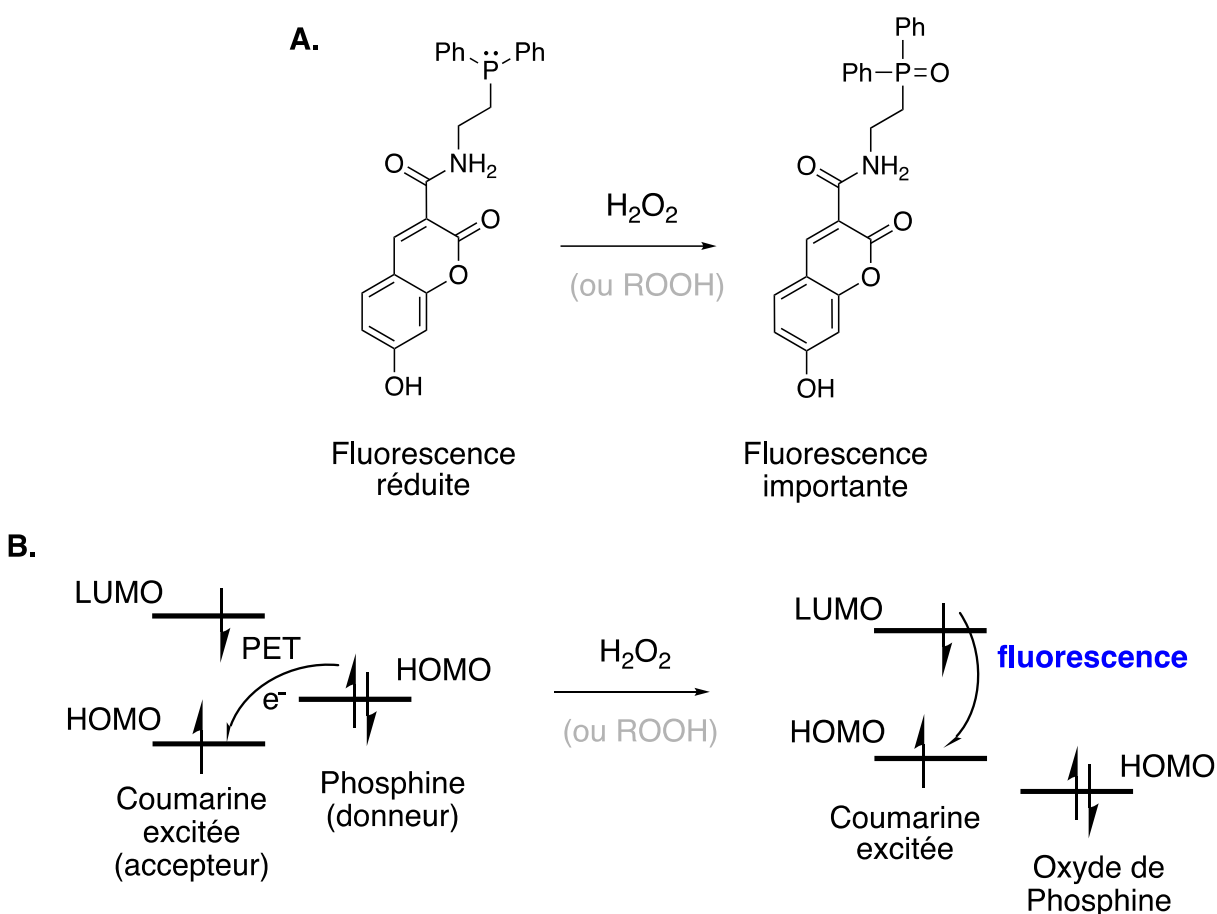


Figure 1.9 : Sonde pré-fluorescente basée sur la réaction d'une 7-hydroxycoumarine modifiée pour contenir un groupe fonctionnel phosphine. (A) Les hydroperoxydes vont oxyder la phosphine ce qui cause une augmentation de la fluorescence (Soh, 2005). (B) Au départ, la fluorescence est atténuée par un mécanisme de transfert d'électron (PET) dû au doublet libre de la phosphine, mais cette fluorescence peut être récupérée par l'oxydation de la phosphine par les hydroperoxydes.

1.6.2 Conception des sondes pré-fluorescentes par modification chimique de fluorochromes

Les fluorochromes sont au cœur du design de sondes pré-fluorescentes. Les fluorochromes les plus utilisées pour les sondes pré-fluorescentes ont de bonnes propriétés photophysiques telle qu'une absorption avec un grand coefficient d'absorption molaire et un rendement quantique de fluorescence élevé. De plus, plusieurs analogues facilement modifiables par synthèse organique sont disponibles commercialement. Idéalement, une sonde pré-fluorescente aurait une fluorescence nulle avant la présence d'un analyte (ou modification à son environnement) et une fluorescence forte seulement après cet événement. Des exemples communs de modification à l'environnement sont le pH de la solution ainsi que par la polarité, la température, la présence d'ions ou les éventuelles interactions avec d'autres molécules réactives (Bovell-Benjamin & Robert, 2016).

Dai et al. (2020) ont énuméré la conception de nombreuses sondes pré-fluorescentes à haute sélectivité capable détecter des biothiols dont la cystéine (Cys), l'homocystéine (Hcy) et le glutathion (GSH) par modification de certains fluorochromes. En effet, Li et al. (2017) ont conçu une sonde fluorescente NIR basée sur le fluorophore BODIPY à la suite de l'introduction d'un groupe indole (Figure 1.10). Dans cette sonde, le groupe acrylate agit comme un site de reconnaissance, permettant une détection sélective de Cys par rapport à d'autres biothiols, notamment Hcy. Le processus de détection de Cys implique une réaction d'addition conjuguée suivie d'une réaction de cyclisation intramoléculaire.

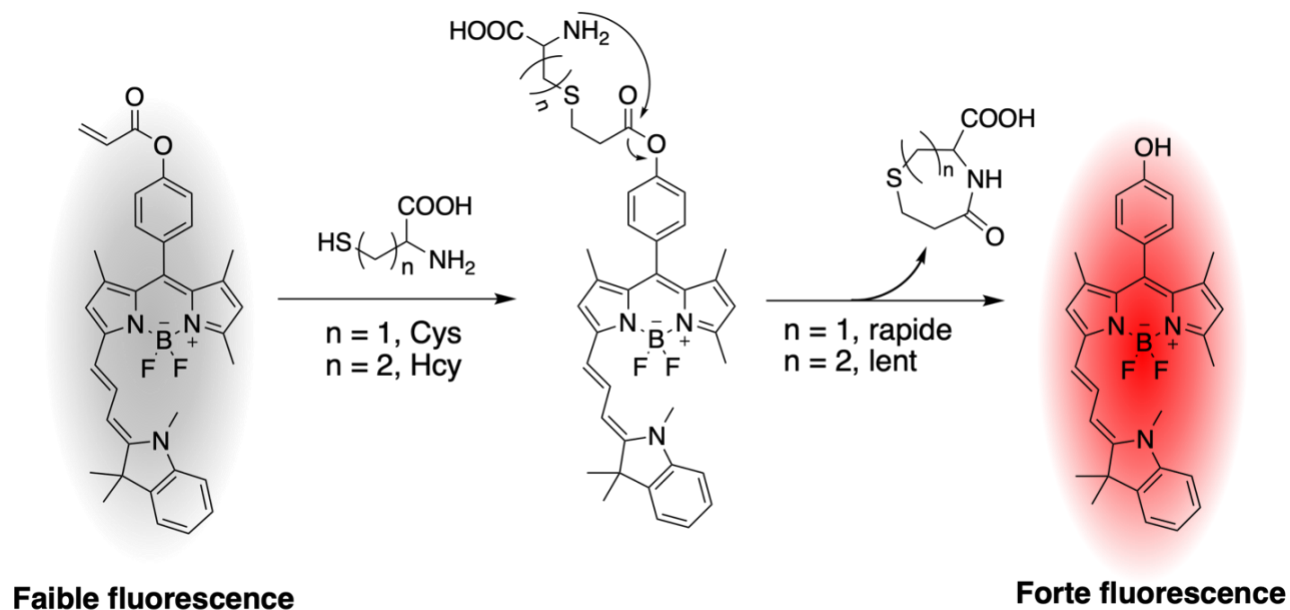


Figure 1.10 : Mécanisme de détection préférentielle du Cys versus le Hcy avec une sonde pré-fluorescente dérivée du fluorochrome BODIPY (Li et al., 2017)

De même, plusieurs sondes pré-fluorescentes ont été développées dû à l'augmentation de fluorescence après une attaque de radical peroxyde. L'une des plus connues dans la littérature est le 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate (DCFH) qui mesure le stress oxydatif dans les phénomènes toxicologiques (Bonini et al, 2006). En effet, le peroxyde d'hydrogène oxyde le DCFH en dichlorofluorescéine fluorescente (DCF) après hydrolyse (Figure 1.11), fait à partir des estérases cellulaires qui sont aussi responsables de l'hydrolyse de la libération de composés actifs dans les cellules. Cependant, vu que l'oxydation du DCFH peut être dérivée de plusieurs intermédiaires réactifs, l'interprétation des espèces réactives spécifiques de l'oxygène impliquées dans les systèmes biologiques doit être traitée avec prudence (Bonini et al, 2006).

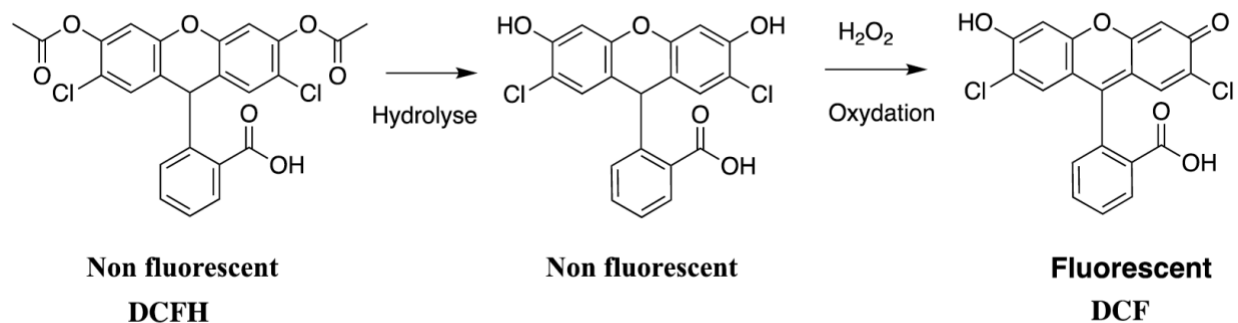


Figure 1.11 : La DCFH non fluorescente devient fluorescente dans les cellules après hydrolyse et oxydation radicalaire pour générer la 2,7-dichlorofluorescéine fluorescente (Bonini et al, 2006).

Les sondes pré-fluorescentes sont devenues de puissants outils permettant d'utiliser la lumière pour faire progresser l'étude de la biologie cellulaire, découvrir de nouveaux médicaments, détecter des contaminants environnementaux et pour approfondir la détection du cancer. Mais aussi, son utilisation fournit des informations essentielles pour le suivi des molécules cibles impliquées dans l'oxydation radicalaire. Le développement de sondes pré-fluorescente sensibles et sélectives à certaines composantes du stress oxydant fait l'objet d'une attention considérable.

1.7 Notions de fluorescence des coumarines

La coumarine est une molécule largement présente dans la nature. Elle appartient à la classe des flavonoïdes des métabolites secondaires des plantes et possède une variété d'activités biologiques, généralement associées à une faible toxicité (Gu et al, 2019; Borges et al, 2005). Selon la littérature, elle a été isolée la première fois en 1820 par Tonka, et de nos jours plusieurs de ces dérivés synthétisés sont largement utilisés dans le domaine médical et activités pharmacologiques (Revankar, 2017). Mais aussi, la fonctionnalisation du cœur aromatique de cette molécule permet d'obtenir un composé fluorescent aux propriétés voulues (solubilité, fonction de greffage) ce qui en fait de bons candidats pour la fluorescence. (Bernhard, 2019).

La coumarine en elle-même n'est pas fluorescente en raison de son état excité n,π^* de basse énergie, mais des substitutions appropriées mènent à des composés fortement fluorescents : la substitution à la position 7 avec un groupe donneur d'électrons C-OH va améliorer la fluorescence

(Frenette, 2009). En revanche, lorsqu'un groupe alkyl remplace l'atome d'hydrogène sur le groupe alcool par réaction de substitution, la fluorescence de cette molécule est affaiblie (Figure 1.12). Un phénomène inverse a été décrit récemment dans une étude pour la coumarine avec un groupement thiol à la position 7, appelé 7-mercapto-4-méthylcoumarine (C-SH) (Lanterna et al, 2017).

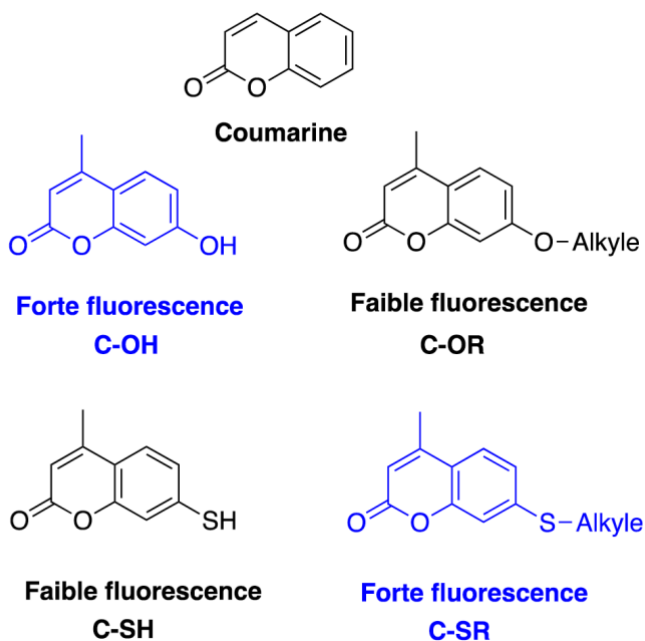


Figure 1.12 : Substitution à la position 7 avec des groupes donneurs d'électrons C-OH et C-SR.

