



**HAL**  
open science

# Développement d'une nouvelle méthode analytique pour le dosage des polyphénols dans les fluides biologiques et application à l'épidémiologie du cancer dans la cohorte EPIC

David Achaintre

► **To cite this version:**

David Achaintre. Développement d'une nouvelle méthode analytique pour le dosage des polyphénols dans les fluides biologiques et application à l'épidémiologie du cancer dans la cohorte EPIC. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1239 . tel-01978493

**HAL Id: tel-01978493**

**<https://theses.hal.science/tel-01978493>**

Submitted on 11 Jan 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT :2017LYSE1239

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
**Université Claude Bernard Lyon 1**  
**Biologie Moléculaire, Intégrative et cellulaire – BMIC (ED 340)**

**Spécialité de doctorat :**  
Biochimie Analytique

Soutenue publiquement le 17/11/2017, par :  
**David Achaintre**

---

**Développement d'une nouvelle méthode analytique  
pour le dosage des polyphénols dans les fluides  
biologiques et application à l'épidémiologie du  
cancer dans la cohorte EPIC**

---

Devant le jury composé de :

**FERVERS, Béatrice, MD, PhD (Présidente du jury)**

Professeur associé, Université Claude Bernard Lyon I  
Directrice, Département « Cancer et Environnement », Centre Léon Bérard, Lyon

**DANGLES, Olivier, PhD (Rapporteur)**

Professeur des universités  
Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse INRA UMR 408 - SQPOV

**MORAND, Christine, PhD (Rapporteur)**

Directrice de recherche INRA  
Centre de recherche Auvergne Rhône Alpes INRA UMR 1019 – Unité de Nutrition Humaine

**JUNOT Christophe, PhD (Examineur)**

Directeur de recherche CEA  
CEA-Saclay UMR 0496

**VULLIET Emmanuelle, PhD (Examinatrice)**

Chargée de recherche CNRS  
Université Claude Bernard Lyon I, ISA – UMR 5280

**SCALBERT, Augustin, PhD (Directeur de thèse)**

Directeur équipe : « Biomarker »  
Chercheur au centre international de recherche sur le cancer, Lyon

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

## Résumé en Français

Les polyphénols sont un groupe de métabolites secondaires communément trouvés dans l'alimentation et plus de 500 composés différents sont retrouvés dans plus de 450 denrées alimentaires. Au cours des 30 dernières années, de nombreuses études *in vitro* et chez l'animal ont suggéré un rôle bénéfique des polyphénols dans des maladies chroniques comme le cancer<sup>1-3</sup>. Les études épidémiologiques basées majoritairement sur des questionnaires alimentaires sont cependant plus contradictoires<sup>4-6</sup>. De nouvelles méthodes sont requises pour quantifier un plus grand nombre de composés dans une même série afin de réaliser des études épidémiologiques à grande échelle.

Le but de cette thèse est de développer des méthodes de quantification d'une large gamme de polyphénols représentatifs des principales classes et sous-classes de polyphénols dans le sang et urine, d'évaluer les excrétions urinaires de polyphénols et leurs associations avec la consommation d'aliments source dans une population Européenne, d'évaluer les concentrations dans le sang dans une étude cas-témoin sur cancer colorectal dans l'étude prospective européenne sur le cancer et la nutrition (EPIC).

Après une brève présentation des polyphénols et du cancer colorectal dans le **chapitre II**, une méthode originale basée sur la dilution isotopique différentielle et l'analyse en spectrométrie de masse est développée pour quantifier 38 polyphénols dans l'urine et présentée dans le **chapitre III**. Cette méthode est basée sur un marquage différentiel en <sup>12</sup>C et <sup>13</sup>C des polyphénols grâce à une dérivatisation par les isotopes du chlorure de dansyl. Différentes conditions pour l'hydrolyse des polyphénols conjugués, l'extraction et la dérivatisation des aglycones ont été évaluées et la méthode a été validée pour la mesure de 37 polyphénols.

Les niveaux d'excrétion urinaire de ces 37 polyphénols mesurés chez 475 individus de la cohorte EPIC issues de quatre pays européens sont présentés dans le **chapitre IV**. Une grande variabilité d'excrétion urinaire dans les quatre pays Européens a pu être montrée et des corrélations significatives avec la consommation de certains aliments source de ces composés ont été observées suggérant l'utilisation possible de plusieurs de ces polyphénols en tant que biomarqueurs de l'alimentation.

Une méthode d'analyse pour les mêmes 37 polyphénols également basée sur la dilution isotopique différentielle est développée, validée et appliquée à 1618 échantillons dans la cohorte EPIC (**chapitre V**). Les changements majeurs en comparaison de la méthode sur la matrice urinaire sont essentiellement les difficultés d'hydrolyse des polyphénols conjugués et des effets de matrice importants mais réduits par la méthode de dilution isotopique.

Enfin l'étude des associations entre l'exposition aux polyphénols mesurée à l'aide des marqueurs plasmatique avec le risque de cancer colorectal a été conduite dans une étude cas-témoin nichée dans la cohorte EPIC et est présentée dans le **chapitre VI**. Une association inverse entre les concentrations plasmatiques d'equol, et une association positive entre l'acide homovanillique et le risque de cancer du côlon ont été trouvées.

Les résultats obtenus constituent une nouvelle base pour des applications futures dans le domaine de l'épidémiologie des polyphénols.

Mots clefs : Polyphénols, flavonoïdes, biomarqueurs, exposition, dilution isotopique différentielle, spectrométrie de masse, cancer colorectal

## Remerciements

Ce travail de thèse a été le fruit de 5 années d'une aventure marquée par des expériences passionnantes et enrichissantes, mais parfois semée de troubles et de difficultés.

Mon parcours depuis mon arrivée au centre il y a 20 ans en tant que technicien de laboratoire est peu ordinaire. Cinq années après mon arrivée, je décidais de reprendre le chemin de l'université à Lyon, en parallèle de mon travail, afin d'obtenir en 2005 mon diplôme de master recherche en biochimie. Sept ans plus tard, je m'engageais dans un travail de thèse qui se termine le 17 novembre 2017.

Vingt années se sont écoulées depuis mon entrée au CIRC en 1997. J'ai connu comme bien de personnes des moments de doute mais surtout de bonheur ; Celui de réaliser un travail passionnant et qui n'a cessé d'évoluer pour mon plus grand bonheur.

Au cours de ces nombreuses années, j'ai pu rencontrer des personnes formidables. Certaines sont parties, mais d'autres toujours présentes, à ma plus grande satisfaction. La liste de personnes que je voudrais remercier est sans aucun doute très longue, et il m'est impossible de remercier tout le monde. Les personnes omises ne m'en tiendront certainement pas rigueur.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse Augustin Scalbert sans qui ce travail n'aurait pu avoir lieu. Même si des périodes difficiles ont ponctuées ces 5 années, j'aurais appris une rigueur d'écriture et un esprit de synthèse.

Je voudrais remercier mes 2 rapporteurs Christine Morand et Olivier Dangles. Je remercie également les membres du jury, Christophe Junot, Emmanuelle Vulliet et Béatrice Fervers. Un grand merci à vous tous de m'avoir honoré de votre présence.

Je souhaite remercier mes collègues qui ont participé de près ou de loin à ce travail. Tout d'abord les personnes de mon groupe et qui m'ont soutenu et supporté ces dernières années. Avec par ordre alphabétique : Anne-Sophie, Audrey (B et G), Béatrice, Joe, Karine, Laure, Nivo, Pekka, Sabina, Vanessa, Viktoria mais aussi de ma section Aurélie, Bertrand, Carine, Corinne, Nada, Neil, Pietro, Véronique. Je souhaite également remercier mes co-auteurs, Audrey, Cécile et Raul.

Je voudrais remercier également mes collègues présents ou passés et qui ont été à mes côtés de près ou de loin, et dont certains sont devenus des ami(e)s. La liste est loin d'être exhaustive et je citerais de nouveau par ordre alphabétique : Christophe, Cyrille, Didier, Edwige, Eric, Fiona, Franck, Gilles, Hafed, Jerome, José, Latifa, Mariluz, Marion, Maud, Michel, Nicolas, Priscilia, Sébastien, Salvo, Sophie, Stéphanie, Thomas (C. et O.), William.

Enfin, je souhaite remercier Elodie qui est devenue mon amie la plus précieuse et qui a toujours été présente dans les moments heureux ou de doute et qui m'a soutenu tout au long de ces années.

Je souhaite avoir une pensée pour les deux personnes les plus importantes de ma vie et qui me donnent chaque jour du bonheur et de la force, mes enfants Lilian et Julie.