La 7-mercapto-4-méthylcoumarine (C-SH) est un composé qui est peu fluorescent dans un solvant protique et dont la fluorescence augmente lorsqu'elle se lie aux électrophiles. En somme dans un milieu protique, l'état excité perd un proton formant ainsi un groupement thione avec une délocalisation de la charge négative et un passage à l'état triplet d'où sa faible fluorescence. Toutefois lorsqu'elle est liée à un carbonyle α , β -insaturée et qu'elle est sous la forme alkylé C-SR, elle ne peut pas perdre de proton à l'état excité et donc émet de la fluorescence comme mécanisme de désactivation (Figure 1.13).

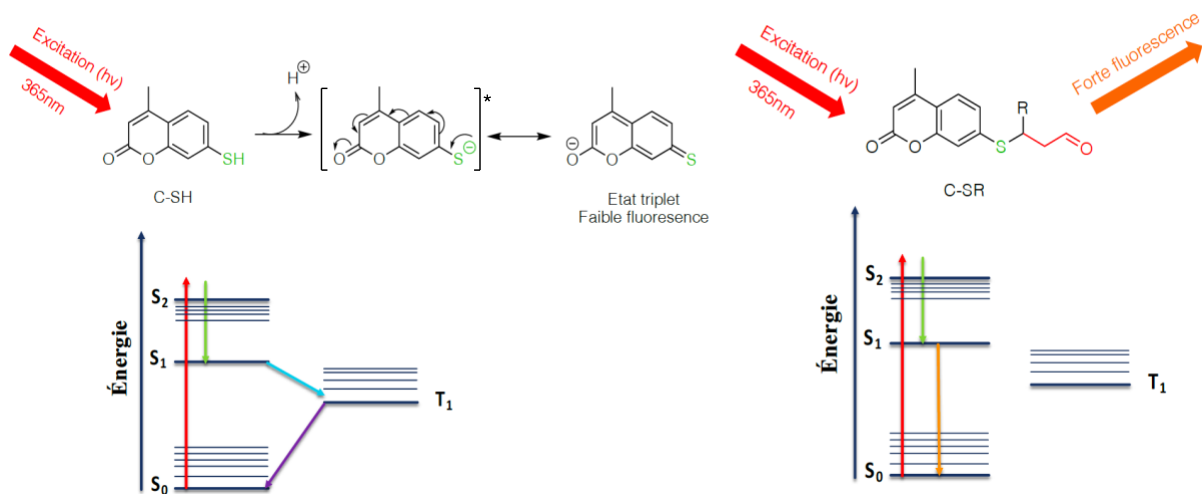


Figure 1.13 : (Gauche) Mécanisme de désactivation de la fluorescence du C-SH dû à la perte de proton à l'état excité et à sa conversion rapide vers l'état triplet (T₁). (Droite) L'excitation du C-SR ne permet pas une perte de proton à l'état excité et donc peut émettre de la fluorescence.

En effet, les spectres d'absorption et d'émission du C-SH et de sa forme méthylé C-SMe dans du chloroforme démontre que le C-SH présente une faible fluorescence avec $\Phi_F = 0,096$ ce qui représente $\sim 10\%$ de fluorescence. Toutefois sa forme méthylé C-SMe liée à un produit d'oxydation électrophile présente une forte fluorescence avec $\Phi_F = 0,79$, soit $\sim 80\%$ de fluorescence ce qui est expliqué par l'impossibilité de perdre un proton lorsqu'à l'état excité.

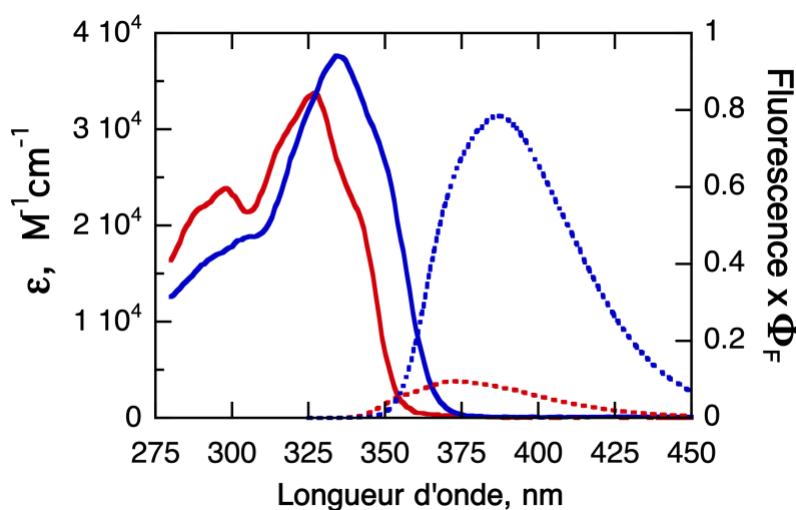


Figure 1.14 : Absorption (ligne pleine) et émission (ligne pointillée) du C-SH (rouge) et du C-SMe (bleu) dans le chloroforme. (Frenette, 2009)

1.8 Hypothèse

Le processus d'oxydation des aliments étant inévitable, il est intéressant d'évaluer le taux d'électrophiles dans les aliments. Les effets néfastes de l'oxydation lipidique sont bien étudiés mais une mesure spécifiquement liée à la teneur en électrophiles serait utile pour étudier l'effet de la consommation d'aliments oxydés. En développant une sonde pré-fluorescente à l'aide du 7-mercapto-4-méthyl-coumarine (C-SH), on pourra détecter les agents alkylants dans un échantillon d'huile alimentaire et ainsi étudier les paramètres de leur génération pour limiter leur contenu.

1.9 Objectifs

Le principal objectif de ce projet est de faire avancer les outils analytiques pour étudier la dégradation des lipides. Ainsi, la conception d'une sonde pré-fluorescente capable de quantifier les produits d'oxydation électrophiles dans des aliments qui contiennent des huiles alimentaires est recherchée. Pour atteindre cet objectif, un « indice d'électrophilicité » entre l'huile extraite de matière grasse et un électrophile référentiel a été établi afin de quantifier le montant d'électrophiles dans des échantillons d'huiles alimentaires. Ensuite, cette nouvelle méthode développée sera comparée à des méthodes standardisées dont l'indice de peroxyde et l'indice de p-anisidine sont connus sous les mêmes conditions expérimentales.

CHAPITRE 2: QUANTIFICATION D'ÉLÉCTROPHILES LIPIDIQUES PAR SONDE FLUORESCENTE DANS LES HUILES ALIMENTAIRES.

Soumis au journal *Analytical Chemistry* (ac-2022-039389) en septembre 2022 sous le titre :

Detecting Lipid-Derived Electrophiles with a Turn-On Fluorescent Probe. Alkylation of 7-Mercapto-4-Methylcoumarin by α,β -Unsaturated Carbonyls Yields Fluorescence Increase used to Quantify 'Electrophilic Content' in Edible Oil Extractions.

Priscilia Diane Mamboundou, Asma Boushah, Alexandre Benoît, Samuel Parent-Vézina, Michel Lord-St-Vincent, Jean-Philippe Guillemette, Mathieu Frenette

2.1 Résumé

Les huiles alimentaires en présence d'oxygène peuvent s'oxyder pour former une multitude de produits sous la forme de carbonyle α,β -insaturé appelés " électrophiles dérivés des lipides ". Ces molécules affectent le goût des aliments contenant des graisses mais agissent également comme des électrophiles en se liant de manière covalente aux amines/thiols des protéines et aux nucléotides de l'ADN. La modification chimique des protéines par les électrophiles dérivés des lipides semble jouer un rôle important dans la santé humaine, mais la quantification de cette classe diverse de composés reste un défi. Dans cette étude, une méthode capable de mesurer le contenu relatif des carbonyles α,β -insaturés dans les aliments contenant des huiles comestibles en utilisant une sonde fluorescente "turn-on" est décrite. La détection des électrophiles est basée sur une sonde pré-fluorescente, la 7-mercapto-4-méthyl-coumarine (C-SH). La fluorescence de la C-SH augmente après l'addition nucléophile aux produits d'oxydation lipidiques électrophiles. Comme les électrophiles dérivés des lipides réagissent à des vitesses différentes avec la sonde fluorescente, et la réponse de la sonde a été exprimée par rapport à un électrophile standard : le *trans*-2-nonéol. Dans ce test, les électrophiles qui réagissent plus rapidement auront une prépondérance dans les mesures effectuées. Grâce à cette technique analytique, il est possible de comparer les équivalents électrophiles dans les frites de plusieurs restaurants, les croustilles, les beurres de noix et l'huile chauffée. Il a été démontré que les croustilles scellées dans une atmosphère à oxygène réduit ont un faible "contenu électrophile" qui augmente avec le temps, alors que dans un emballage perméable à l'oxygène ont un "contenu électrophile" initialement plus élevé qui n'augmente pas

autant avec le temps. À ce stade, cette sonde doit être excitée à 365 nm et les mesures sont prises à 420 nm ; ces courtes longueurs d'onde empêchent son applicabilité dans les applications cellulaires puisque les cellules absorbent et émettent également dans cette région

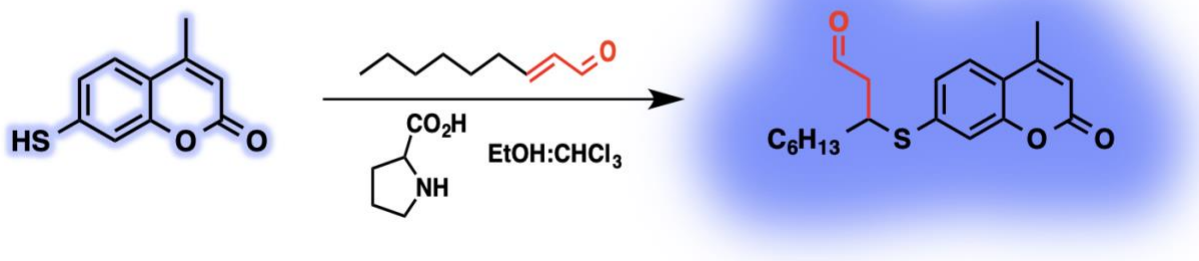


Figure 2.1 : Résumé graphique du chapitre, représentant la détection d'un electrophile par la sonde pré-fluorescente C-SH.

2.2 Contribution des auteurs

L'idée originale a été développée par P.D Mamboundou et M. Frenette. Les expériences de fluorescence, et d'UV-Vis ont été conçus et réalisés par P.D Mamboundou, sous la supervision de M. Frenette. Les co-auteurs Asma Boushah, Alexandre Benoît, Samuel Parent-Vézina, Michel Lord-St-Vincent, et Jean-Philippe Guillemette ont participé au développement de la méthode et certaines mesures expérimentales présentées dans l'article. Le manuscrit a été rédigé par Priscilia Diane Mamboundou et Mathieu Frenette.

2.3 Abstract

In the presence of molecular oxygen, edible oils can oxidize to form a multitude of α,β -unsaturated carbonyl products collectively called 'lipid derived electrophiles'. These molecules affect the taste of fat-containing foods but also act as electrophiles by covalently binding to protein amines/thiols and DNA nucleotides. The chemical modification of proteins by lipid derived electrophiles appears to play an important role in human health, but the quantification of this diverse class of compounds remains a challenge. In this study, a method capable of measuring the relative content of α,β -

unsaturated carbonyls in food containing edible oils by using a “turn-on” fluorescent probe was described. The detection of electrophiles is based on a pre-fluorescent probe, 7-mercapto-4-methyl-coumarin (C-SH). The fluorescence of C-SH increases after nucleophilic addition to electrophilic lipid oxidation products. Since different lipid derived electrophiles will react at a different rate with our fluorescent probe, the probe’s response was expressed against a standard electrophile: *trans*-2-nonenal. In this assay, electrophiles which react more quickly will have more impact in the measurements carried out. Using this analytical technique, the electrophilic equivalents in French fries from several restaurants, potato chips, nut butters and heated oil was compared. It has been shown that potato chips sealed in reduced oxygen atmosphere have a low "electrophilic content" that increases with time, while in an oxygen-permeable package have an initially higher "electrophilic content" that does not increase as much with time. At this point, this probe must be excited at 365 nm and measurements are taken at 420 nm; these short wavelengths prevent its applicability in cell-based applications since cells also absorb and emit in this region.

2.4 Introduction

Growing evidence reveals that electrophiles generated during lipid oxidation have deleterious health effects (Esterbauer et al, 1991; Sayre et al, 1997). In an extreme example of an electrophile’s effect on health, we note that many chemical warfare agents are designed to act as electrophiles. VX and other organophosphorus nerve agents are electrophilic molecules that covalently attach to acetylcholinesterase and suppress nervous control of muscles—including the diaphragm with deadly consequences (Wiener & Hoffman, 2004). Phosgene and mustard gas are other examples of strongly electrophilic molecules developed as warfare chemicals (Figure 2.2) (Yang & Baker, 1992). Some chemotherapy drugs (Brock, 1989) and insecticides (Metcalf, 2002) harness similar reactivity, albeit with increased selectivity.

Most chemists know of benzene’s toxicity, however, as C_6H_6 it is innocuous. In the liver, one of its double bonds is transformed into an epoxide (by cytochrome P450) to form benzene oxide and this molecule causes electrophilic damage that may lead to leukemia (Snyder et al, 1993). Most people won’t suffer the effects of mustard gas or benzene, but none of us can (yet) escape lipid oxidation and the electrophiles it generates.

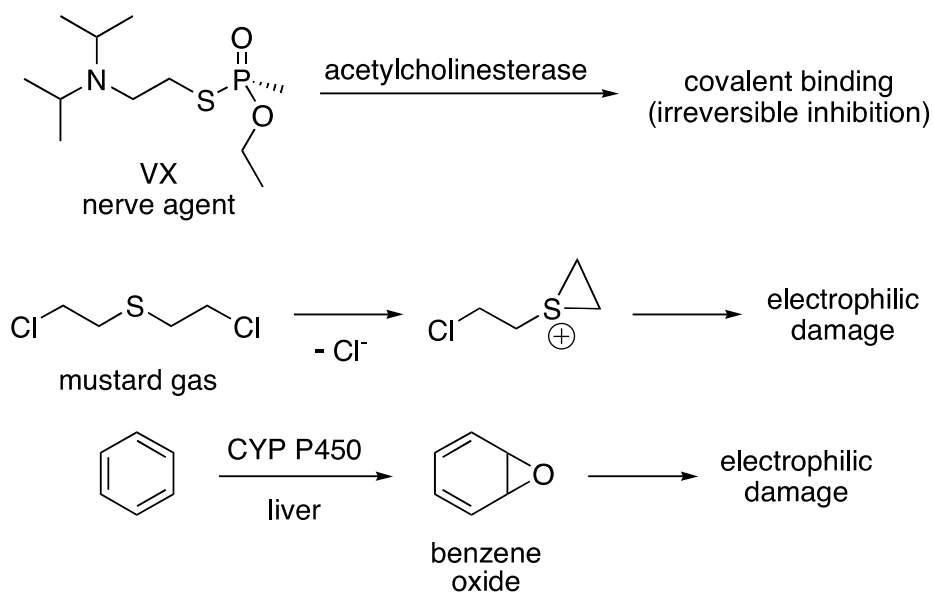


Figure 2.2: Examples of electrophiles with deleterious effects on human health and their mechanism of action.