# TABLES DES MATIÈRES

<b>Chapitre I : Introduction</b> .....	10
<b>Chapitre II : Les polyphénols, apport alimentaire, biodisponibilité, mode d'action et rôle dans le cancer colorectal</b> .....	16
<b>II-1 Polyphénols : Classification et structures</b> .....	17
II-1-1 Les flavonoïdes .....	18
II-1-2 Les non-flavonoïdes.....	20
<b>II-2 Les sources alimentaires des polyphénols et apport quotidien</b> .....	21
II-2-1 Distribution dans les aliments .....	21
II-2-1-1 Les flavonoïdes.....	21
II-2-1-2 Les non-flavonoïdes .....	24
II-2-2 Apport quotidien .....	26
<b>II-3 Absorption, distribution, métabolisme et excrétion (ADME)</b> .....	28
<b>II-4 Activités biologiques</b> .....	31
II-4-1 Mécanismes non spécifiques antioxydants:	
Piégeurs de radicaux libres et agents chélateurs de métaux .....	32
II-4-2 Mécanismes non spécifiques par interaction avec les membranes.....	32
II-4-3 Mécanismes spécifiques .....	33
<b>II-5 Les polyphénols et le cancer colorectal</b> .....	33
II-5-1 Généralités sur le cancer.....	33
II-5-1-1 Introduction .....	33
II-5-1-2 Carcinogénèse environnementale .....	34
•Classes de carcinogènes et mécanismes de la carcinogénèse chimique.....	34
•Mécanismes de défenses endogènes contre les carcinogènes chimique ----	36
•Le rôle du microenvironnement dans la carcinogénèse, acteur de la promotion.....	37
II-5-2 Le cancer colorectal .....	39
II-5-2-1 Incidence et mortalité du cancer colorectal .....	39
II-5-2-2 Changements histopathologiques associés au cancer colorectal .....	41
II-5-2-3 Mécanismes du cancer colorectal .....	41
II-5-2-4 Principaux facteurs associés au cancer colorectal.....	43
•Facteurs de risques .....	44
- Tabac .....	44
- Alcool .....	44
- Obésité /surpoids.....	45
- Viandes rouges et viandes transformées .....	45
•Facteurs protecteurs .....	46
- Activité physique .....	46
- Produits laitiers .....	47
- Les céréales.....	47
- Légumes / fruits.....	48
II-5-3 Les polyphénols et la prevention du cancer colorectal.....	49
II-5-3-1 Epidémiologie du cancer colorectal .....	49

•Mesure de l'apport en polyphenols par des questionnaires alimentaires -----	49
•Mesure de l'exposition aux polyphenols par les biomarqueurs -----	50
II-5-3-2 Etude d'intervention -----	50
II-5-3-3 Mécanismes d'action -----	51
<b>II-6 Les méthodes et outils analytiques pour mesurer l'exposition aux polyphénols à l'aide de biomarqueurs -----</b>	<b>53</b>
II-6-1 Prétraitement de l'échantillon -----	53
II-6-2 Plateformes analytiques -----	55
II-6-3 Instrumentation utilisée dans cette thèse -----	56
<b>Chapitre III : Développement d'une méthode de mesure de 38 polyphenols dans l'urine-</b>	<b>58</b>
Contexte -----	59
Objectif -----	59
Approche -----	59
Principaux résultats -----	60
Conclusion -----	61
Article -----	61
<b>Chapitre IV : Application de la méthode de dosage des polyphenols dans l'urine dans une étude transversale au sein de la cohorte EPIC -----</b>	<b>73</b>
Contexte -----	74
Objectifs -----	74
Approche -----	74
Principaux résultats -----	75
Conclusion -----	75
Article -----	76
<b>Chapitre V : Développement d'une méthode de mesure de 38 polyphenols dans le plasma -----</b>	<b>98</b>
Contexte -----	99
Objectif -----	99
Approche -----	99
Principaux résultats -----	99
Conclusion -----	100
Article -----	100
<b>Chapitre VI : Application de la méthode de dosage des polyphenols dans le plasma à une étude cas-témoins sur le cancer colorectal nichée dans la cohorte EPIC136-----</b>	<b>116</b>
Contexte -----	117
Objectif -----	117
Approche -----	117
Principaux résultats -----	118
Conclusion -----	118
Article -----	118
<b>Chapitre VII Discussion générale -----</b>	<b>131</b>
<b>Références Bibliographiques -----</b>	<b>148</b>

## LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

- Figure 1** : Voies de biosynthèses des principales classes et sous-classes des polyphénols.
- Figure 2** : Structures de bases des six principales sous classes de flavonoïdes.
- Figure 3** : Structure de la quercétine-3-O-glucoside, apigénine-7-O-apioglucoside et la (+)-catéchine.
- Figure 4** : Acide gallique et un ellagitanin : la sanguine H10.
- Figure 5** : Acides *p*-coumarique, caféique et férulique.
- Figure 6** : Structure de la quercétine 3-*O*-rutinoside ou rutine.
- Figure 7** : Structure de l' hespéridine et de la narirutine.
- Figure 8** : Structure de la daidzine et de la génistine.
- Figure 9** : Structure de la procyanidine dimère B2.
- Figure 10** : Structure de la pélargonidine-3-*O*-glucoside.
- Figure 11** : Structure d'un acide chlorogénique = acide *trans*-5-*O*-caféoylquinique.
- Figure 12** : Structure du resveratrol et de l'hydroxytyrosol.
- Figure 13** : Mécanismes pour l'absorption et le métabolisme des composés polyphénoliques dans le petit intestin et le côlon.
- Figure 14** : Caractéristiques structurales définissant l'action antioxydante des flavonols. Les aires surlignées définissent les 3 zones attribuant l'intensité antioxydante maximale <sup>7</sup>.
- Figure 15** : Incidence dans le monde des principaux types de cancer chez l'homme.
- Figure 16** : Incidence dans le monde des principaux types de cancer chez la femme.
- Figure 17** : Taux d'incidence standardisé selon l'âge et taux de mortalité chez l'Homme en Europe (A) et en Afrique (B).
- Figure 18** : Modèle fonctionnel de la voie métabolique APC / $\beta$ -caténine.
- Figure 19** : Schéma de la quantification relative des polyphénols-Dns-<sup>13</sup>C contre un pool référence.
- Tableau 1** : Résumé des études et des résultats décrits dans cette thèse.
- Tableau 2** : Avantages et inconvénients de la dilution isotopique différentielle.
- Figure 20** : Spectre de masse de l'acide *m*-coumarique-Dns (A) et de la quercétine-Dns.
- Figure 21** : Profil isotopique de la quercétine penta-Dns tri+ et représentation schématique de la résolution unitaire d'un appareil basse résolution.

## ABREVIATIONS

4CL	Coumaroyl-CoA Ligase
ABC	ATP Binding Cassette
ACF	Aberrant Crypt Foci
ADH	Alcool Déshydrogénase
AHCs	Amines Hétérocycliques
AKT	Protein Kinase B
ALDH2	Acétaldéhyde Déshydrogénase
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
AP-1	Activator Protein-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli



APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
C4H	Cinnamate-4-Hydroxylase
Cat	Catalase
CBG	Cytosolic Beta Glucosidase
CCR	Cancer Colorectal
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
CHI	Chalcone Isomerase
CHS	Chalcone Synthase
CIN	Chromosomal Instability Pathway
CK1	Caséine Kinase 1
COMT	Catéchol-O-Méthyltransférases
COX-2	Cyclooxygenase-2
CYPs	Cytochrome P450
DP	Degré de Polymérisation
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and nutrition
ERK	Extra-cellular signal Regulated Kinases
EROs	Espèces Réactives de l'Oxygène
ESI	Electrospray Ionisation
EWAS	Exposome-Wide Association Study
FDA	Food and Drug Administration
FRZ	Recepteurs Frizzled
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
GPx	Glutathione Peroxydase
GSK3	Glycogène Synthase Kinase 3
GWAS	Genome-Wide Association Study
HAPs	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$
HNPCC	Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTs	Tannins Hydrolysables
ICH	The International Council for Harmonisation
IGF-1	Insulin Growth Factor 1
IL-6	Interleukin- 6
IMC	Indice de Masse Corporelle
ISO	International Organization of Standardization
LLE	Liquid Liquid Extraction
LOH	Loss of Heterozygosity
LPH	Lactase Phloridzin Hydrolase
L-Phe	L-Phénylalanine
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MDR2	Multidrug Résistance Protein2
MLH1	MutL Homolog 1
MMPs	Matrix MetalloProteinases
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
MSH2	MutS protein Homolog 2
MSI	Microsatellite Instability

NADPH	Nicotinamide Adenine Di-nucleotide Phosphate
NF-kB	Nuclear Factor Kappa B
NOCs	Nitrosamines
NOX	NADPH Oxydase
Nrf2	Nuclear Factor-E2 related factor-2
PAL	Phénylammonia Lyase
P-gp	P-glycoprotein
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
SFRP	Secreted Frizzled-Related Proteins
SGLT1	Sodium-Glucose Co-Transporters
SLE	Simplified Liquid Extraction
SOD	Superoxyde Dismutase
SPE	Solid Phase Extraction
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SULT	Sulfotransférases
TAM	Tumour Associated Macrophages
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
UGTs	Uridine-5'-diphosphate Glucuronosyltransférase
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UPLC-MS	Ultra Performance Liquid Chromatography/Mass spectrometry
USDA	United States Department of Agriculture
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XO	Xanthine Oxydase

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

Les toxiques de l'environnement sont suspectés de moduler le risque de développer des maladies chroniques comme l'obésité, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et le cancer. Les populations des pays industrialisés et en voie de développement sont en effet de plus en plus exposées à une grande variété de produits chimiques, qui constitue une partie de ce qui a été nommé l'exposome. Des dizaines de milliers de composés chimiques ont été décrits dans l'environnement <sup>8</sup> et plus de 20 000 composés naturellement présents dans les aliments ont été caractérisés.