While lipids are known sources of electrophiles, they are necessary components of food as they provide energy and key building blocks of cell-based life. Lipids in food also contribute to texture, taste, and help reach a feeling of satiety. In the presence of oxygen and during high temperature processing, however, lipid oxidation products significantly contribute to “off-flavor” and limiting their formation in foods is an important role of food scientists (Shahidi & Hossain, 2022).

Autoxidation is the most common lipid oxidation process in foods and hydroperoxides are a primary product (Buettner, 1993). Subsequently, hydroperoxides can decompose into lipid derived electrophiles in which many contain the motif of α,β -unsaturated carbonyl (Figure 2.3). Indeed, lipid derived electrophiles can react with protein thiols and amines, and with DNA bases causing potentially harmful modifications to the organism (Francisco et al, 2011). Many research publications have linked these findings (and oxidative stress in general) to apoptosis, neurodegenerative diseases, and even aging in general (Sunny, 2012; Simonian et al, 1996; Finkel & Holbrook, 2000; Frenette, 2009). Hence the importance of introducing antioxidants in processed foods to limit the impact of reactive oxygen species in lipid chemistry (Buettner, 1993; Lanterna et al, 2017).

Glutathione is a key cellular defender against lipid derived electrophiles, and electrophiles in general. As a thiol-containing pseudo-tripeptide, glutathione that can react with electrophiles

(Figure 2.4a), thus acting as a sacrificial reagent to prevent the modification of proteins and DNA (Min-Hyuk et al, 2010). It can also reduce lipid hydroperoxides to prevent the formation of lipid derived electrophiles from their molecular precursors (Min-Hyuk et al, 2010).

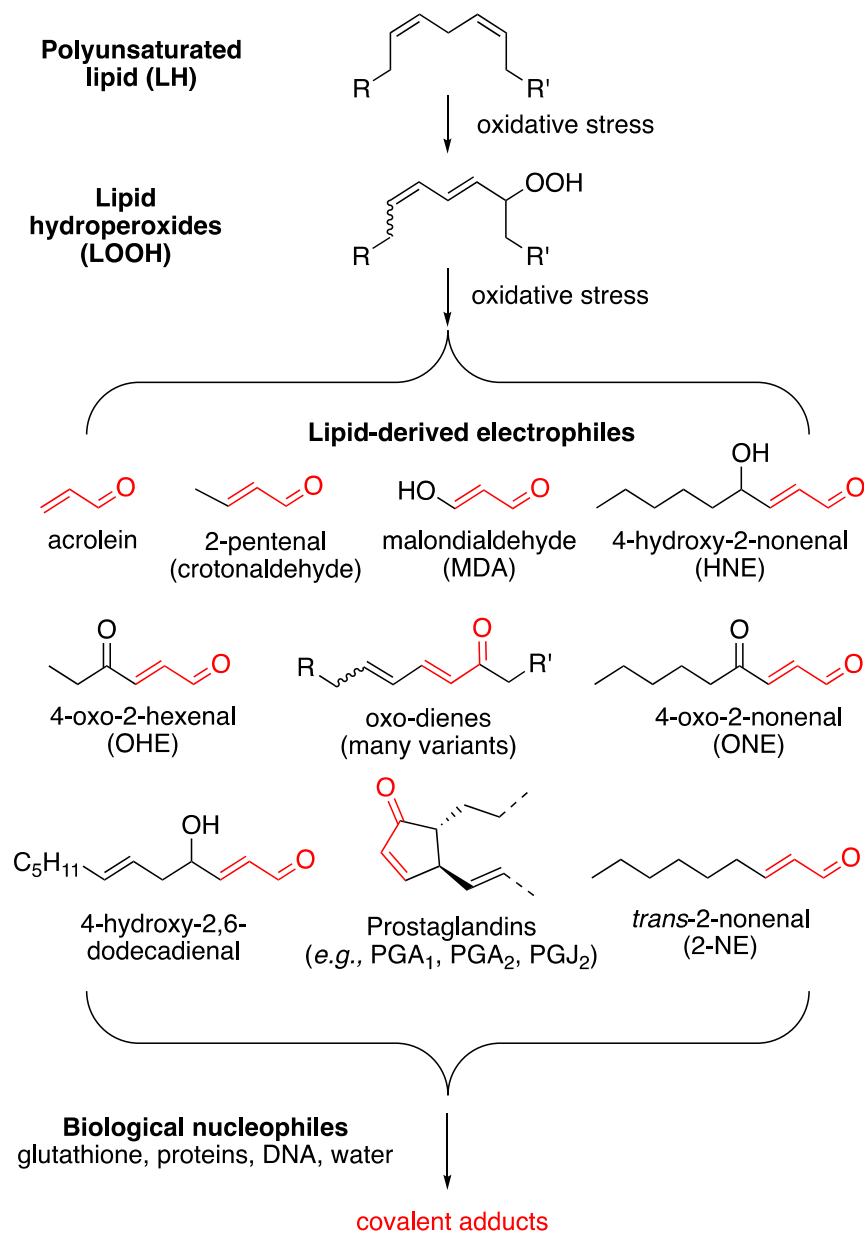


Figure 2.3: The oxidation of polyunsaturated lipids (LH) generates electrophiles with α,β -unsaturated carbonyl moieties (highlighted in red) which can react with nucleophiles present in biological systems.

Many efforts are currently devoted to the study of lipid oxidation products to limit their toxic effects and off-flavor contribution. For this purpose, several analytical methods such as the

peroxide value (POV, oxidation of iodide by lipid hydroperoxides), TBARS index (formation of a colorful compound by reacting thiobarbiturate with malondialdehyde), and p-Anisidine value (p-AV, formation of a colorful compound by reacting p-anisidine with ketones/aldehydes) (Barriuso et al, 2015; Chu, 1991; Shahidi et al, 2002; Wrolstad et al, 2005; Raharjo & Sofos, 1993) were found. Of course, chromatographic methods can yield more specific information about a sample's composition, however, the necessary processing of lipid samples to allow their injection in gas chromatography or liquid chromatography columns (e.g., trans-esterification under basic conditions) will presumably alter the electrophilic content of the lipids analyzed.

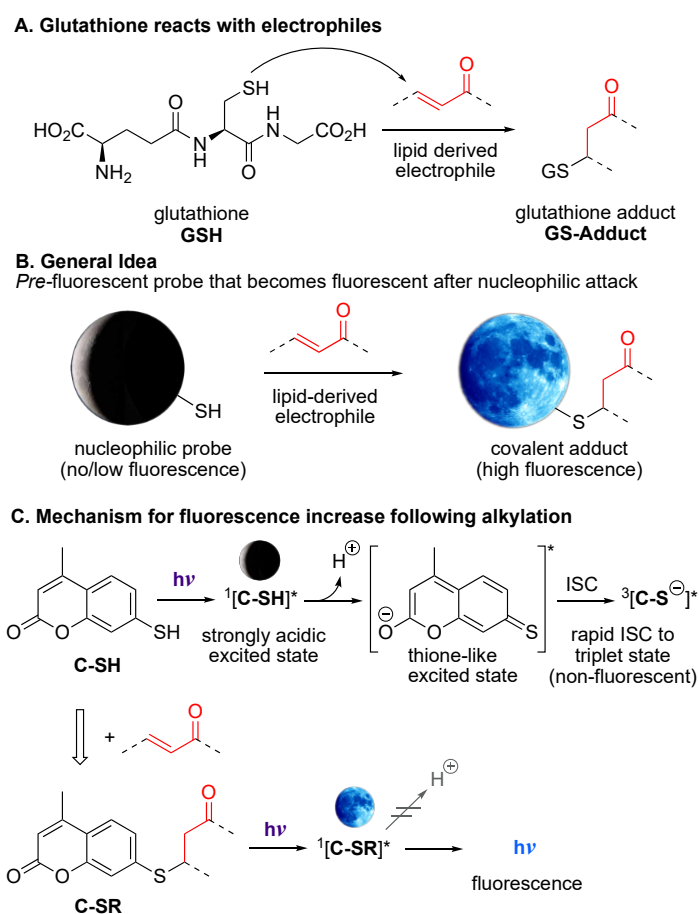


Figure 2.4: (A) Glutathione is a nucleophilic peptide that reacts with lipid derived electrophiles. (B) Description of the general idea, whereby a thiol with low fluorescence become fluorescent after reaction with a lipid derived electrophile. (B) The pre-fluorescent probe 7-mercapto-4-methylcoumarin (**C-SH**) displays low fluorescence in solvents capable of accepting protons. Alkylation of **C-SH** with lipid derived electrophiles forms **C-SR** which cannot lose a proton in the excited state and displays increased fluorescence.

As an analytical tool, fluorescent probes are attractive platforms to analyze food samples. They can yield strong signals with low background, their signals are often stable over long periods of

time, and changes in their fluorescence can occur specifically with a targeted analyte. Numerous reported applications of organic fluorescent probes in food safety testing were developed to detect inorganic cations and anions, as well as small molecules such as hydrogen sulfide, hydrazine, formaldehyde, and benzenethiol (Duan et al, 2021).

In this paper, a simple and rapid technique to assess the level of electrophiles in food products using a pre-fluorescent probe, 7-mercapto-4-methylcoumarin (C-SH) was introduced. The proposed method allows a rapid evaluation of electrophiles in extracted edible oils. The detection of electrophiles is based on the pre-fluorescent nucleophile 7-mercapto-4-methylcoumarin (C-SH). C-SH is weakly fluorescent in protic solvents ($\Phi_F < 0.005$, methanol) due to its increased acidity in excited state (excited state $pK_a < 0.74$) (Lantern et al, 2017). Like glutathione or other thiols, the thiol group from C-SH can react with α , β -unsaturated carbonyls via Michael addition (Figure 2.4B,C). This process is accelerated via proline catalysis to form an alkylated thiol probe (C-SR) that displays an increased fluorescence response. Thus, with its thiol group capable of acting similarly to nucleophilic sites in proteins, the basic principle of this method is to quantify the “turn-on” response of C-SH in the presence of lipid derived electrophiles. The aim is to develop a rapid analytical technique that allows a general evaluation of all electrophiles contained in an oil sample.

2.5 Experimental section

2.5.1 Materials

All solvents, chemicals and reagents used in this work are detailed in the supporting information.

2.5.2 Oil extraction method

Low polarity components of oil in food were extracted using dichloromethane. The advantage of this solvent is the ease of extraction and the low temperature needed to remove the solvent by rotatory evaporator. The standard method of extraction using methanol and chloroform was avoided since methanol could react with electrophiles during processing and, particularly, during evaporation. Approximately 200 g of oil-containing food were weighed using an analytical balance and placed in a 1 L beaker. It was also possible to use less material. Approximately 250 mL of

dichloromethane was transferred into a beaker to cover the oil-containing food and the sample was agitated/crushed with a stirring rod for approximately 15 minutes. The liquid was recovered in a large (pre-weighted) round bottom flask by pouring the mixture through a funnel fitted with cotton wool or filter paper. The beaker and funnel were rinsed with dichloromethane to recover residual oil. The solvent was evaporated on a rotary evaporator (rotovap) under reduced pressure and mild heating. A figure describing the process is shown in Figure 4. For oil extraction from the nut butter samples (data in SI), the samples were mixed in dichloromethane followed by a centrifugation step in 50 mL falcon tubes at 3000 RPM for 10 minutes. The (slightly cloudy) soluble fraction above the pellet of precipitate was carefully recovered and evaporated by rotovap to recover the soluble portion of oil. The purified extracted oils were typically diluted using 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5 mL of oil in 25 mL volumetric flasks of the usual solvent. These dilutions ensured the electrophilic content measurements fell within the linear range of the method. The limit of quantification is approximately 0.001 mM in *trans*-2-nonenal equivalents (see SI).

2.5.3 'Electrophilic content' measurements

All analyses were done using 1:1 v/v chloroform:ethanol as solvent. A stock solution of *trans*-2-nonenal (30 mM) was prepared by diluting 50.0 μ L of pure *trans*-2-nonenal into a 10 mL volumetric flask. This solution was further diluted using a 100 μ L syringe to prepare stocks of 0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, and 0.3 mM in 10 mL volumetric flasks. These samples were created on the same day as the analysis to prevent degradation, although the solutions appeared stable for a few days in preliminary tests (data not shown). To ensure the oil sample contained levels of electrophiles that fall within the linear response of our method, oil containing samples were prepared by transferring exactly 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5 mL of extracted oil into 25 mL volumetric flasks then filled with the usual solvent. Stock solutions of 7-mercapto-4-methylcoumarin (C-SH, 28 mg in 25 mL, 6.0 mM) and L-proline (69 mg in 25 mL, 24 mM) were also freshly prepared on the day of the analysis. These solutions are mixed in a 1:1 v:v ratio and this L-proline/C-SH mixture is the last solution to be added before a measurement begins. C-SH will slowly form a non-fluorescent disulfide when exposed to air, and this reaction is accelerated in basic media. The measurements were conducted in polypropylene 96-well microplates and the final volume was 300 μ L. Exactly 100 μ L of a *trans*-2-nonenal (2-NE) standard solution (from 0,

0.06, 0.12, 0.18, 0.24 or 0.3 mM stock solutions) and 100 μL of dilute oil solution (from dilute solutions as mentioned above) were added to the appropriate wells.