La notion d'exposome a été décrite pour la première fois par le Dr Christopher Wild en 2005 <sup>9</sup>. L'exposome est un concept qui se définit comme le complément du génome. Il représente l'ensemble des expositions que peut recevoir un individu durant sa vie. Les relations entre l'exposition à ces composés et la survenue de maladies est complexe et n'est que partiellement explorée. A cette complexité, il est à noter que les nutriments issus du régime alimentaire, et qui constituent une partie de l'exposome, peuvent interagir avec ces toxiques de l'environnement, et moduler potentiellement leurs effets.

A l'heure actuelle, et à l'inverse des études en génomique dans lesquelles sont mesurées la totalité des gènes d'un individu, il n'est pas possible aujourd'hui de mesurer l'ensemble de ces expositions en considérant conjointement toxiques et nutriments. Ceci est dû au manque d'outils et d'approches analytiques à large spectre applicables à des études épidémiologiques à grande échelle.

La métabolomique permet de mesurer l'exposition à une large gamme de métabolites dans les échantillons biologiques, et pourrait être utilisée dans des études d'association à grande échelle (Exposome-Wide Association Study, EWAS) similaires aux études génomiques (GWAS) <sup>10-11</sup>.

Deux approches métabolomiques complémentaires, ciblées et non-ciblées, sont communément utilisées pour la caractérisation du métabolome. L'approche ciblée repose sur l'analyse quantitative de métabolites présélectionnés dans un échantillon biologique. Cette approche est généralement guidée par des hypothèses biologiques. L'approche non-ciblée implique le profilage d'échantillons biologiques sans connaissances *a priori* sur la nature et l'identité des métabolites mesurés.

Au début de l'épidémiologie moléculaire dans les années 80, seulement un ou quelques biomarqueurs étaient mesurés. L'émergence de nouvelles techniques analytiques permet aujourd'hui de quantifier un nombre bien plus important de métabolites sur de plus petits volumes biologiques. La quantification d'un plus grand nombre de métabolites permet d'augmenter la possibilité de trouver des associations avec de nouveaux biomarqueurs dans une approche plus exploratoire, ainsi que d'évaluer des effets synergiques entre facteurs d'exposition.

La constitution de grandes bio-banques permet d'étudier dans des grandes cohortes les associations entre ces métabolites et le risque de diverses pathologies et de disposer de suffisamment de puissance statistique pour mettre en évidence des effets souvent de faible magnitude en épidémiologie nutritionnelle.

Les analyses non-ciblées ne peuvent aujourd'hui être appliquées à un grand nombre d'échantillons. Les mesures, la mise en place de contrôles qualité, l'analyse des données et l'identification / semi-quantification des métabolites ne sont pas bien standardisées. La variabilité inhérente de cette technique rend plus difficile l'appariement et l'harmonisation de données effectuées sur différentes plateformes analytiques et même dans plusieurs séries d'échantillons au sein d'un même laboratoire <sup>12</sup>. Seules les analyses ciblées permettent aujourd'hui de satisfaire ces conditions.

La spectrométrie de masse est la méthode la plus sensible pour analyser une gamme large et variée de molécules et permet, en analyse ciblée, la quantification simultanée de un à plus de 100 composés dans une même analyse selon la matrice étudiée <sup>13-15</sup>. L'analyse quantitative ciblée requiert un développement complet et une validation de la méthode qui est une procédure qui démontre que la méthode satisfait les recommandations de la FDA <sup>16-18</sup> ou d'autres organismes comme ISO (International Organization of Standardization) ou ICH (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) en termes de justesse, précision, sélectivité, sensibilité et stabilité. D'autres critères sont également requis comme le rendement d'extraction, les effets de matrices, la linéarité des courbes de calibration ou encore les limites de quantification <sup>16, 19</sup>. Cette validation nécessite donc l'utilisation de standards appropriés, des procédures d'optimisation instrumentale et de prétraitement de l'échantillon.

Cependant des problèmes spécifiques se posent pour doser simultanément dans les matrices biologiques un large nombre de composés. La diversité de leurs structures et de leurs propriétés physico-chimiques, la très grande disparité des concentrations entre les composés à quantifier et pour un même composé au sein d'une population, les interactions avec la matrice (extraction et ionisation) sont des points primordiaux qui requièrent une attention particulière lors du développement méthodologique. En particulier, les effets de suppression de signal communément rencontrés en spectrométrie de masse lors de la quantification de métabolites dans des matrices biologiques complexes comme l'urine et surtout le plasma ou le sérum nécessitent d'être particulièrement étudiés. Ceci est d'autant plus critique que les concentrations de ces métabolites endogènes et exogènes se trouvent dans une large gamme allant du pM au mM, et de ce fait ces effets de matrice affectent de façon drastique les concentrations mesurées, notamment pour les métabolites présents à l'état de traces <sup>20-21</sup>. La qualité des données s'en retrouve fortement impactée. Ce problème ne peut être à l'heure actuelle que partiellement résolu par l'utilisation de standards internes, notamment isotopiques, permettant de pondérer ces effets de matrices. Cependant, le nombre limité de standards isotopiques disponibles commercialement, les difficultés de synthèse quand ces composés ne sont pas disponibles, et leurs coûts limitent leur usage.

Pour contrecarrer cette difficulté, des marquages de métabolites peuvent être réalisés en utilisant un agent de dérivatisation marqué isotopiquement qui peut être greffé sur tous les métabolites partageant un même groupe réactif.

La dérivatisation en spectrométrie de masse a été surtout utilisée pour rendre volatile et thermostable les composés lors de leur dosage en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (ou à un autre détecteur) <sup>22</sup>. Pour la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC- ou UPLC-MS) la dérivatisation est plus récente. Elle répond alors à plusieurs besoins, notamment pour augmenter la stabilité des composés

d'intérêt et améliorer la séparation chromatographique et la spécificité de détection en augmentant la masse globale du composé, et à améliorer l'efficacité d'ionisation, donc la sensibilité, et la détection des analytes en MS/MS <sup>23-26</sup>.

Des agents de dérivatisation marqués isotopiquement ont également été synthétisés pour le développement de méthodes de dilution isotopique <sup>27-28</sup>. Un réactif marqué est utilisé pour chaque échantillon et le même réactif, non marqué, est utilisé sur un pool constitué de l'ensemble des échantillons analysés, et utilisé comme échantillon de référence. Les échantillons et le pool-référence sont mélangés et le rapport isotopique mesuré par spectrométrie de masse sur chacun des composés d'intérêt. Les rapports des intensités des isotopomères sont la base d'une quantification relative. Une quantification absolue est possible en effectuant en parallèle une procédure similaire, avec l'utilisation de standards à la place d'échantillons biologiques. La technique employée, appelée marquage isotopique différentiel a été utilisée essentiellement en protéomique <sup>29-30</sup> et a été plus récemment proposée en métabolomique <sup>28, 31-32</sup>.

Plusieurs fractions du métabolome sont susceptibles d'être étudiées selon les groupes chimiques des métabolites. Sur la base d'agents de dérivatisation possédant des caractéristiques appropriées pour la détection en MS/MS <sup>23, 33</sup>, un marquage isotopique a pu être réalisé en utilisant divers agents de dérivatisation adaptés à l'analyse de différentes familles de métabolites: fonctions amine ou phénolique avec le chlorure de dansyl <sup>27, 34</sup>, hydroxyle avec le chlorure de dansyl <sup>35</sup>, carboxyle avec le bromure de *p*-diméthylaminophénacyl (DmPA) <sup>31</sup>, carbonyle avec le dansylhydrazine <sup>36</sup> ou encore hydroxyles stéroïdien avec l'acide 4-diméthylaminobenzoïque <sup>37</sup>.

Pour ce projet, le marquage isotopique différentiel est appliqué à l'analyse quantitative des polyphénols, une des familles de composés alimentaires montrant la plus grande diversité de structure. Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans les tissus des plantes. Au-delà d'une simple activité antioxydante, ils jouent un rôle majeur dans les processus adaptatifs de type allélopathie. Plus de 500 polyphénols ont été identifiés dans plus de 450 denrées alimentaires. Il a été montré que l'apport quotidien de ces polyphénols pouvait atteindre 1g et même plus selon ses habitudes alimentaires.

De nombreuses études *in vitro* ou chez l'animal ont étayé le rôle protecteur des polyphénols contre de nombreuses maladies chroniques comme les maladies cardio-vasculaires <sup>38</sup>, le diabète <sup>39</sup>, ou le cancer <sup>40-41</sup>. Cependant, les études épidémiologiques sur le cancer sont plus limitées et les résultats souvent contradictoires <sup>42-43</sup>.

Ces contradictions sont largement expliquées par les difficultés rencontrées pour l'estimation précise et fiable de l'exposition aux polyphénols <sup>44</sup>. En effet, les études épidémiologiques ont essentiellement été réalisées grâce à des questionnaires alimentaires. L'approche par questionnaire a été grandement facilitée par l'utilisation de bases de données telles que celle de l'USDA et Phenol-Explorer <sup>45-46</sup> mais de nombreux biais existent. Les questionnaires sont soumis à des erreurs d'auto-évaluation des participants quant à leur consommation de denrées alimentaires et les bases de données ont leurs propres limitations comme le contenu en polyphénols de certains aliments qui peut fortement varier selon l'espèce de plantes.

L'absence de données sur certains aliments augmente également l'imprécision des calculs de consommation.

Les polyphénols sont faiblement absorbés au niveau duodénal et métabolisés au niveau des tissus et en particulier du foie, et une large fraction des composés transitent jusqu'au côlon où ils sont fortement métabolisés par le microbiote <sup>47</sup>. L'estimation de l'exposition aux polyphénols par les questionnaires alimentaires ne peut prendre en compte le devenir de ces composés une fois ingérés et il est assez difficile voire impossible de modéliser par exemple l'exposition aux acides phénoliques issus de la dégradation microbienne colique. L'utilisation de biomarqueurs est une approche prometteuse et permet une estimation objective de l'exposition aux polyphénols et de ses métabolites.

Cependant, les études épidémiologiques réalisés grâce à des biomarqueurs sont bien moins nombreuses, et sont principalement limitées à quelques polyphénols spécifiques comme les isoflavones <sup>48</sup> et lignanes <sup>49</sup>.

Ce projet s'inscrit donc dans un cadre plus global et propose un développement méthodologique original pour la quantification dans les échantillons biologiques d'une grande diversité de polyphénols, représentatifs des principales classes et sous-classes présentes dans les principales denrées alimentaires, et de leurs métabolites formés par le microbiote intestinal ou dans les tissus. Ces mesures devraient permettre d'apporter des réponses à l'action potentiellement bénéfique de différentes classes et sous-classes de polyphénols grâce à des études épidémiologiques.

Cette thèse comprend sept chapitres. Dans le **chapitre II**, une présentation générale des polyphénols est proposée. La structure des principaux polyphénols trouvés dans les denrées alimentaires est détaillée. Les sources alimentaires, et les apports quotidiens sont discutés, ainsi que leur métabolisme particulier. Enfin les principales activités biologiques sont présentées. L'épidémiologie et les mécanismes du cancer colorectal ainsi que les principaux facteurs de risque sont détaillés. Il est établi que 35% (10% à 70%) des cancers du système gastro-intestinal seraient attribués aux habitudes alimentaires <sup>50</sup> et il a même été récemment montré que 43% des cancers colorectaux pourraient être évités en modifiant ses habitudes alimentaires <sup>51</sup>. Dans ce contexte, l'étude de facteurs alimentaires apparaît judicieuse et notamment l'étude du rôle des polyphénols dans la prévention du cancer colorectal.

Enfin, les principales méthodes utilisées dans des études d'intervention ou épidémiologiques pour la mesure de l'exposition aux polyphénols sont décrites.

Les quatre chapitres qui suivent sont consacrés à la description des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de cette thèse. Dans le **chapitre III**, le développement méthodologique du marquage isotopique différentiel appliqué aux polyphénols grâce au chlorure de dansyl, et son application au dosage des polyphénols dans les urines est présenté. Les avantages et les inconvénients de ce marquage différentiel sont décrits.

Le **chapitre IV** décrit l'application de la méthode précédemment développée à la quantification des polyphénols dans les urines de 475 sujets de la cohorte EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition) et les associations des niveaux

d'excrétion urinaire de chacun des polyphénols mesurés avec les consommations des principaux groupes d'aliments. Une grande variabilité d'exposition est observée chez ces sujets en fonction des apports alimentaires. L'analyse des corrélations entre niveau d'excrétion urinaire et consommation des principales sources alimentaires de polyphénols souligne la cohérence des résultats obtenus par les deux approches.

Dans le **chapitre V**, nous décrivons le développement de la méthode de quantification par marquage isotopique différentiel des polyphénols dans le plasma. La méthode présentée au **chapitre III** a été modifiée et optimisée avec un gain très important en sensibilité. On montre également que le marquage isotopique différentiel permet de réduire de manière très significative les effets matrice importants dans le plasma riche en protéines et phospholipides.

Dans le **chapitre VI**, la méthode développée est appliquée à l'analyse de 1636 échantillons plasmatiques dans une étude prospective sur le rôle des polyphénols sur le risque de cancer colorectal au sein de l'étude EPIC. Cette étude révèle des associations nouvelles entre deux composés phénoliques – acide homovanillique et equol – et le risque de cancer colorectal. Enfin, dans le **chapitre VII**, une discussion générale sur les résultats de cette thèse est développée, et des recommandations pour des futures recherches sont données.



# **CHAPITRE II**

**LES POLYPHÉNOLS, APPORT  
ALIMENTAIRE, BIODISPONIBILITÉ,  
MODE D'ACTION ET RÔLE DANS LE  
CANCER COLORECTAL**

## II-1 Présentation des polyphénols : Classification et structures

Les polyphénols représentent une classe de métabolites secondaires largement répandue dans le règne végétal. Ils s'accumulent principalement dans l'épiderme des feuilles et la peau des fruits, et sont impliqués dans une grande diversité de fonctions comme la protection contre les rayonnements UV, contre les virus, bactéries ou moisissures ou la tolérance aux stress abiotiques. Ils jouent également un rôle dans la pollinisation en tant qu'agents attractifs ou encore dans l'allélopathie<sup>52-54</sup>.

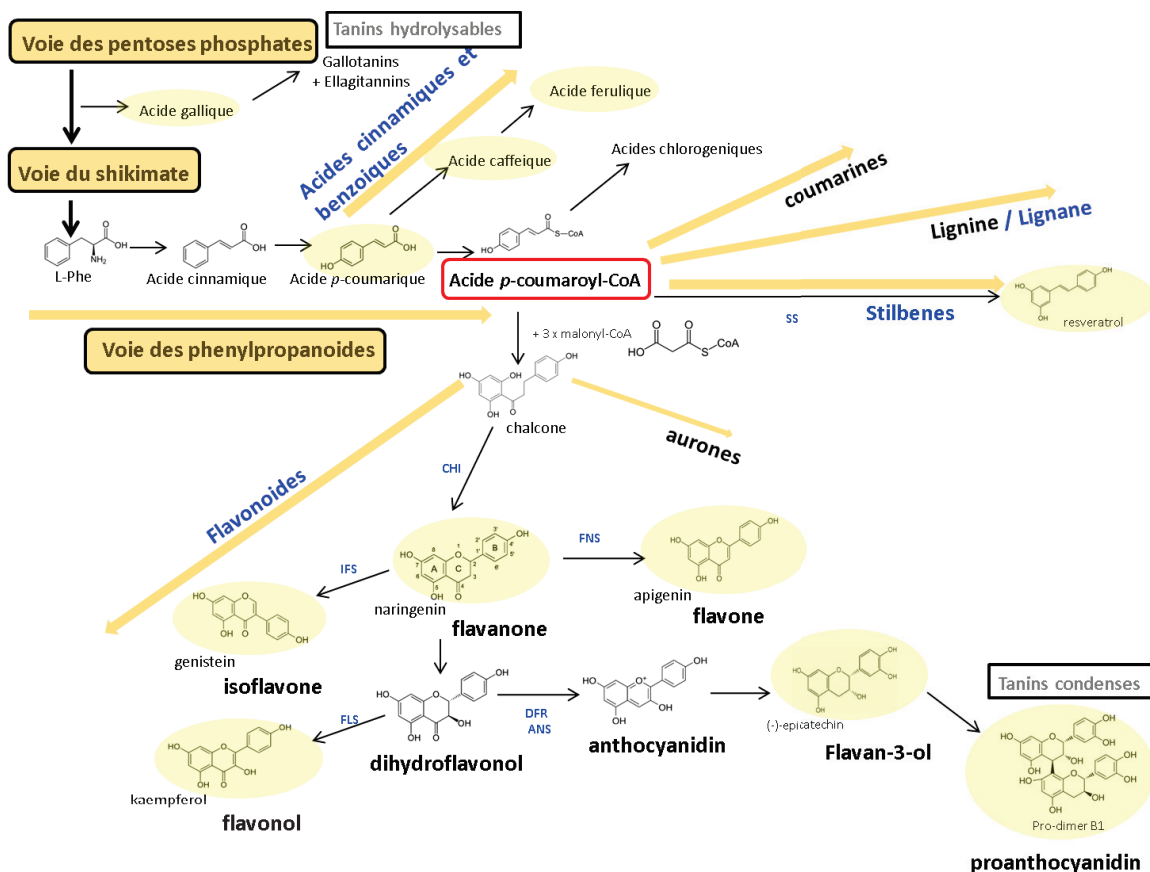
En 2013, plus de 8000 structures chimiques différentes étaient identifiées<sup>55</sup>. Parmi ceux-ci, plus de 500 ont été retrouvés dans plus de 450 plantes comestibles<sup>45</sup>. Classiquement, les polyphénols sont répartis en 4 principales classes et 31 sous-classes<sup>45</sup>.