1. Extract oil-containing food with excess dichloromethane

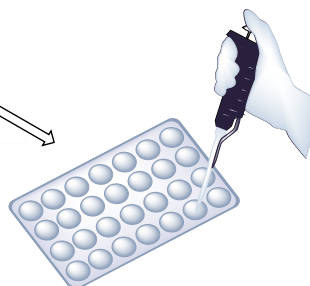
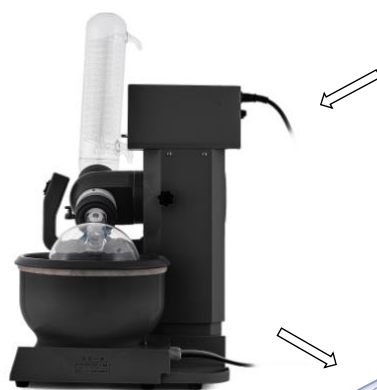


2. Pour supernatant dichloromethane through filter paper, rinse 2-3 x



3. Recover oil by rotatory evaporation using room temperature water bath

Do not over evaporate which may remove volatile electrophiles



4. Distribute solutions into translucent-bottom polypropylene microplate inside a fume hood

a. 100 μL diluted oil or solvent (1:1 chloroform:ethanol)

b. 100 μL of 0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.30 mM 2-NE

c. 100 μL 3 mM C-SH and 12 mM L-proline (freshly prepared)

Caution: Evaporation during sample preparation is a major source of error, as are pipetting errors due to solvent volatility. Time between first pipetting and measurement should be under 5 minutes.

5. Quickly initiate fluorescence kinetic measurements

Measure from bottom using excitation at 365 nm and emission at 420 nm.

Measure rate of fluorescence increase for first 10 minutes of reaction.

Figure 2.5: Protocol for sample preparation and data acquisition.

The reaction time was started when 100 μL of the 7-mercapto-4-methylcoumarin/L-proline solution that was added using an 8-channel multipipette. It is difficult to precisely pipette volatile solvents such as ethanol and chloroform; care should also be taken to limit the evaporation of the

microplate samples since this will change the kinetics of the reaction and the resulting fluorescence. A flat bottom microplate with 96 wells made in semi-transparent polypropylene (Eppendorf) was used and fluorescence measurements were conducted from the bottom. Note that polystyrene microplates are incompatible with chloroform. Fluorescence (excitation at 365 nm and monitored at 420 nm) was measured every 30 seconds in each well and the microplate was shaken in between measurements. The microplate reader used in most experiments was a Tecan infinite M1000 Pro. Measurements were made for at least 500 seconds (typically 1000 seconds) to obtain the initial slope of the fluorescence increase at each sample.

2.5.4 Electrophilic content in heated oils

The oxidation of vegetable oil (canola oil) was carried out by heating the sample with magnetic stirring at a constant temperature of 180°C for a period of 6 hours. Aliquots of the heated sample were removed at 2-hour intervals, transferred into a vial, and rapidly placed in the freezer at -20°C until analysis. Measurements were made according to the standard protocol.

2.5.5 Determination of para-anisidine value (p-AV) and peroxide value (POV)

To compare our method with widely used standard methods in the analysis of oxidized lipids, the p-anisidine index (p-AV) and peroxide value (POV) were measured according to the International Organization for Standardization ISO 6885 (2012), and ISO 3960 (2017), respectively. The p-AV method is based on the reaction of p-anisidine with aldehydes in an acidic medium to form a Schiff base which absorbs at 350 nm. The increase in absorption at this wavelength is reported using the following formula to obtain the para-anisidine value (p-AV):

$$\mathbf{p-AV} = \frac{25 \times (1.2 A_s - A_b)}{m}$$

As is the absorbance at 350 nm of the fat solution after 10 minutes of reaction with the p-anisidine reagent, Ab is the absorbance of the fat solution before p-anisidine is added and *m* is mass of the oil sample (g).

In our analyses, 0.5 to 2.5 g of oil were diluted in 25 mL of isooctane and the absorbances of these solutions were obtained at 350 nm. To 5 mL of these oil containing solutions was added 1 mL of a

p-anisidine solution (0.25 g in 100 mL glacial acetic acid). Exactly 10 minutes after this addition, the absorbance spectrum between 250 and 800 nm was obtained using an Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer. Baseline corrections were found necessary for several samples and the average absorption between 700 and 800 nm was subtracted from the entire spectra before the standard analysis. As received, para-anisidine is often deeply colored with impurities that need to be removed prior to analysis using the protocol reported in ISO 6885 (2012).

For the determination of the peroxide value, 0.5 to 2.5 g of oil reacted with an excess of potassium iodide solution (KI) in the presence of 3:2 v/v acetic acid: chloroform. Iodide (I⁻) will react with hydroperoxides to release iodine (I₂) which is titrated with a standardized solution of sodium thiosulfate (25 g in 100mL) using a starch solution as an indicator. The endpoint was observed by a color change from purple to white. Peroxide values are expressed either in milliequivalents of peroxide/kg or in millimoles of peroxide/L,

$$\text{POV} = \frac{V \times c \times 1000}{m}$$

where V is the titer of the thiosulfate solution, c is molar concentration of the sodium thiosulfate solution (mol/L), and m is mass of the oil sample (g).

2.6 Results and discussion

A probe that increases in fluorescence following nucleophilic addition to lipid derived electrophiles was introduced in this study. The 7-mercapto-4-methylcoumarin (C-SH) is a compound that is weakly fluorescent in protic solvents, however, its fluorescence increases when it binds to electrophiles via S-alkylation (Figure 2.4c). In H-bond accepting solvents, the C-SH excited state is strongly acidic, loses a proton, thus forming a thione group with a delocalization of the negative charge and transitions to the triplet state, hence displaying weak fluorescence. However, when bound to an α,β -unsaturated carbonyl and in the alkylated form (C-SR), it cannot lose a proton in the excited state and, instead, emits fluorescence as a relaxation mechanism (Figure 2.4c). To develop a fast and selective method based on this technique, several experimental conditions were considered. First, *trans*-2-nonenal was chosen as the standard electrophile instead of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) which is better known in the literature. The main reason for this

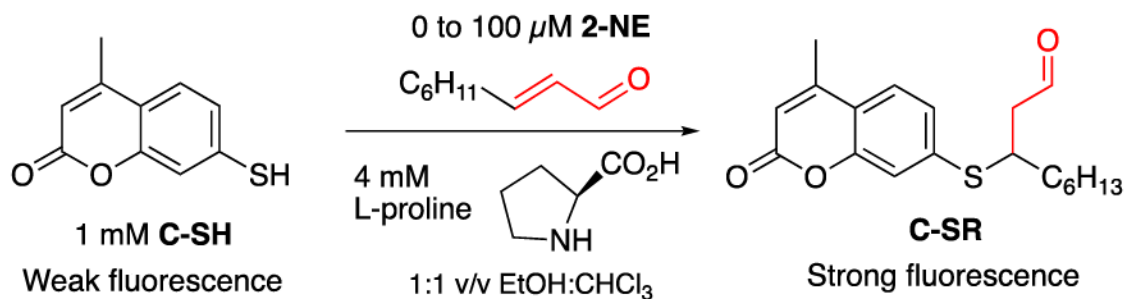
choice is the increased chemical stability and lower cost of *trans*-2-nonenal versus HNE. *Trans*-2-nonenal is also a substance responsible for the unpleasant taste of aged beer and is formed during the oxidation of lipids in foods processed at high temperatures.²⁵ It is an aldehyde formed from linoleic acid as a secondary oxidation product. Thus, due to its ability to act as an electrophile, the kinetics of electrophiles contained in the extracted edible oils will be assessed against the kinetics of *trans*-2-nonenal.

The choice of solvent was important in the development of this method. Indeed, the best solvent to use would be a polar solvent so that it can accept the C-SH proton in the excited state, and once in the deprotonated anionic form, the $^*[\text{C-S}]^{\ominus}$, will rapidly transition to a triplet state without emitting light (Figure 2.4c). Ethanol was a good choice although methanol is more polar, however it is less volatile than methanol due to its higher boiling point. Unfortunately, pure ethanol does not dissolve oils properly, so a second less polar solvent capable of dissolving oils, chloroform (CHCl_3), was added for the analysis (Figure S1). Chloroform (CHCl_3) has other advantages in the development of this method, such as the high quantum yield of C-SR in this solvent ($\Phi_{\text{F}} = 0.79$) which allows a strong fluorescence to be observed (Figure S2). Thus, it was preferable to use a solvent composed of these two substances EtOH: CHCl_3 each of which have their importance. It should be noted that evaporation can still cause problems in the analysis of our results. To minimize these evaporation effects, the 96-well plates are filled quickly, and the analysis time is limited to approximately 10 minutes. Also, to detect less reactive Michael acceptors at lower concentrations, proline was used as a catalyst to accelerate the reaction. Proline is a natural amino acid with a basic function (amine), as well as an acid function (carboxylic acid); allowing it to act not only as a catalyst, but also as a buffer. Proline allows the standard electrophile *trans*-2-nonenal to become a better electrophile. Indeed, it catalyzes the nucleophilic attack to Michael acceptors by forming an iminium cation at the aldehyde or ketone position so that the nucleophilic attack by C-SH occurs faster (Swajcer et al, 2005). (Figure S3).

To select the proper wavelengths, several criteria were taken into account. Firstly, it is necessary to choose the excitation wavelength that results in fluorescence emission. Since extracted oil being analyzed absorbs in the UV, a wavelength close to visible light was chosen. The chosen excitation wavelength is 365 nm. From this wavelength, we can observe the fluorescence spectrum of C-SR which reaches a maximum at 415-420 nm. Based on this observation, it was easy to choose the

emission wavelength to be measured. Therefore, all the oil samples analyzed were observed at 420 nm.

A.



B.

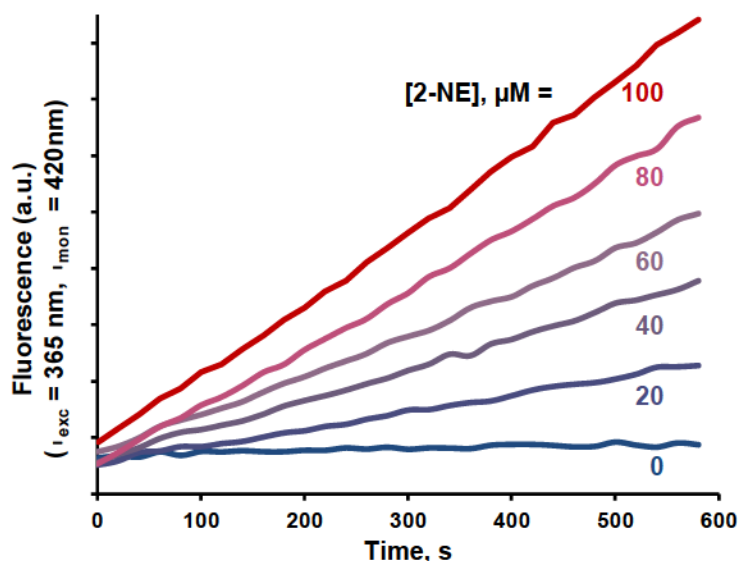


Figure 2.6: (A) Reaction conditions. (B) Typical data obtained in microplate reader kinetic experiments showing the fluorescence increase ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{mon}} = 420 \text{ nm}$) of C-SH (1 mM) reacting with different concentrations of *trans*-2-nonenal (from 0 to 0.1 mM) catalyzed by L-proline (4 mM) in 1:1 (v/v) ethanol and chloroform solvent.

The fluorometric method was used to be suitable for high-throughput screening to analyze multiple samples in parallel using a microplate as a reaction vessel. A kinetic approach to the analysis and the reaction conditions were chosen to be fast enough to limit the analysis time, but slow enough for distinction between the reactivity of different sources of electrophiles studied. It is under these optimal conditions (1mM C-SH, 4 mM L-proline, EtOH: CHCl₃, $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{mon}} =$

420 nm), using *trans*-2-nonenal as a standard electrophile that an increase in fluorescence can be observed as function of the reaction time (Figure 2.6B).

The data in Figure 2.6B show a linear response with time and an increase in the slope, (dF/dt), as the concentration of *trans*-2-nonenal increases. This initial rate of increase in fluorescence is proportional to the concentration of *trans*-2-nonenal as seen in Figure 2.6B ($R^2 > 0.99$). This relationship will become the reference for establishing the electrophilicity index in “*trans*-2-nonenal equivalents”. For the quantification of electrophilic content in extracted edible oils, the same experiment is performed in parallel with a dosed addition of oil added to the reaction medium. The lipid-derived electrophiles contained in the oil cause an increase in the initial rate of fluorescence increase compared to the calibration curve without oil addition. The resulting data yields two parallel curves which represents the method’s response without and with added oil (Figure 2.7).

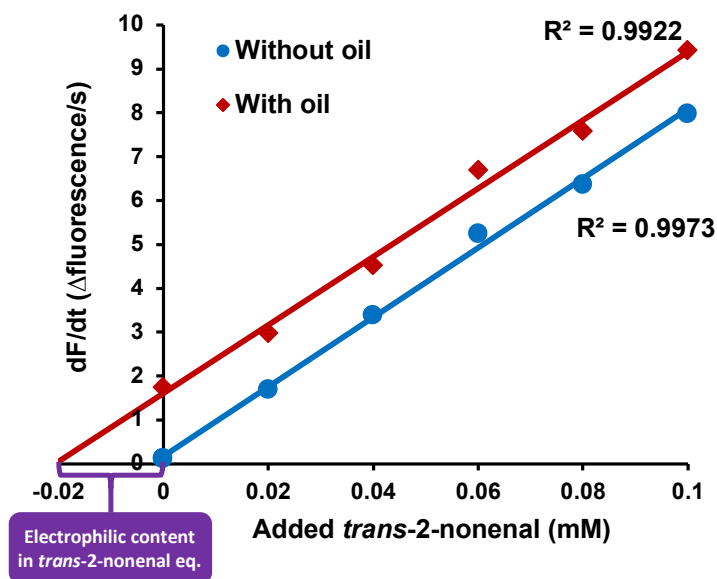


Figure 2.7: Rate of fluorescence increase of the mixture of C-SH (1 mM), L-proline (4 mM) in chloroform:ethanol 1:1 (v/v) as a function of *trans*-2-nonenal concentration. In red, with oil addition and in blue, without added oil.

As expected, the y-axis intercept for the data without added oil is close to zero, however, this value can be higher or lower in the presence of acid or base, respectively (data not shown). With added base, C-SH slowly oxidizes to a non-fluorescent disulfide, and we speculate that added acid may cause C-SH to attack itself to yield an unknown fluorescent product. Nonetheless, the data

shown in Figure 2.7 is representative of a successful experiment with two parallel responses and a clear value for an “electrophilic content” expressed in *trans*-2-nonenal equivalents in the oil-containing sample. In practice, multiple standard addition calibration curves containing different concentrations of added oil were conducted in parallel, in the same microplate. In this way, the electrophilic content of an extracted oil could be obtained for oils containing dilute or more concentrated electrophilic content. The co-linearity of several standard addition curves also proved to be a useful qualifier of a properly prepared microplate. The pipetting of volatile solvents, coupled with the need to quickly prepare microplates, sometimes gave erratic results in the early stages of these experiments, see for example Figure S7. Nonetheless, proper planning and execution gave reproducible results with the reported protocol.

This chosen analysis method differs from the typical application of fluorescent probes in analytical chemistry. For one, our fluorescent probe concentration is in excess of the electrophile analyte. The reason for this choice was to accelerate the analysis method and to obtain a pseudo-first order kinetic growth in fluorescence over time. In these reaction conditions, for the samples with no added oil, the initial rate of fluorescence increase, dF/dt , will be proportional to the concentration of *trans*-2-nonenal as seen from the kinetic treatment.

$$\frac{dF}{dt} = \frac{d[\text{C-SR}]}{dt} = k[\text{C-SH}][E] = k_{obs}[E]$$

where k is the bimolecular rate constant, $[E]$ is the concentration of *trans*-2-nonenal and k_{obs} is the pseudo-first order rate constant which is valid if the concentration of C-SH does not vary significantly.

In the samples with added oil, a multitude of electrophiles will be present (E_1, E_2, E_3 , etc.). Of course, not all electrophiles have the same pseudo-first order rate constant for their reaction with C-SH (k_1, k_2, k_3 , etc.), some being more reactive than others. The equation for the initial rate of fluorescence increases for samples that contain added oil then becomes:

$$\frac{dF}{dt} = k_{obs}[E] + \underbrace{k_1[E_1] + k_2[E_2] + k_3[E_3] + \dots}_{\text{y-axis intercept}}$$

By comparing the curves obtained with and without added oil, we can extract the “electrophilic content” in the oil as shown in Figure 2.7. In our treatment, a more reactive electrophile, i.e., one

with a faster rate constant, will yield a higher “electrophilic content” for the same concentration as a less reactive electrophile. In general, more reactive electrophiles can be considered more acutely toxic. It should be noted, however, that a high response in our assay cannot imply a direct correlation with toxicity, which will depend on many parameters such as physicochemical and biological responses. However, the new C-SR method provide a good indication of the reactivity of electrophiles expressed in *trans*-2-nonenal equivalent. Overall, this value gives an ‘electrophilic content’ of a sample, much like other techniques give the "hydroperoxide value" with iodine titration or the "aldehydes content" analysis with p-anisidine (List B, 2002).

The goal is to develop an accurate and selective method capable of detecting only α , β -unsaturated carbonyls. A control test was performed under the same experimental conditions with nonanal, an electrophile similar to our standard electrophile, *trans*-2-nonenal. This control will validate that C-SH is able to differentiate similar molecules by the targeted moiety. Indeed, the results showed an absence of fluorescence with nonanal and an increase in fluorescence with *trans*-2-nonenal (Figure S4).

The electrophilic content of cooking oil is affected by the age of the oil, heating temperature, duration of heating, type of oil, antioxidant content, etc. (Warner & Eskin, 1995). Indeed, several studies have been carried out on the lipid oxidation of oils such as peroxide value, acid value, malondialdehyde content (Choe & Min, 2007) and p-AV value (Ayodeji & Ganiyu, 2015). Results from these studies reveal a significant increase in acid, peroxide, p-AV values and malondialdehyde concentration of heated oil compared to fresh oil. Higher values indicate increased lipid peroxidation by product content (Shahina et al, 2004).

Using the method described herein, we measured the electrophilic content in canola oil during heating at 180°C. As expected, the amount of lipid derived electrophiles increases over time as the oil reacts with molecular oxygen (Figure 2.8). Oil heated for 6 h contained approximately 80 times the concentration of electrophiles (0.87 mM in *trans*-2-nonenal equivalents) compared to that of freshly opened oil (0.01 mM).

Using the same heated oil samples, our method’s results were compared with those obtained from standardized protocols ISO 3960:2017 for the determination of peroxide value (POV) and ISO 6885:2012 for the determination of p-anisidine value (p-AV). While the electrophilic content was initially close to zero, the peroxide value for freshly opened oil was non-negligible at 2.0 mmol per kg (see Figure S5). After heating for 6 hours, the peroxide value increased to 11.4 mmol

per kg and followed a similar upward curve as did the electrophilic content. The measured p-AV also gave a similarly shaped but less pronounced increase ($p\text{-AV}_{0h} = 2.4 \rightarrow p\text{-AV}_{8h} = 25.7$) as the electrophilic content (Figure S6).

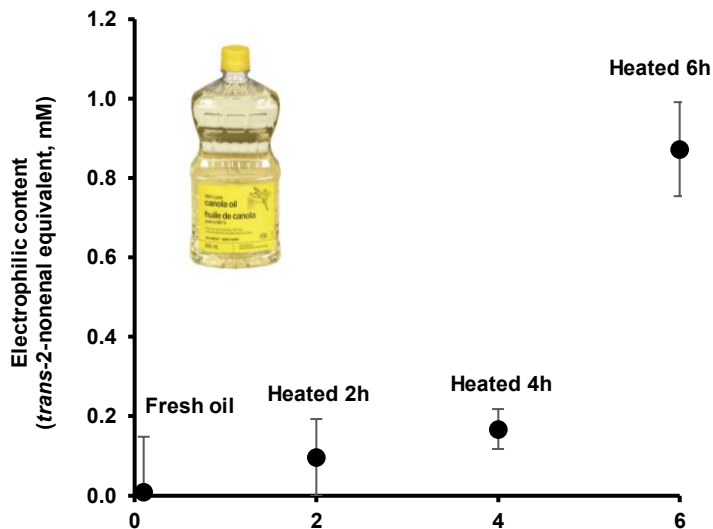


Figure 2.8: Measurement of electrophilic content, expressed as *trans*-2-nonenal equivalents, for canola oil heated at 180°C.

Given that the electrophilic content in heated oil followed a similar increase to well established methods. A study was made on the electrophilic content in other oil-containing food. An interesting comparison was seen between aged samples of potato chips by two manufacturers, Lays® and Pringles®. The packaging for these two potato chips differs in an important way—the Lays chips are sealed in metallized plastic with a reduced oxygen atmosphere whereas Pringles containers are more porous to oxygen. It was expected that the oil in Lays potato chips would be lower in electrophilic content as the bag is opened, but that the electrophilic content would increase as the chips are exposed to air.

The experiment was performed by opening a bag of Lay’s or tube of Pringles potato chips and extracting oil by the usual method (dichloromethane extraction) at different times since the package opening. The goal of the experiment was to follow lipid oxidation by air in real food samples over time, and to compare the results obtained by the C-SH probe and those obtained from the well-established analysis techniques that determine peroxide value and para-anisidine value. The samples were followed for 9 days following the opening of the packaging and the comparison for all three measurement methods are shown in Figure 2.9A-C.

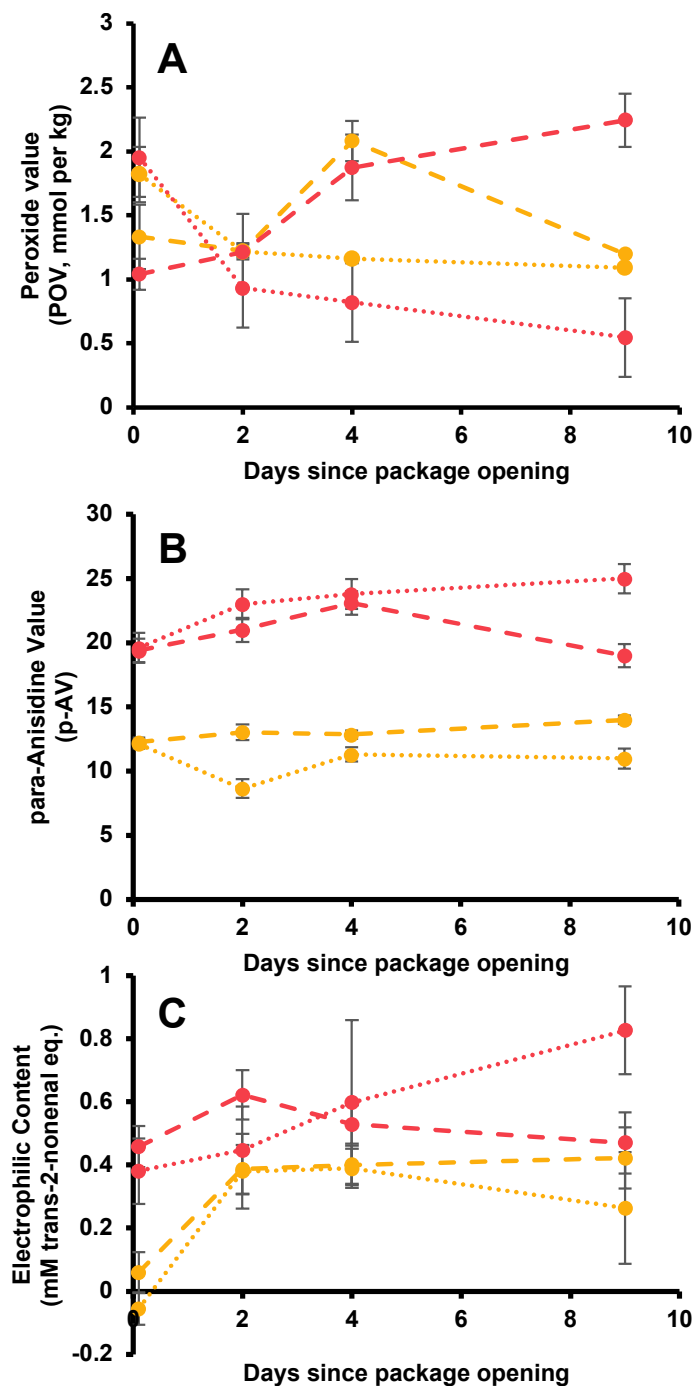


Figure 2.9: Analysis of oil extracted from Pringles® (red) and Lay's® (orange) chips as a function of days since package opening. Two samples were followed for each type of chips; “sample 1” uses line dash to connect data points and dots connect data points from “sample 2”. (A) Peroxide value (POV) obtained by titration with iodide according to ISO 3960. (B) Detection of carbonyls according to the para-anisidine method ISO 6885. (C) Quantification of ‘electrophilic content’, expressed as *trans*-2-nonenal equivalents, using the pre-fluorescent C-SH probe.

Figure 2.9A shows the measured peroxide value of oil extracted from Lay's and Pringles chips as a function of time since package opening. Two samples were studied for each type of chip. Despite significant variability in between samples, the total amount of peroxide in the chip samples remained low throughout the analysis—well below values that would indicate a lack of oil “freshness” (Catala, 2012). As pointed out before, the peroxide index becomes less reliable during the later stage of deterioration, as the degradation of peroxides increases (Zhang et al, 2021).

The anisidine index (p-AV) method measures secondary oxidation compounds such as aldehydes in a polyunsaturated lipid substance according to ISO 6885. To determine p-AV, a solution of the extracted oil in isooctane is reacted with p-anisidine in glacial acetic acid to form yellowish reaction products. The anisidine value (p-AV) is then determined from the absorbance measured at 350 nm before and after this reaction. In contrast to the peroxide value method, this method approaches the detection of electrophilic products. As shown in Figure 2.9B, both Lay's and Pringles chips contained para-anisidine reactive compounds, although the oil's response over time does not change significantly. The p-AV measured in Pringles was higher throughout the analysis when compared to the results obtained for Lay's chips. Typically, chips are packaged in a reduced oxygen atmosphere to prevent lipid oxidation during storage (Paik et al, 1994). However, a minor change in the p-AV for both samples after exposing the chips to air was observed. The sudden exposure to air after the package is opened was expected to yield an increase in p-AV, but, this was not the measured result.

The analysis of extracted oil was also performed using developed analytical method. As seen with p-AV, Lay's chips appear to contain fewer lipid derived electrophiles in the same volume of extracted oil than do Pringles chips (Figure 2.9C). A significant increase of lipid derived electrophiles, as measured in *trans*-2-nonenal equivalents (t-NE), was reported following the opening of the Lay's packaging. This result was expected since exposure to oxygen will cause lipids to oxidize into a variety of lipid derived electrophiles. These oxidation products are known to affect the taste of chips and a change of taste over time was also noted by the authors. Also, a dramatic increase in lipid derived electrophiles in Pringles chips was not observed as was seen in Lay's chips. The taste of Pringles chips, as judged by the authors, did not seem to vary as much as a function of days since package opening.

After comparing the responses of standardized methods (POV & p-AV) with the t-NE method (Figure 2.9a-c), each method responds differently to the same extracted oil samples. More analysis

is required to conclude which method better reports useful information, such as taste of product or oil toxicity. A noted advantage of the t-NE method over the p-AV method is the lack of glacial acetic acid needed in the analysis. The compound para-anisidine is also unstable in air, where it forms dark impurities that need to be purified before analysis. All three analytical techniques used in this study do not require chemical derivatization or saponification of oils, as do standard chromatographic methods (gas and liquid chromatography). The saponification step, in particular, will presumably react with electrophiles and reduce the amount of lipid derived electrophiles measured in chromatographic analyses.

Some exploratory studies were performed to detect the presence of electrophiles in certain foods. Generally, a major source of oxidized lipids is fried food, therefore, we began an analysis of oil extracted from French fries from different restaurants in the Montreal region. The data shown in Figure 2.10 represents a measurement of the electrophilic content in French fries from 6 restaurants: McDonald's, Burger King, Belle Province, Valentine's, Lafleur and Vulcano. As usual, the extracted oil was analyzed by following the increase in fluorescence following the reaction of C-SH with lipid derived electrophiles in the oil. The electrophilic content is expressed as *trans*-2-nonenal equivalents (t-NE).