Les acides phénoliques et les flavonoïdes constituent les 2 principales classes de polyphénols de par le nombre de composés et l'importance des apports alimentaires. Les lignanes et stilbènes, quoique moins largement consommés sont les deux autres principales classes de polyphénols largement étudiées pour leurs activités biologiques<sup>56</sup>.

La biosynthèse de ces composés phénoliques engage les voies du shikimate, des phenylpropanoïdes et des flavonoïdes<sup>57-59</sup>. La voie du shikimate est une voie métabolique en sept étapes menant à la synthèse de certains acides aminés aromatiques comme la L-phénylalanine (ou la tyrosine). Pratiquement tous les polyphénols dérivent de cet acide aminé. Des étapes communes initiales convertissent la L-phénylalanine (L-Phe) en acide cinnamique puis en acide *p*-coumarique grâce à la phénylammonia lyase (PAL) et la cinnamate-4-hydroxylase (C4H), respectivement.

L'acide *p*-coumarique formé est le précurseur d'une grande variété d'acides phénoliques comme, les acides férulique ou chlorogénique. L'acide *p*-coumarique peut également être converti en *p*-coumaroyl-CoA grâce à la coumaroyl-CoA ligase (4CL), et être la composante de base de toutes la lignée des flavonoïdes (Figure 1).

Trois molécules de malonyl-CoA pour une molécule de *p*-coumaroyl-CoA sont nécessaires pour générer la naringénine chalcone grâce à la chalcone synthase (CHS). La fermeture du cycle B, grâce à la chalcone isomérase (CHI) donne naissance au précurseur de tous les flavonoïdes, la naringénine<sup>56</sup>.

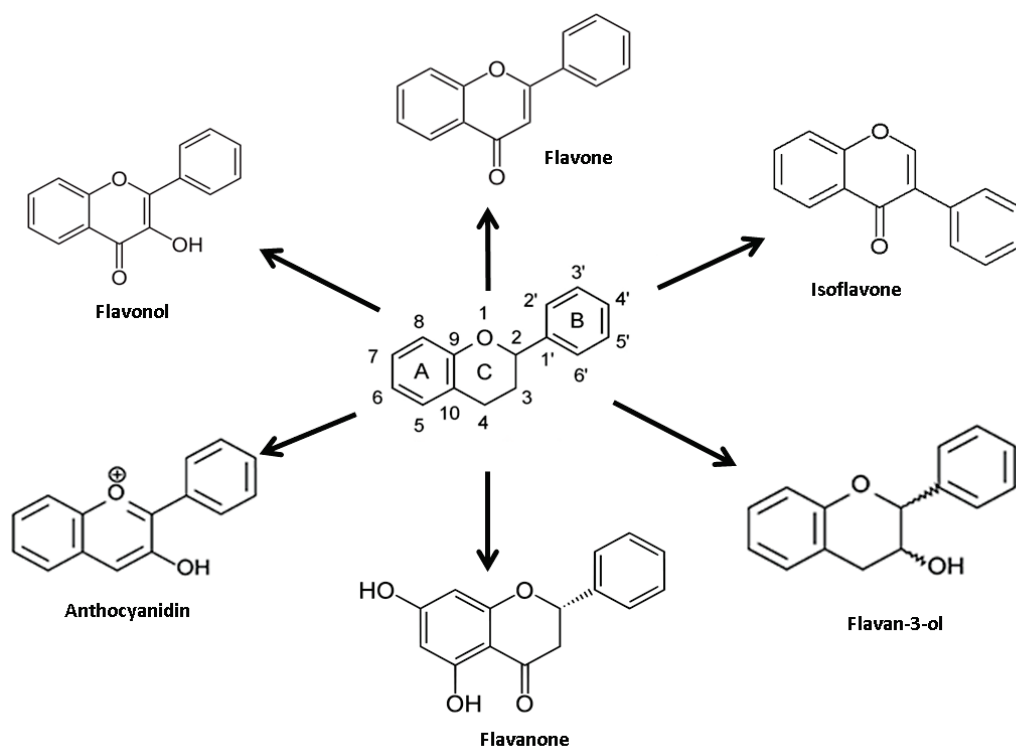


**Figure 1** : Voies de biosynthèses des principales classes et sous-classes des polyphénols.

## II-1-1 Les flavonoïdes

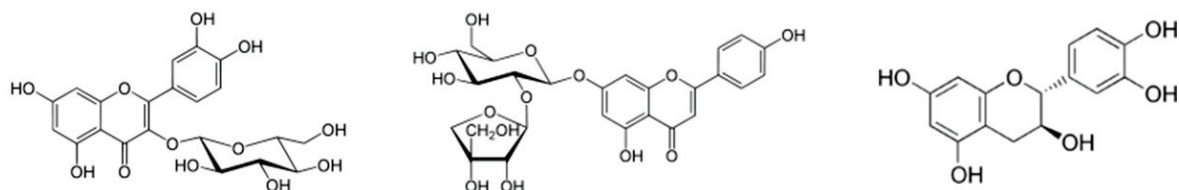
Au sein des polyphénols, les flavonoïdes constituent le groupe le plus riche par sa diversité structurale, et sa large représentation dans le règne végétal. Les flavonoïdes regroupent une large gamme de composés naturels polyphénoliques présentant un squelette carboné commun en C6-C3-C6 (squelette diphenylpropane) et présentant de nombreux substituants. Les deux cycles aromatiques définissent les noyaux A et B. L'hétérocycle central, quand il est présent, est nommé C. Les six principales sous-classes sont les flavonols, flavan-3-ols (catéchines), flavanones, flavones, isoflavones et anthocyanidines (Figure 2). Les flavanones, de par l'absence d'une double liaison  $\Delta^{2,3}$ , présentent un centre chiral, et le cycle B se situe principalement en configuration  $\alpha$ <sup>60</sup>. Les flavan-3-ols, présentant également cette caractéristique, possèdent un 2<sup>nd</sup> centre chiral de par l'hydroxylation en C3.

D'autres sous classes, mineures quant à leur distribution dans l'alimentation, comprennent les chalcones, dihydrochalcones, dihydroflavonols, flavan-3,4-diols, auronnes. L'ouverture du cycle C caractérisent les 2 premières nommées.



**Figure 2** : Structures de bases des six principales sous classes de flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont stockés dans les tissus des plantes et sont conjugués principalement à des sucres, ou des acides organiques <sup>61</sup>. Des six sous-classes majeures, les flavanones, flavones et isoflavones sont assez généralement conjuguées en position 7 du cycle A, les flavonols et anthocyanidines assez généralement conjuguées en position 3 du cycle C, même si des conjugaisons se rencontrent également en 5, 7 ou 3', 4' et 5'. Enfin, les flavan-3-ols sont les seuls à se trouver dans les tissus végétaux sous forme non-conjuguée. (Figure 2 et 3) Cette classe est la plus complexe puisqu'elle regroupe des composés allant du simple monomère comme les catéchines, jusqu'à des oligomères et des polymères de type proanthocyanidines, communément appelés tannins condensés. Selon le degré de polymérisation (DP), les proanthocyanidines, dénommées procyanidines lorsqu'elles sont constituées exclusivement d' (épi)-catéchine, sont classées en fonction de leur degré de polymérisation (dimères, trimères, tétramères...). Des DPs de plus de 50 unités ont été décrits <sup>62</sup>.



**Figure 3** : Structure de la quercétine-3-O-glucoside, apigénine-7-O-apioglucoside et la (+)-catéchine.

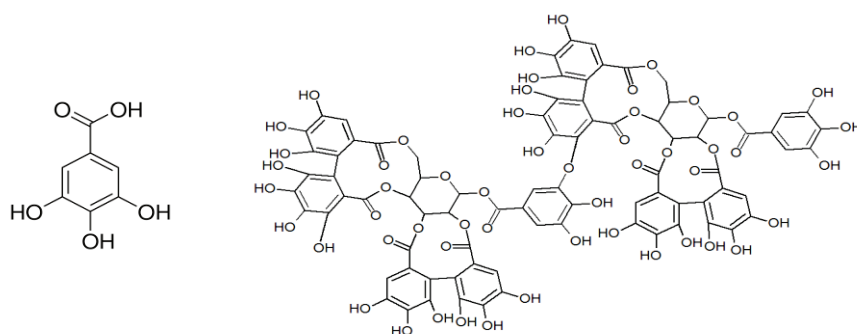
## II-2-2 Les non-flavonoïdes

On retrouve essentiellement dans ce groupe les acides phénoliques, les stilbènes ou encore les lignanes.

Les acides benzoïques et cinnamiques, et leurs dérivés, sont les 2 sous-classes des acides phénoliques les plus fréquentes parmi les non-flavonoïdes. Les acides benzoïques, présentent un squelette carboné en C6-C1. Universellement distribués dans le règne végétal, les acides gallique, protocatéchique, vanillique et syringique sont les composés les plus abondants<sup>63</sup>.