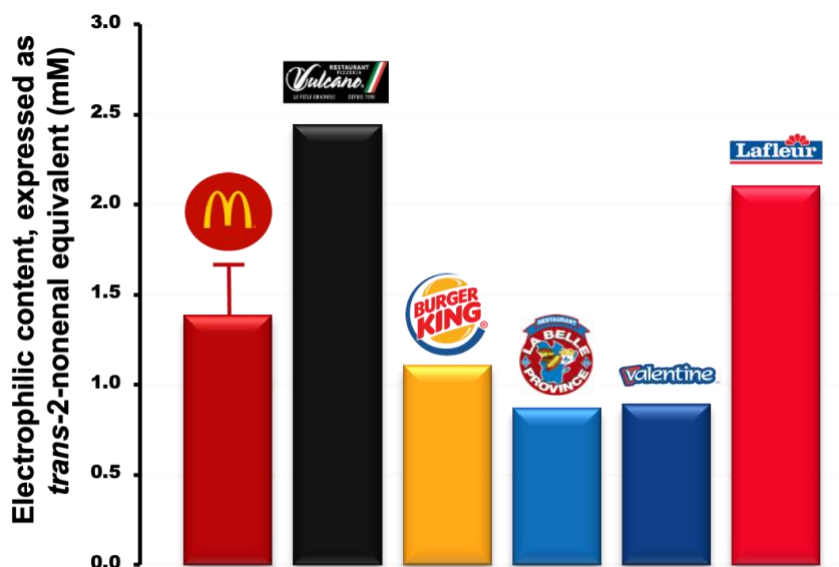


Figure 2.9: Comparison of electrophilic content, expressed in *trans*-2-nonenal equivalents, for extracted oils from French fries from 6 restaurants in the Montreal area (McDonald's, Vulcano, Burger King, *La Belle Province*, Valentine and Lafleur). The approximate error in the measurement is given in the first column.

The t-NE measurement was also applied to analyze the electrophilic content in some consumer products that contain edible oil. Oil extracted from a variety of nut butters show a modest content in lipid derived electrophiles, as did oil extracted from Tostitos® and Cape Cod brand chip (Figure S6). The electrophilic content in French fries was generally higher, per volume of extracted oil, versus other measured food products. Within these results, we observed an important variation in the electrophilic content between restaurant suppliers. The fries that contained the highest amount of electrophiles were obtained at Vulcano restaurant in Terrebonne, Québec, however, it is important to note that the oil from these fries was extracted the day after they were obtained from the restaurant. It is possible that oil oxidation is partially responsible for the higher electrophilic content in these samples. The other fry samples were extracted soon after purchasing (<2 hours). Fries from A&W could not be analyzed since the extracted oil absorbed too strongly in the 365 nm region.

The fries from Lafleur restaurant obtained on that day contained approximately 2.1 mM in *trans*-2-nonenal equivalents, which is significantly above the values obtained from McDonald's, Burger King, *La Belle Province*, or *Valentine* (~0.9 – 1.4 mM in *trans*-2-nonenal equivalents). These results imply that more reactive electrophiles were present in fries with higher electrophilic content. However, it is important to note that the electrophilic content of French fries from restaurants will vary depending on several factors and that the results presented here are exploratory.

2.7 Conclusion

Electrophiles are known to covalently bind to biomolecules and minimizing their presence during food production is desirable. The rapid quantification of lipid derived electrophiles during food processing, therefore, is an important analytical chemistry challenge. Several methods exist to follow lipid oxidation and the products formed, however, the specific detection of electrophiles using a sensitive pre-fluorescent probe presented herein is a novel and represents a useful addition to available techniques.

The analytical technique is based on an inexpensive and commercially available probe: 7-mercapto-4-methylcoumarin (C-SH). C-SH has a greatly attenuated fluorescence in H-bond accepting solvents due to proton loss in the excited state and intersystem crossing to the non-

fluorescent triplet state. Alkylation of C-SH by α,β -unsaturated carbonyls prevents this loss of excitation energy and yields a more fluorescent product. The kinetics-based assay will give a strong signal for reactive electrophiles, such as acrolein, and lower response for less reactive electrophiles, such as malondialdehyde (Table S1). The signal response, which we call “electrophilic content”, is expressed in *trans*-2-nonenal equivalents (t-NE). This standard electrophile is more stable and less expensive than many other standard lipid derived electrophiles, such as 4-hydroxynonenal.

Using the developed analytical method, a significant variability in the electrophilic content was demonstrated in fries from various vendors; these data are exploratory and do not represent a consistently higher electrophilic content in one restaurant versus another, as these values will depend on many factors. Several other samples were examined, including a comparison of results obtained by two more established analytical techniques: peroxide value (Jeuge et al, 2012) and p-anisidine value. The three techniques follow similar trends with heated oil; however, different responses are seen when analyzing the oil extracted from potato chips as a function of storage time. More work is needed to properly understand these different responses. There remain several problematic sources of error in the method. The effect of solvent evaporation and the rapid pipetting needed to obtain the initial rate of the fluorescence increase can cause some experimental errors, as well as the short wavelengths required to excite the fluorophore which compete for photons with the oil’s absorption at these wavelengths. Despite these limitations, quality data could be obtained ($R^2 > 0.99$ and parallel slopes in standard addition response versus blank). Certainly, a nucleophilic thiol probe with a longer wavelength absorption maximum, but that retains the crucial “turn-on” properties following alkylation, is highly desirable for this assay and to expand the probe’s application in cellular media.

CHAPITRE 3: LIMITES DE LA METHODE ET PROSPECTIVES FUTURES

Comme mentionné dans le chapitre 2, un des plus gros problèmes rencontrés dans la mesure t-NE fut l'évaporation du solvant. Le solvant choisit pour le développement de la méthode a été fait selon deux critères. Premièrement, il devrait être capable de dissoudre à la fois les échantillons d'huile alimentaire, la proline et la molécule de C-SH. Mais aussi, il était important d'avoir un solvant polaire afin qu'il soit capable d'accepter le proton thiol du C-SH pour former l'anion à l'état excité. La combinaison du chloroforme: éthanol 1:1 (v/v) fut le meilleur choix parmi ceux testés en laboratoire, mais ce solvant est tout de même assez volatil. Ceci nécessite un travail rapide et précis lors de la préparation des microplaques afin de minimiser l'effet d'évaporation. Toutefois il est assez difficile de remplir ces conditions, d'où l'incapacité d'obtenir une certaine reproductibilité dans les résultats. Mais aussi, le système de solvant très volatil a un impact significatif sur l'obtention des résultats adéquats. En effet, à fortes concentrations, l'augmentation de la fluorescence n'est plus linéaire du fait des phénomènes de réabsorptions de photon émis et l'effet d'écran. Ce problème fut rencontré principalement pour certaines huiles trop jaunâtres telles que les huiles extraites de hot dog ou des frites A&W qui n'avaient pas de résultats concluants. 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. Bien que ce problème puisse être contourné en faisant des dilutions aux échantillons d'huile, cependant une trop forte dilution diminuera la concentration des électrophiles en dessous de la limite de détection (0.001mM). Pour remédier à ce problème, l'idéal serait de développer une sonde fluorescente capable d'absorber à des longueurs d'ondes plus larges soit dans le visible afin qu'elle ne puisse pas interférer avec d'autres espèces absorbantes. Avec une telle sonde, il serait capable d'élargir le domaine d'application de la méthode et envisager la détection des électrophiles dans les milieux cellulaires ou biologiques.

CONCLUSION

Au sortir de cette étude, une méthode d'analyse faisant usage d'une sonde nucléophile pré-fluorescente à partir d'un dérivé de la coumarine appelé le 7-mercapto-4-méthyl-coumarine (C-SH) a été développée. Cette sonde C-SH, est capable de détecter les composés carbonyles α,β -insaturés dans les huiles alimentaires sous des conditions optimales (1mM C-SH, 4 mM L-proline, EtOH: CHCl₃, λ_{exc} = 365 nm λ_{mon} = 420 nm). La technique C-SR développée est basée sur l'ajout dosée d'un électrophile standard, le *trans*-2-nonenal, permettant ainsi d'établir un indice d'électrophilicité dans les échantillons. Une méthode qui dépend de la cinétique de pseudo-premier ordre pour l'addition du C-SH aux électrophiles d'un échantillon, et les résultats sont rapportés en « équivalents de *trans*-2-nonenal ». En somme, les résultats présentés ont permis de montrer le potentiel de cette méthode à devenir une méthode analytique standardisée dans la quantification des électrophiles des produits alimentaires. À la vue des nombreuses recherches sur la nocivité des électrophiles pour la santé, il serait possible pour les entreprises agro-alimentaires d'ajouter un test d'électrophilicité à leurs tests de routines sur les aliments vendus. Ainsi, il serait envisageable d'afficher l'indice d'électrophilicité sur les étiquettes des produits alimentaires afin d'informer les consommateurs sur la qualité nutritionnelle des aliments.

Les avantages de cette méthode par rapport aux méthodes usuelles telles que les techniques chromatographiques (GC, HPLC) sont que l'analyse est rapide, et la préparation des échantillons est moins destructives. En effet, les méthodes chromatographiques requièrent certaines étapes préparatoires avant l'injection des huiles alimentaire dans les colonnes chromatographiques. Ces étapes tels que la saponification des triglycérides peuvent endommager les propriétés des échantillons et ainsi réduire le taux d'électrophile. La présence de base et de chaleur induirait certainement une réaction avec les cétones α,β -insaturées, ce qui réduirait les valeurs de taux rapportées pour les électrophiles (Boushah, 2020). Toutefois, la méthode d'analyse par fluorescence ne requiert qu'une extraction des huiles au dichlorométhane suivie d'une évaporation à basse température sans aucun traitement additionnel, ne pouvant ainsi altérer le contenu d'électrophiles.

Aussi, la méthode d'analyse par C-SH permet une évaluation totale du contenu d'électrophile dans un échantillon alimentaire sans avoir à manipuler un acide fort. Contrairement à la méthode de

détermination de l'indice de p-aniside qui nécessite l'utilisation de l'acide acétique glacial, ou encore l'étape de saponification dans les méthodes chromatographiques.

De nos jours, de plus en plus de recherches démontrent les effets nocifs des électrophiles pour notre organisme. D'où le développement des nouvelles techniques afin de pouvoir les détecter et les quantifier. On s'attend naturellement à de nombreuses avancées dans la recherche sur l'oxydation des huiles et leurs effets sur notre santé. Mais aussi, à une possible découverte d'une molécule anti-électrophile agissant comme un antioxydant afin de neutraliser les électrophiles et dont la durée de vie dans les aliments ne sera pas limitée. Éventuellement, cette molécule anti-électrophile ne devra pas être nocif pour l'organisme.

SUPPORTING INFORMATION

Detecting Lipid-Derived Electrophiles with a Turn-On Fluorescent Probe. Alkylation of 7-Mercapto-4-MethylCoumarin by α , β -Unsaturated Carbonyls Yields Fluorescence Increase to Quantity ‘Electrophilic Content’ in Extracted Edible Oils.

Materials and Reagents

7-Mercapto-4-methylcoumarin (97%), trans-2-nonenal, L-proline, 1-nonanal, Hexane ACS and Chloroform HPLC, were obtained from Sigma-Aldrich. Dichloromethane ACS was supplied by Caledon. Ethanol 100% and Methanol ACS were provided respectively by Commercial alcohols and Anachemia. Acrolein, Malondialdehyde, and Acrylamide were also obtained from Sigma-Aldrich. The semi-transparent polypropylene microplate was purchased from Eppendorf.

Instruments

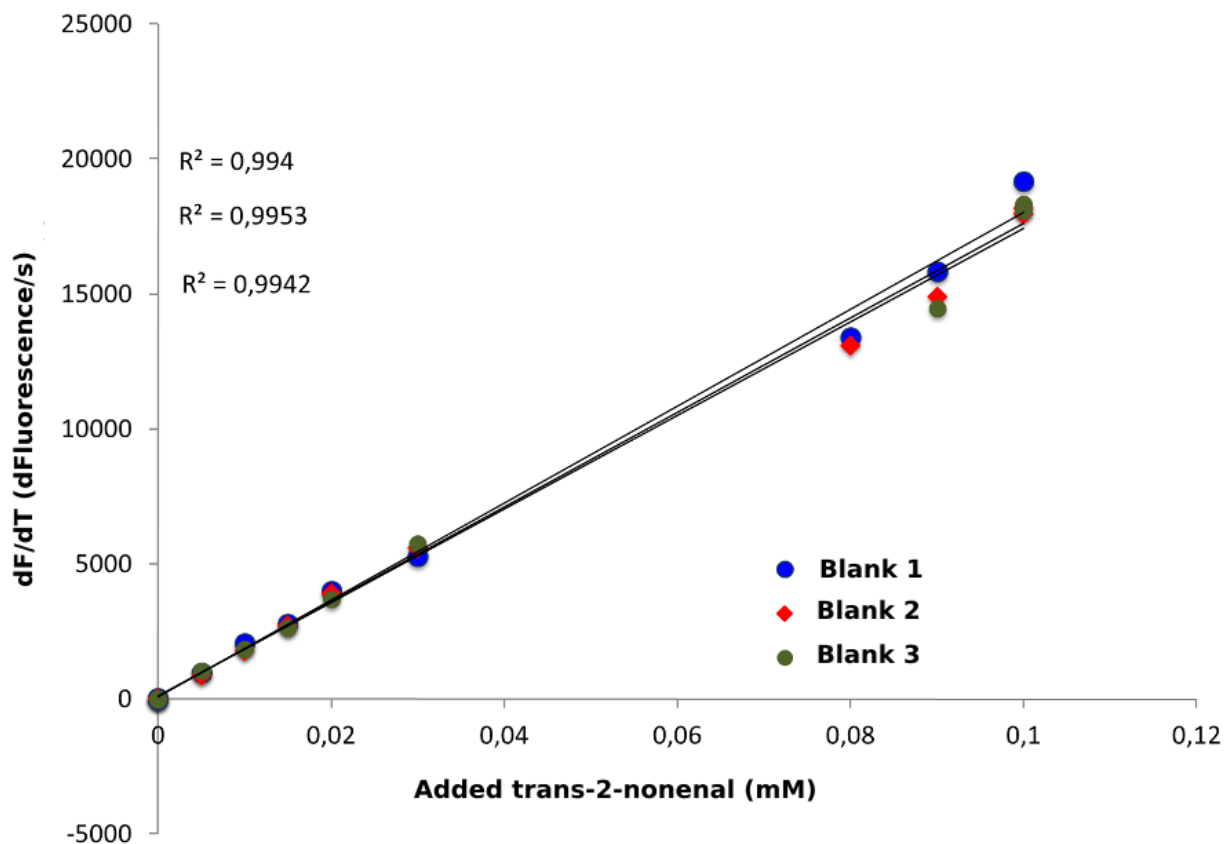
UV–Vis absorption spectra were measured on an Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer and the microplate reader used in most experiments was a Tecan infinite M1000 Pro.