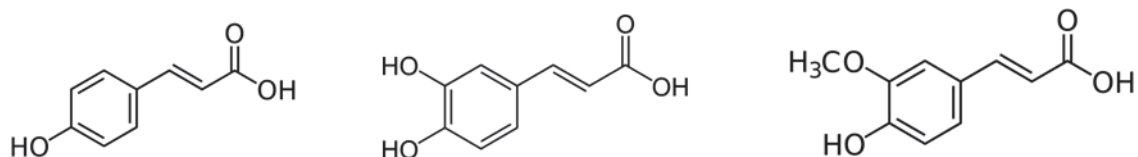
L'acide gallique (Figure 4) est le plus commun et est à la base de structures plus complexe comme les tannins hydrolysables (HTs). Plus de 1000 structures de tannins hydrolysables ont été identifiées. Ce sont des esters de l'acide gallique avec des polyols comme le glucose et qui ont un poids moléculaire allant de 500 à plus de 5000 Da. On distingue généralement 4 groupes selon leur voie de biosynthèse<sup>64</sup>. Le type I, également nommé gallotannin, représente la classe la plus simple des HTs. Elle est constituée de nombreuses structures allant de la glucogalline à des esters plus complexes comme le glucose pentagalloylé, ou digalloylés via une liaison depsidique entre plusieurs acides galliques. Les 3 autres groupes, II, III et IV sont regroupés dans la classe des ellagitannins.

L'acide ellagique et les ellagitannins sont présents dans les fruits rouges avec par exemple la sanguine H10 (Figure 4) contenu dans les framboises, les fraises, grenades et mûres mais également les noix ou noisettes<sup>65</sup>.



**Figure 4** : Acide gallique et un ellagitanin, la sanguine H10.

Les acides cinnamiques, présentent un squelette C6-C3 (acides phényl-3-propénoïques). Les principaux dérivés hydroxylés et méthylés sont les acides *p*-coumarique, caféique, férulique (Figure 5) et sinapique. On les trouve rarement libres, mais plutôt sous forme conjugués à l'acide quinique. Collectivement nommés acides chlorogéniques, ces composés principalement estérifiés en positions 3-, 4- et/ou 5- de l'acide quinique, sont présents dans plusieurs types de fruits mais essentiellement dans le café. Ces acides sont également trouvés estérifiés à l'acide tartrique.



**Figure 5** : Acides *p*-coumarique, caféique et férulique

En dehors de ces 2 sous-classes, de nombreux dérivés des acides phénylvalérique, phénylpropionique, phénylacétique ou phénylhydracrylique, pour ne citer qu'eux, sont rarement trouvés dans les aliments mais résultent plutôt du métabolisme microbien colique.

## II-2 Les sources alimentaires des polyphénols et apport quotidien

Les polyphénols sont présents dans plus de 450 plantes comestibles. Les boissons comme le thé, le café, les jus de fruits et le vin, et le chocolat et les fruits constituent les principales sources alimentaires de polyphénols. On les retrouve également dans les légumes, dans les céréales et herbes aromatiques.

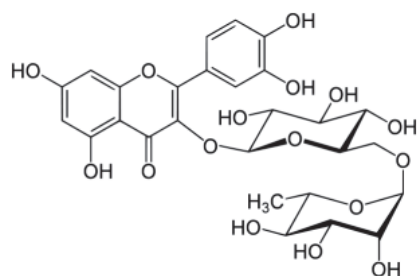
### II-2-1 Distribution des polyphénols dans les aliments

#### II-2-1-1 Les flavonoïdes

Les flavonols sont les plus répandus et sont présents dans tout le règne végétal à l'exception des algues et des champignons. La quercétine, le kaempférol, l'isorhamnétine ou la myricétine en sont les principaux représentants.

Ces flavonols sont rarement sous forme libre mais le plus souvent conjugués à des sucres simples comme le glucose, l'arabinose ou le xylose ou des disaccharides comme le rutinose, constitué de rhamnose et glucose. Ces conjugaisons se retrouvent fréquemment sur le carbone 3 du cycle C, comme la quercétine-3-*O*-rutinoside (Figure 6) mais peuvent se présenter en position 5 ou 7 du cycle A, et 3', 4', et 5' du cycle B<sup>66</sup>.

On les trouve dans de nombreux aliments, comme les abricots, les pommes, les tomates, et les haricots ou encore le thé ou le vin rouge, où ils sont généralement présents en faibles concentrations avec des teneurs inférieures à 20mg/100g de matière fraîche. Ces flavonols peuvent être présents en quantités plus importantes, avec des teneurs de 20 à 40mg/100g dans les olives noires, les asperges, ou les choux, et jusqu'à 158mg/100g dans les oignons rouges. Des teneurs allant jusqu'à 500mg/100g de matières fraîches sont trouvées dans de nombreuses herbes, épices ou condiments comme les câpres<sup>67</sup>.



**Figure 6** : Structure de la quercétine 3-*O*-rutinoside ou rutine

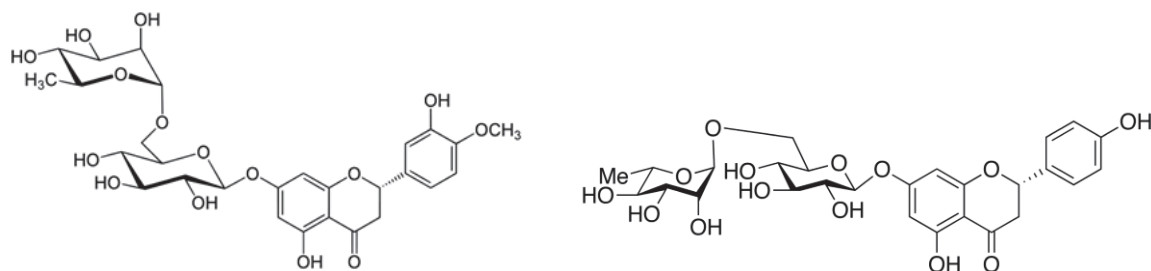
Ces conjugaisons sont un facteur déterminant de leur biodisponibilité, et ce point sera discuté un peu plus loin.

Les flavones, à l'inverse sont moins communes et les glycosides de l'apigénine (Figure 3) et de la lutéoline sont les principaux représentants. Des oses sont également fréquemment liés en position 7 du cycle A. On rencontre également dans cette classe, mais en faibles quantités l'apigénine ou la lutéoline porteurs d'un glucose sur le carbone 6 ou 8. De même, on peut trouver des formes pluri-méthoxylées, comme la tangerétine dans certains agrumes.

On retrouve essentiellement l'apigénine (après hydrolyse chimique) dans le persil avec 300 mg/100g de matière fraîche. On retrouve ces composés glycosylés dans les feuilles de céleri ou la lutéoline libre dans les artichauts, à des teneurs généralement inférieures à 100mg/100g de matière fraîche mais consommés en plus grande quantité. Ces flavones sont également présentes dans certaines céréales et les agrumes mais à des teneurs bien inférieures à 20mg/100g de matière fraîche <sup>68</sup>

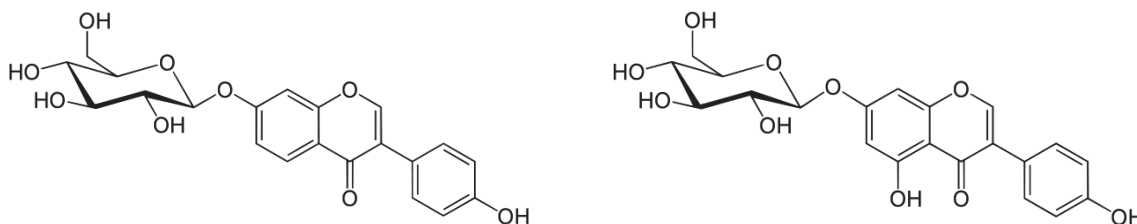
Les 2 principaux représentants des flavanones, l'hésperétine et la naringénine, sont présents essentiellement dans les agrumes. Ces aglycones, dont la structure est non planaire en vertu du centre chiral en C2, sont le plus souvent conjugués à un diholoside, le rutinose, dans l'hésperidine ou la narirutine (Figure 7). De ces 2 formes, la première est la plus fréquemment rencontrée. Ces deux composés sont dépourvus de saveur, à l'inverse de la neohésperidine et la naringine, tous deux conjugués au neohésperidose, qui donnent le goût amer à l'orange amère et au pamplemousse.

Les jus d'oranges peuvent contenir des quantités d'hésperidine et de narirutine allant de 5 à 60 mg/100mL <sup>67</sup>. Cependant le mésocarpe (ou ziste) des agrumes peut contenir des quantités bien supérieures et la consommation d'un fruit peut apporter des quantités supérieures non négligeables (jusqu'à 5 fois plus) comparé au jus de fruits <sup>69</sup>.



**Figure 7** : Structure de l'hésperidine et de la narirutine.

Les isoflavones ont pour particularité structurale que le cycle B soit porté par le C3 de l'hétérocycle C, plutôt que le C2. On les retrouve essentiellement dans les légumineuses, et en concentration les plus importantes dans le soja et les produits dérivés du soja. La daidzéine et la génistéine, en sont les représentants principaux avec à un degré moindre les formes méthyles en 4' du cycle B. Ces formes méthylées donnent la formononétine et la biochanine A, respectivement. Daidzéine et génistéine sont majoritairement conjuguées en position 7 à un résidu glucose (97-98%)<sup>70</sup> pour donner respectivement la daidzine et génistine (Figure 8). Le glucose peut également être estérifié par un groupement malonyle, ou acétyle en position 6 du glucose.

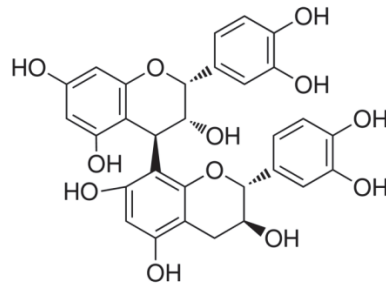


**Figure 8** : Structure de la daidzine (à gauche) et de la génistine (à droite).

Le 7-*O*-(6''-*O*-malonyl)glucoside et les glucosides di-estérifiés des isoflavones sont les composés le plus fréquemment retrouvés dans le soja (86 à 98%), suivi par les acétylglucosides et aglycones, mais avec des concentrations bien inférieures. Des teneurs de 50 à 380 mg/100g de matière fraîche sont communément décrites mais des variations selon la variété et le lieu géographique peuvent influencer sur les teneurs retrouvées<sup>71</sup>. Ces teneurs peuvent aussi varier selon le processus industriel appliqué aux matières premières. La farine de soja dégraissée diffère peu en qualité de la farine de soja mais les quantités retrouvées sont plus importantes du fait de leur concentration après l'élimination des graisses. D'autres processus industriels comme l'élaboration du lait de soja ou le tofu, modifient les teneurs et la composition puisque le traitement à chaud participe à l'hydrolyse des esters malonyle et acétyle portés par le glucose. Les produits à base de soja obtenus par fermentation, comme le miso, peuvent contenir de plus grandes quantités d'aglycones, suite à l'hydrolyse des glycosides<sup>71</sup>.

A l'image des flavanones, les flavan-3-ols sont non planaires en vertu de la saturation de la liaison entre les carbones 2 et 3. Ils présentent deux centres chiraux en C2 et C3. La (-)-épicatéchine et son isomère, la (+)-catéchine, peuvent être également hydroxylées en position 5' sur le cycle B pour former la (-)-épigallocatechine et la (+)-gallocatechine. Ces différents flavanols peuvent aussi subir une estérification par l'acide gallique en C3, et générer les (gallo)catéchines galloylées correspondantes. Dans les plantes, des structures plus complexes peuvent se former. Les proanthocyanidines ou tannins condensés sont des dimères, oligomères ou polymères des flavan-3-ols, où les unités monomériques sont liés principalement par des liaisons C4 -> C8 (ou C6). Le type B est un dimère de (+)-catéchine et (-)-épicatéchine liés entre eux par le C4 de l'hétérocycle du 1<sup>er</sup> flavanol et le C6 ou C8 du cycle A du 2<sup>nd</sup> (Figure 9).

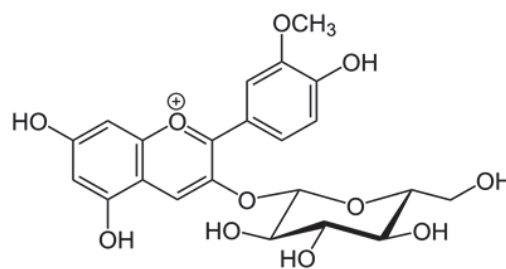




**Figure 9** : Structure de la procyanidine dimère B1.

Les sources les plus riches de flavan-3-ols sont le cacao et le chocolat noir avec des teneurs de 3400mg/100g et 1590mg/100g, respectivement. Les fruits tels que les raisins, les baies, les fruits à noyau et les pommes, sont également des sources importantes de flavan-3-ols avec par exemple des teneurs de 330 mg/100g pour les myrtilles, et de 110mg/100g pour les pommes. Les noisettes, les pistaches et les amandes ont des teneurs de 180 à 496 mg/100g de matières fraîches <sup>67</sup>. Le thé contient surtout de l' (-)-épigallocatechine et de l'(-)-épigallocatechine gallate. La (+)-gallocatechine, l'(-)-épicatéchine et l'(-)-épicatéchine gallate peuvent être également présentes en quantités substantielles selon le type de thé, et il est trouvé en général une teneur totale de ces flavan-3-ols entre 40 et 65 mg/100mL de thé <sup>45</sup>.

Les anthocyanines sont une sous-classe particulière, avec comme représentants principaux, la cyanidine-3-*O*-rutinoside, la malvidine-3-*O*-glucoside, la delphinidine-3-*O*-rutinoside et la pelargonidine-3-*O*-glucoside. On les trouve essentiellement dans les fruits rouges comme le cassis, les mures, les fraises ou encore les framboises, mais également dans le raisin ou les fruits à noyau comme la cerise. On trouve des quantités totales d'anthocyanines de 60mg/100g dans les fraises à 600mg/100g dans les baies de cassis, et jusqu'à 1300mg/100g dans le sureau noir, mais avec des différences substantielles selon les composés avec par exemple la présence majoritaire de pelargonidine-3-*O*-glucoside (Figure 10) dans les fraises.



**Figure 10** : Structure de la pélagronidine-3-*O*-glucoside.

## II-2-1-2 Les non-flavonoïdes

### Les acides hydroxybenzoïques

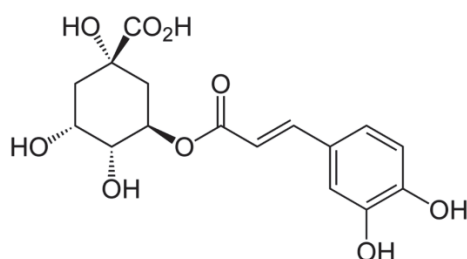
Les acides hydroxybenzoïques sont très répandus dans les aliments et les acides gallique (noix, baies, thé et vin), ellagique (noix et baies), 4-hydroxybenzoïque (olives, baies et carottes), vanillique (baies olives et cacao) et syringique (noix, olives et choux fleurs) en

sont les principaux représentants. Ils sont présents sous formes libre, estérifiée ou glycosylée. Les châtaignes contiennent de loin la plus grande quantité avec 1215mg/100g de matière fraîche; les mûres, grenades et framboises contiennent des quantités allant de 50 mg/100g à 121mg/100g de matière fraîche <sup>67</sup>.

### Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques sont largement distribués dans les aliments. Les principaux représentants sont les acides caféique, férulique, *p*-coumarique et sinapique. L'acide caféique est essentiellement présent sous forme estérifiée par l'acide quinique et forme le groupe des acides chlorogéniques. On les trouve dans le café, les baies, divers fruits à noyau comme les prunes, les pommes ou les poires et dans des légumes comme les artichauts, les brocolis et les tomates.

L'acide férulique est également estérifié par l'acide quinique, et lié aux hémicelluloses dans la paroi cellulaire des grains de céréales et avec les anthocyanines dans diverses baies et le vin. Les quantités les plus importantes en acides hydroxycinnamiques sont trouvées dans le café avec une teneur moyenne de 212mg/100mL, les artichauts et les prunes avec des teneurs de 202 et 192 mg/100g, respectivement. Des teneurs de 88mg/100g à 135mg/100g sont trouvées pour les cerises, les prunes, les olives noires et vertes et les myrtilles. Des teneurs de 90mg/100g et 212mg/100g sont mesurées dans les céréales (après hydrolyse) dans la farine de blé raffinée et les grains de maïs <sup>67</sup>.



**Figure 11** : Structure d'un acide chlorogénique, l'acide *trans*-5-*O*-caféoylquinique.

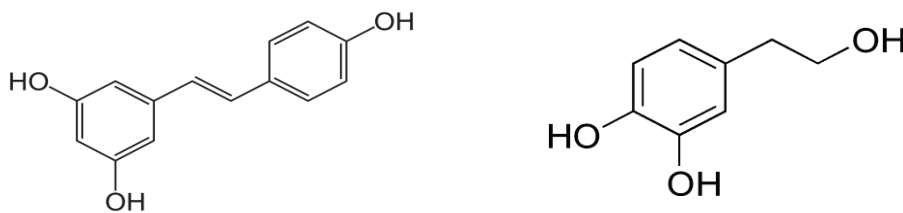
### Autres polyphénols

Les lignanes forment un groupe varié de composés phénoliques et ont été identifiés dans de nombreuses plantes<sup>72</sup>. Quatre lignanes sont présents dans de nombreux aliments : le secoisolaricirésinol, le matairesinol, le laricirésinol et le pinorésinol.

Les graines de lin contiennent la plus grande quantité de lignanes, qui peuvent être présents à des concentrations de 300mg/100g (après hydrolyse)<sup>72</sup>. Le diglucoside du secoisolaricirésinol représente 98% de ce total. Les fruits et légumes, et notamment ceux de la famille des brassicaceae contiennent des quantités bien inférieures avec des concentrations allant de 0.2 à 2.3mg/100g. On retrouve enfin ces lignanes dans la plupart des denrées alimentaires allant des fruits aux boissons alcoolisées et non-alcoolisées, avec des concentrations bien en deçà des 0.2 mg/100g malgré quelques exceptions. Les graines de sésame, et l'huile de sésame contiennent des quantités de lignanes encore plus importantes que les graines de lin avec des

concentrations de 770 et 1296 mg/100g de matière fraîche. Cependant, les types de lignanes, comme la sésamine, le sésaminole et le sésamole, sont peu communs et spécifiques à ces deux denrées.