Purification of 7-mercapto-4-methylcoumarin

To remove some impurities from the commercial product, 7-mercapto-4-methylcoumarin (C-SH) (97% pure) is first recrystallised from a mixture of hexane and dichloromethane. C-SH is not very soluble in low polar organic solvents, so hexane is used as the solvent for its purification. Typically, 1.5 g of C-SH is placed in an Erlenmeyer flask equipped with magnetic bar. After the addition of hexane (~ 50 mL), the mixture is stirred and heated. A minimum of dichloromethane is then added via squirt bottle to achieve complete dissolution of the C-SH. The evaporating dichloromethane also cleans the walls of the Erlenmeyer flask from undissolved C-SH powder. The solution is then removed from the hot plate to cool and to allow the dichloromethane to evaporate so that the C-SH, which is poorly soluble in hexane, recrystallizes and the crystals are recovered. Typical recovery is 50-70%.

Calculation of Limit of Quantification (LOQ)

To determine the reproducibility of the method, a calibration curve of the rate of fluorescence increase as a function of added trans-2-nonenal was measured in triplicate. The figure shown below demonstrates a relatively reproducible method, as there is minimal deviation between the three calibration curves.



In these experiments, the standard deviation for the response with no added electrophile ($n = 6$) was equal to 19.7 (fluorescence increase over time, a.u./sec). To calculate the LOQ, we use the calibration curve equation ($y = 188\,777x + 68.3$) and the standard equation:

LOQ signal = $10 \times$ Standard Deviation of blank

$$\text{LOQ concentration} = \frac{\text{LOQ signal} - 68.3}{188777} = \frac{(10 \times 19.7) - 68.3}{188777} = 0.0008 \text{ mM}$$

The limit of quantification is approximately 0.1 μM in trans-2-nonenal equivalents.

Relative response for the C-SH test vs the p-AV test for various electrophiles

To calibrate our pre-fluorescent probe, we tested some electrophiles under the same optimal conditions to evaluate their responses according to their reactivities. The response of electrophiles with the C-SH method were compared with those of the standardized p-anisidine index method. For this purpose, stock solutions of acrolein (0.3 mM), acrylamide (0.3 mM), 1-nonanal (0.029 M) and malonaldehyde (0.1 mM as tetrabutylammonium salt) were prepared. From these solutions, six standard solutions of each (from 0.03 mM to 0.024 mM) were prepared in 10 mL volumetric flasks. The solutions were analyzed according to the procedure of the two existing methods. The slope of the calibration curve for each electrophile was used to estimate the relative response of each electrophile using the two methods.

Table S1. Relative response for the C-SH test vs the p-AV test for various electrophiles

	C-SH		p-AV	
	C-SH signal ^a	Normalized to trans-2- nonenal	p-AV signal ^b	Normalized to trans-2- nonenal
trans-2-nonenal	17.0	1	3.72	1
nonanal	no increase	-	-	0.13
acrolein	155	9.11	183.39	49.3
malondialdehyde	no increase	-	no increase	-
acrylamide	3.1	0.18	9.73	2.62

^aSlope of the rate of fluorescence increase vs concentration of electrophile. ^bSlope of the absorption at 350 nm after the standard 10-minute reaction vs concentration of electrophile.

Choice of solvent

H-bond accepting solvents such as methanol or ethanol are necessary in our method due to the mechanism of fluorescence quenching in C-SH. In pure chloroform, the fluorescence quantum yield of C-SH is 0.096. This significant fluorescent quantum yield gives too strong a signal which obscures the fluorescence increase following alkylation with dilute lipid derived electrophiles. In methanol, however, C-SH is practically non-fluorescent ($\Phi_F < 0.005$) since its excited state can lose a proton to become a non-emissive anion (Figure S2). Extracted lipides are poorly soluble in polar solvents such as ethanol and methanol (left and center test tubes as seen below). A compromise between lipid solubilizing solvent and polar solvent necessary to attenuate C-SH fluorescence was found in 1:1 ethanol:chloroform (right test tube).

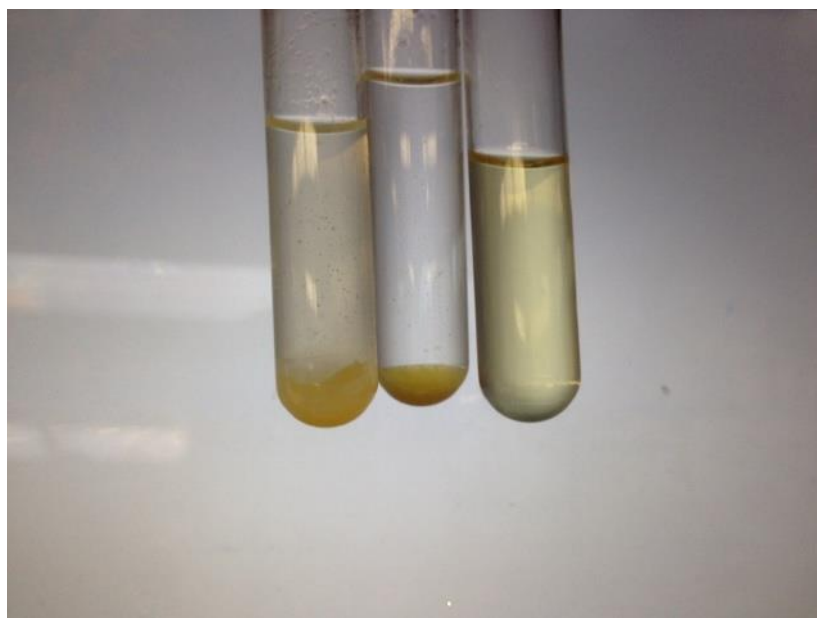


Figure S1. On the left the mixture of oil in ethanol, in the centre in methanol and on the right in the 1:1 (v/v) EtOH: CHCl₃.

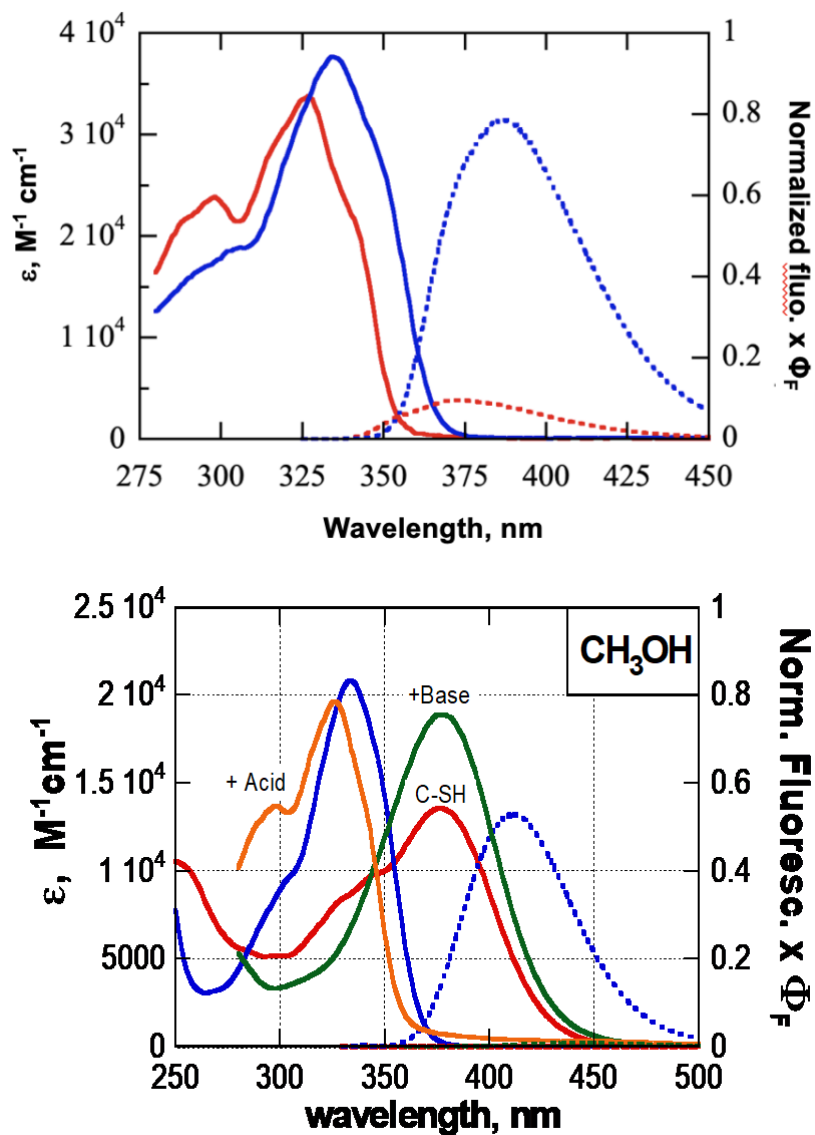


Figure S2. Absorption and emission spectrum of C-SH (red) and its methylated product C-SMe (blue) in chloroform (top) and methanol (bottom) (solid line: absorption, dashed line: fluorescence). Data from: Frenette, M. Advances in free radical oxidation: Mechanistic studies, fluorescent probe design and radically different antioxidants. PhD Thesis, Ottawa, 2009. <https://ruor.uottawa.ca/bitstream/10393/29778/1/NR51812.PDF>

Addition of Catalyst: L-proline

Proline catalyzes nucleophilic addition to α, β -unsaturated ketones by the formation of an iminium that activates the β -position.

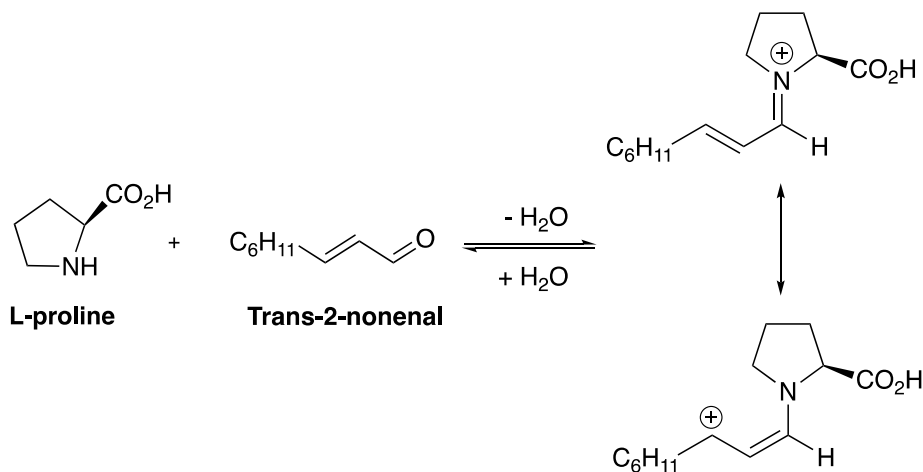


Figure S3. Reaction of L-proline with trans-2-nonenal to form an iminium cation.

Selectivity test

Observation of the increase in fluorescence as a function of time in relation to similar electrophiles: nonanal (red), trans-2-nonenal (blue).

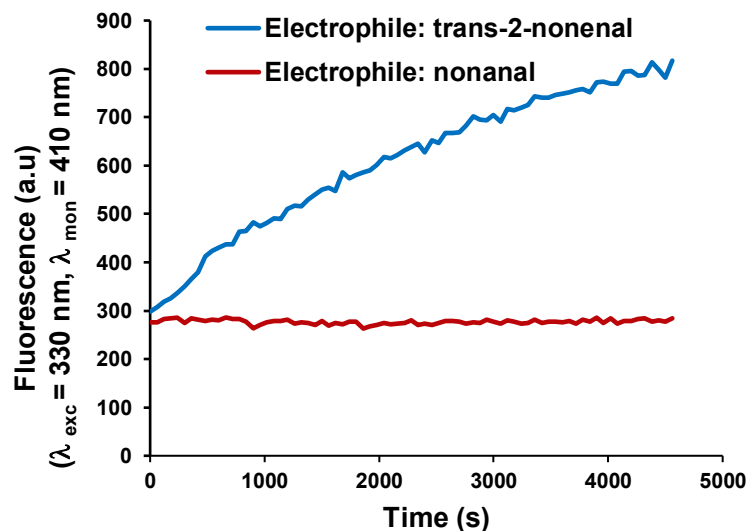


Figure S4. Fluorescence response of C-SH in the presence of *trans*-2-nonenal and nonanal; no fluorescence increase is observed for the reaction with simple aldehyde.

Additional results

Relative response of the three methods (peroxide value (POV), p-anisidine value (p-AV), C-SH method) of a heated Canola oil for 6h. The p-AV and POV responses are normalized to the C-SH response.

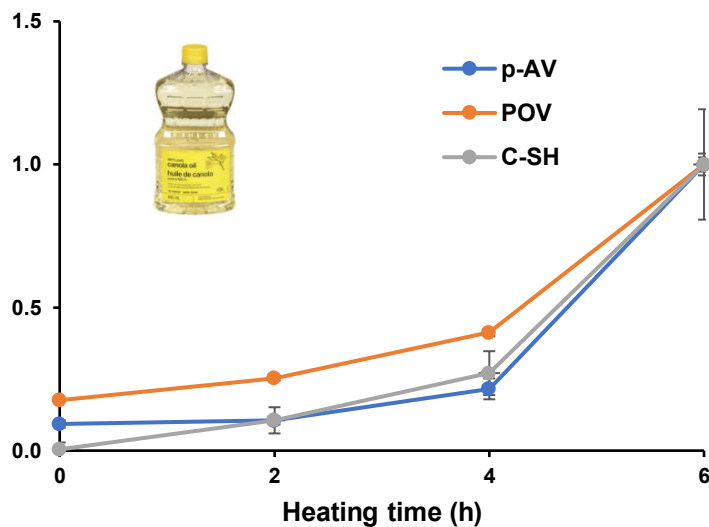


Figure S5. Normalized response of C-SH, p-AV and POV tests for canola oil heated at 180°C.

Results from nut butters and chips. The oils from these samples were extracted using the excess dichloromethane extraction method. However, the oils extracted from the peanut butters were centrifuged at 3000 RPM for 10 minutes.

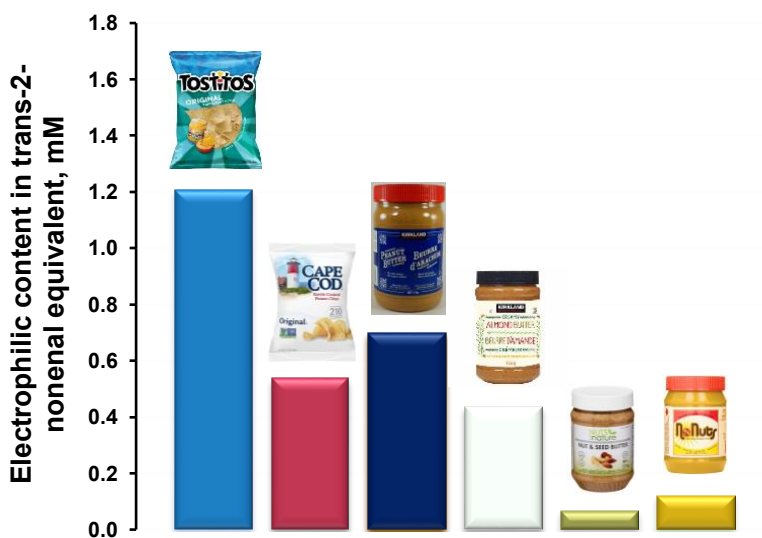


Figure S6. Comparison of electrophilic content, expressed in trans-2-nonenal equivalents, for extracted oils from peanut butters, Tostitos, and Cape Cod brand chip.

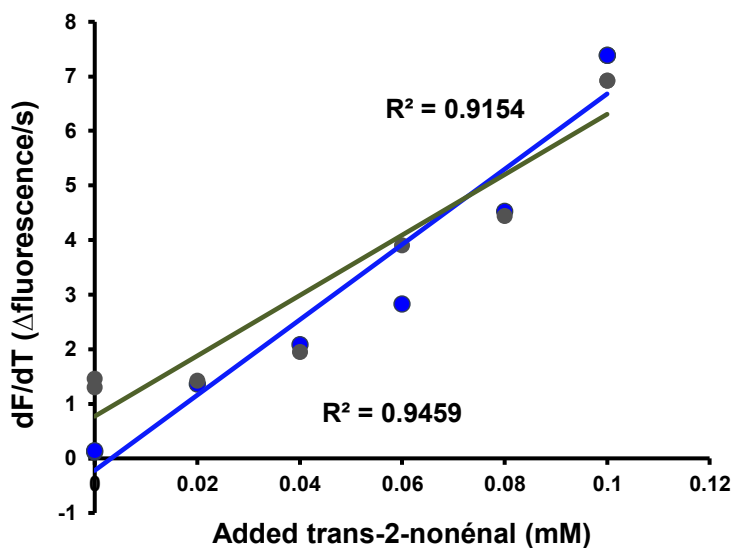


Figure S7. Example of data where inaccurate pipetting was the likely cause of poor linearity in the response. These types of results were unfortunately common for some students who worked in the development of this method. The combination of rapid pipetting needed to initiate kinetics as soon as possible and the volatility of the solvent used were a major source of error.

REFERENCES

Brouwer A.M. (2011). Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report), Pure Appl. Chem., Vol. 83, No. 12, pp. 2213–2228)

Amrut S.L., Satish J.S, & Ramchandra B.P. (2014). Functional Nanomaterial Synthesis and Charaterization Electrical, Magnetic and Optical. Kyung Hee University. Lambert Academic Publishing.ISBN:978-3-659-113161.

https://www.researchgate.net/publication/319256244_Functional_Nanomaterial_Synthesis_and_Charaterization_Electrical_Magnetic_and_Optical

Boushah A. (2020). 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. Département de Chimie et Biochimie, Université du Québec à Montréal.

Ayodeji O. F., & Ganiyu O. (2015). Thermal oxidation induces lipid peroxidation and changes in the physicochemical properties and β -carotene content of arachis oil. International journal of food science, Article ID 806524, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/806524>

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>

Bernhard Y. (2019). Synthèse et étude de nouvelles sondes fluorescentes pour l'imagerie optique, l'imagerie Cherenkov et les imageries multimodales. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02343185>

Borges F.R., Milhazes N., Santana L., & Uriarte E. (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis, and biological activity. Curr. Med. Chem., 12(30), 887–916 doi:[10.2174/0929867053507315](https://doi.org/10.2174/0929867053507315)

Bonini M.G., Rota C., Tomasi A., & Mason R. P. (2006). The oxidation of 2,7-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy. 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.

Brock N. (1989). Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. Cancer Research, 49, 1-7.

Buettner Gr. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300: 535-43.

Catala A. (2012). Lipid Peroxidation || Repeatedly Heated Vegetable Oils and Lipid Peroxidation. Chapter 10.

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.

Choe E., & D.B. (2007). Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*, vol. 72, no. 5, pp. R77-R86.

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 antioxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29. <https://doi.org/10.1051/ocl.2006.6666>

Dalle-Donne L., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., & Milzani A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 52, 601-623.

Duan N., Wang H., Li Y., Shaoxiang Y., Hongyu T., & Baoguo S. (2021). The research progress of organic fluorescent probe applied in food and drinking water detection. *Coordination Chemistry Reviews*, 427, 213557.

Esterbauer H., Schaur R.J., & Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, 11, 81-128.

Finkel T., & Holbrook N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 409, 239-247.

Francisco J.S., Chiara C., & Bruce A. (2011). Freeman. Formation and Signaling Actions of Electrophilic Lipids. *Chem Rev.* 111(10):5997-6021. doi: [10.1021/cr200131e](https://doi.org/10.1021/cr200131e)

Frankel E.N. (2005). Lipid oxidation. 2nd Edition., The Oily Press, P.J. Barnes, Bridgwater; xvi + 470 pp. UK ISBN: 0-9531949-8-1

Frenette M. (2009). Advances in free radical oxidation: Mechanistic studies, fluorescent probe design and radically different antioxidants. PhD Thesis, Ottawa, <https://ruor.uottawa.ca/bitstream/10393/29778/1/NR51812.PDF> (accessed Aug. 29, 2022).

Ganguly A., Ghosh S., Kar S., & Guchhait N. (2015). Selective fluorescence sensing of Cu (II) and Zn (II) using a simple Schiff base ligand: Naked eye detection and elucidation of photoinduced electron transfer (PET) mechanism. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*143, 72–80.

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 oils. *Foodservice research international*, 13(1), 41-55. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4506.2001.tb00028.x>

Gu J.P, X.Q. Li, Z. Zhou, R.S. Liao, J.W. Gao, Y.P. Tang & Q.M. Wang. (2019). Synergistic regulation of effective detection for hypochlorite based on a dual-mode probe by employing aggregation induced emission (AIE) and intramolecular charge transfer (ICT) effects *Chem. Eng. J.*, 368, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.175>

Halliwel B. (1995). Antioxidant characterization, methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol.*49: 1341-8.

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.

International Organization for Standardization. ISO 6885:2012, Animal and vegetable fats and oils – Determination of Anisidine Value. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization. ISO 3960:2017, Animal and Vegetable Fats and Oils – Determination of Peroxide Value-Iodometric (Visual) Endpoint Determination. Geneva, Switzerland

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.

Li S.J., Fu Y.J., Li C.Y., Li Y.F., Yi L.H., & OuYang J. (2017). A near-infrared fluorescent probe based on BODIPY derivative with high quantum yield for selective detection of exogenous and endogenous cysteine in biological samples. *Anal Chim Acta*; 994:73–81.

Lindon J.C., Tranter G.E., & Koppenaal D. (2016). *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*: Academic Press.

List B. (2002). "Proline-catalyzed asymmetric reactions" *Tetrahedron*,58, 5573-5590.

Manar A. (2012). L'oxydation modifie les effets métaboliques d'acides gras polyinsaturés de la série n-3 incorporés par différents vecteurs dans des régimes hyperlipidiques : contribution de l'absorption intestinale et de la réactivité cellulaire du 4-hydroxy-hexénaol . <http://theses.insa-lyon.fr/publication/2012ISAL0143/these.pdf>

McEwen J. (2010). Jablonski diagram, ChemWiki. <https://www.med.unc.edu/microscopy/wp-content/uploads/sites/742/2018/06/jablonskidiagram.pdf>

Minar I. (2017). Elaboration et caractérisation des nanomatériaux à base de métaux nobles. https://www.researchgate.net/publication/325245689_Elaboration_et_caracterisation_des_nanomatériaux_a_base_de_métaux_nobles

Ousama A. (1997). Spectroscopie tissulaire in vivo de l'autofluorescence et de la fluorescence induite : instrumentation, analyse et modélisation, applications au diagnostic des cancers précoces et à l'optimisation de la thérapie photodynamique. Boston University. https://www.researchgate.net/publication/324429959_Spectroscopie_tissulaire_in_vivo_de_l'autofluorescence_et_de_la_fluorescence_induite_instrumentation_analyse_et_modelisation_applications_au_diagnostic_des_cancers_precoces_et_a_l'optimisation_de_la_tj

Paik J.S., Shint J.I., Kim J.I., Choi & P.K. (1994). Effect of nitrogen flushing on shelf-life of packaged potato chips. *Packaging Technology and Science*,7, 81-85.

Raharjo S. & Sofos J.N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review, *Meat SCIENCES*, 35, 145-169.

Revankar H.M., Bukhari S.N.A., Kumar G.B., Qin H.L. (2017). Coumarins scaffolds as COX inhibitors. *Bioorg Chem.* 71:146–159. doi: 10.1016/j.bioorg.2017.02.001

Ross C.F., & Smith D.M. (2006). Use of volatiles as indicators of lipid oxidation in muscle foods, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5, 18-24.

Roubinet B., Renard P. Y., & Romieu A. (2014). *Dyes and Pigments*110, 270.

Roubinet B., Bailly L., Petit E., Renard P-Y., Romieu A. (2015). A FRET-based probe for fluorescence sensing of sulfide/sulfite analytes, using a novel long-wavelength water-soluble 7-hydroxycoumarin as reporter fluorophore *Tetrahedron Lett.* 2015; 56: 1015-1019.

Jeuge S., Carlier M., Vendevre J-L., & Nassy G. (2012). L'oxydation des produits carnés : methodes de mesure et moyens de maitrise. IFIP institut du porc.

Shahidi F., & Hossain A. (2022). Role of lipids in food flavor generation. *Molecules*, 27(15):5014.

Shahidi F., & Wanasundara U.N. (2002). Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. *Food lipids: Chemistry, nutrition, and biotechnology*, 17, 387-403.

Shahina N., Sheikh H., Siddiqi R., & Sayeed S.A. (2004). Oxidative stability of olive, corn, and soybean oil under different conditions. *Food chemistry*, 88(2):253-259.

Simonian N.A., & Coyle J.T. (1996). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*, 36, 83-106.

Metcalf R.L. (2002). Insect Control. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Min-Hyuk Y., Xinglong G., Xue-Ming X., Jin-Young K., Carlson B.A., Patterson A.D., Huaibin C., Gladyshev V.N., & Hatfield D.L. (2010). Delineating the Role of Glutathione Peroxidase 4 in Protecting Cells Against Lipid Hydroperoxide Damage and in Alzheimer's Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*,

Raharjo S., & Sofos J.N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review, *Meat sciences*,35, 145-169.

Sayre L.M., Zelasko D.A., Harris P.L.R., Perry G., Salomon R.G.; & Smith M.A. (1997). 4-Hydroxynonenal-Derived Advanced Lipid Peroxidation End Products Are Increased in Alzheimer's Disease. *J Neurochem*, 68, 2092.

Snyder R., Witz G., & Goldstein B.D. (1993). The toxicology of benzene *Environmental Health Perspectives*, 100, 293-306.

Spiteller G. (2007). The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. *Mol Biotechnol*37, 5-12.

Stojiljkovic M.P., Lopes H.F., Zhang D., Morrow J.D., Goodfriend T.L. & Egan B.M. (2002). Increasing plasma fatty acids elevates F2-isoprostanes in humans: implications for the cardiovascular risk factor cluster. *J Hypertens* 20, 1215-1221.

Sunny O., Abarikwu; Aditya B.P., & Ebenezer O. (2012). 4-Hydroxynonenal Induces Mitochondrial-Mediated Apoptosis and Oxidative Stress in SH-SY5Y Human Neuronal Cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 110, 441-448. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00834.x>

Szwajcer Dey E.; Staniszevska M.; & Mariola P. (2005). The cytotoxic and genotoxic effects of conjugated trans-2-nonenal (T2N), an off-flavor compound in beer and heat processed food arising from lipid oxidation. Polish journal of microbiology, 54 Suppl:47-52.

Thomas J.P., Maiorino M., Ursini F. & Girotti A.W. (1990). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. J. Biol. Chem. 265, 454-461.

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.

Warner K., & Eskin M. (1995). Methods to Access Quality and Stability of Oils and Fat-Containing Foods || Conjugated Diene, Anisidine Value, and Carbonyl Value Analyses. ch9, 10.1201.

Weller A. (1982). Mechanism and Spin-Dynamics of Photoinduced Electron-Transfer Reactions. Zeitschrift fur Physikalische Chemie-Wiesbaden 130, 129–138.

Wiener S.W., & Hoffman R.S. (2004). Nerve Agents: A Comprehensive Review. Journal of Intensive Care Medicine, 19, 22-37.

Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwatz S.J., Shoemaker C.H., Smith D.M., & Sporns P. (2005). Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes and Carbohydrates, Wiley, 784 pages.

Xiao Xie. (2019). Developpement des sondes fluorescentes pour la detection de l'ADN quadruplex. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02275982> Submitted on 2 Sep 2019

Yang Y.C., Baker J.A., & Ward J.R. (1992). Decontamination of chemical warfare agents. Chemical Reviews, 92, 1729-1743.

Yann. (2008). Tout savoir sur le spectre ultraviolet-visible. Superprofressources. <https://www.superprof.fr/ressources/scolaire/physique-chimie/terminale-s/la-spectroscopie/spectrometrie-ultraviolet-visible.html>

Zhang N., Yonglin L., Shasha W., Yiwen S., Jia C., Yan G., Altayuly S., & Xiuzhu Y. (2021). Analytical methods for determining the peroxide value of edible oils: A mini review. Food Chemistry, volume 358, 129834.