Les stilbènes constituent une source mineure de polyphénols dans le régime alimentaire. Le resveratrol est présent dans les airelles, la canneberge ou les baies de cassis à des teneurs de 3, 1.9 et 1.5mg/100g de matières fraîches, respectivement. La teneur totale en stilbènes dans le raisin est inférieure à 0.35 mg/100g. Malgré la présence dans le vin rouge d'une diversité de dérivés de stilbènes, les teneurs trouvées de 4.4mg/100mL sont bien en deçà des concentrations des autres composés polyphénoliques comme les anthocyanines.



**Figure 12** : Structure du resveratrol (à gauche) et de l'hydroxytyrosol (à droite).

Le tyrosol et l'hydroxytyrosol sont des phényléthanoïdes retrouvés essentiellement dans les olives et à un degré moindre dans l'huile d'olive. Dans les olives vertes et noires, des concentrations en tyrosol de 7 et 14mg/100g et d'hydroxytyrosol de 56 à 66mg/100g peuvent être trouvées <sup>45</sup>, alors que des teneurs généralement inférieures à 1mg/100mL sont retrouvés dans les huiles d'olives ou le vin. Cependant selon la variété des huiles des quantités plus importantes peuvent être retrouvées comme dans des huiles vierges produite en Espagne, avec des teneurs de 2.3 à 6mg/100mL <sup>73</sup>.

## II-2-2 Apport quotidien

La mesure de l'apport en polyphénols repose sur l'estimation correcte de la teneur dans les aliments et de la consommation de ces aliments. Deux bases de données majeures regroupent le contenu en polyphénols des denrées alimentaires : l'USDA et Phenol-Explorer <sup>45-46, 74</sup>. Ces bases ont été largement utilisées pour étudier les associations entre les apports alimentaires en polyphénols et la survenue de maladies.

Cependant, de nombreux facteurs sont susceptibles d'affecter les mesures de polyphénols retrouvées dans ces bases. Le contenu en polyphénols peut varier selon les espèces de plantes ou la maturité de la plante. Certains polyphénols peuvent être absents dans certains aliments, mais présents dans des aliments similaires (e.g. deux variétés de fruits différentes) <sup>44</sup>. Ces erreurs ou imprécisions rendent plus délicates l'étude d'associations entre certains polyphénols ou sous-classes et le risque de maladies comme le cancer.

Les variations liées à l'analyse des polyphénols dans les aliments <sup>75-77</sup>, aux facteurs environnementaux, aux variétés consommées, ou encore aux processus industriels de

transformation, et à la conservation<sup>69</sup>, ne sont pas facilement appréciables et sont difficiles à intégrer dans les bases de données. Certains composés, en particulier formés lors de réactions d'oxydation ou polymérisation, quoique détectés, n'ont pas encore été précisément caractérisés<sup>78</sup>. Tous ces facteurs rendent difficiles la mesure des consommations alimentaires en polyphénols à partir des bases de données existantes et de questionnaires de consommation alimentaire.

Malgré ces différents biais, l'apport alimentaire en polyphénols a été étudié dans de nombreuses populations<sup>79</sup>. Aux Etats-Unis, avec des bases de données du département de l'agriculture Américain (USDA) se basant uniquement sur les flavonoïdes, des apports moyens de 190 mg/jour ont été rapportés<sup>80</sup> avec principalement les flavan-3-ols (84%) suivis par les flavanones (7.6%) les flavonols (6.8%) les anthocyanidines (1.6%) les flavones (0.8%) et enfin les isoflavones (0.6%). Une étude australienne a estimé l'apport en flavonoïdes à environ 450mg/jour dont 415mg (92%) apporte par les flavan-3-ols, avec le thé comme source majeure de ces flavan-3-ols<sup>81</sup>. Dans deux études finlandaise et française, l'utilisation de bases de données plus complètes a permis de définir des teneurs probablement plus réalistes même si potentiellement sous-estimées<sup>79</sup>. En Finlande, des apports de 850mg de polyphénols provenant essentiellement des acides phénoliques avec 75% du total puis les proanthocyanidines avec 14% et les anthocyanidines et autres flavonoïdes pour 10%.<sup>82</sup> Le café (63%) suivi des céréales et du thé (10% chacun) puis des fruits (5%) sont les principaux aliments source. L'apport alimentaire moyen dans la population française<sup>83</sup> a été estimé à 1200mg/jour. Ce chiffre inclue 640mg/jour pour les acides phénoliques, essentiellement des acides cinnamiques, et 500 mg/jour de flavonoïdes, avec les proanthocyanidines majoritaires. En Europe, ce travail a été récemment évalué dans la cohorte EPIC grâce à la base Phenol-Explorer. Cette base qui est la plus complète à l'heure actuelle a permis d'affiner les mesures de l'apport en polyphénols dans différentes régions d'Europe. Pays méditerranéens, pays non méditerranéens et un groupe végétarien nommé « health conscious ». Un gradient des pays du sud vers les pays du nord quant à l'apport moyen en polyphénols allant de 584 mg par jour pour les femmes grecques jusqu'à 1626 mg par jour pour les femmes danoises a été observé. L'apport en polyphénols est le plus important dans le groupe végétarien, suivi par les pays non-méditerranéen puis les pays méditerranéens.

Les 2 classes principales de polyphénols sont les acides phénoliques avec 500 à 700mg/jour et, représentés essentiellement par les acides hydroxycinnamiques, et les flavonoïdes, avec des apports de 450 à 910mg/jour et représentés majoritairement par les flavan-3-ols. Au sein de cette sous-classe, les proanthocyanidines prédominent largement. On peut constater que 2 groupes sur 3, hormis les hommes du groupe méditerranéen, consomment plus d'acides phénoliques qui contribuent pour environ 55% des polyphénols totaux, suivi par les flavonoïdes pour 38 à 44%. Le groupe végétarien, par contre, consomme plus de flavonoïdes (60% de la totalité des polyphénols) que d'acides phénoliques ; les autres composés sont minoritaires (2-6%) comparés aux flavonoïdes et acides phénoliques mais néanmoins non négligeables.

Il est intéressant de noter que ces profils sont dominés par un nombre réduit d'aliments consommés en grandes quantités. L'apport majeur des polyphénols est donné par deux boissons, le café et le thé, qui représentent à elles deux 58 à 62% de l'apport en polyphénols

pour les groupes méditerranéens et végétariens et 36% pour le groupe non méditerranéen. Les fruits avec 9 à 25% sont le 3eme groupe d'aliments.

En terme de polyphénols, ce sont les acides chlorogéniques (acides 5-, 4- et 3-O-caféoylquinique) qui sont les plus représentés avec des apports allant de 290 à 544 mg/jour selon les groupes, et 450mg/jour en moyenne tous pays confondus. Les proanthocyanidines viennent ensuite avec des apports allant de 200 à 320mg/jour, avec une moyenne de 200mg/jour. Ces derniers sont apportés essentiellement par les fruits comme les pommes et les poires, ou le chocolat.

L'apport en proanthocyanidines est assez difficile à évaluer. Ces composés, allant du dimère aux polymères, sont difficiles à quantifier et sont susceptibles d'être sous-estimés.<sup>84</sup> On peut voir que des apports de 60mg/jour en flavan-3-ol (DP<2) ont été évalués aux Etats-Unis<sup>85</sup> et même 450mg/jour chez des espagnols en considérant les polymères<sup>86</sup>. Dans cette étude l'apport moyen en polyphénols totaux était supérieur à 2.6g/jour.

Dans les populations asiatiques comme au Japon, peu de données existent sur les sources alimentaires de polyphénols. Il est seulement reconnu que ces populations fortes consommatrices de soja, ont des apports importants en isoflavones (phytoestrogènes) comme la daidzéine ou la génistéine, comparés notamment aux pays européens. L'apport quotidien dans les pays occidentaux serait de l'ordre de 1 à 3mg contre 15 à 50mg voire jusqu'à 100 mg dans les pays asiatiques<sup>87</sup>. De plus, il est à noter que la transformation du soja impacte fortement la quantité et la qualité de ces isoflavones.

La mise en place d'une base de données locale regroupant des denrées alimentaires propres à la culture japonaise a montré que le café et le thé étaient les deux boissons majeures participant à l'apport en polyphénols. Il a été montré que l'apport total en polyphénols était de 840 mg/jour chez des japonais d'âge mûr et de 1500mg/jour chez des japonais, âgés<sup>88-90</sup>. Excepté les deux sous-classes, flavan-3-ols et acides hydroxycinnamiques, largement représentées, les anthocyanidines, flavonols, flavanones, flavones, acides hydroxybenzoïques, et tyrosols comptent pour 1 à 6% de l'apport total en polyphénols<sup>91</sup>.

Les apports en tyrosols sont en général faibles avec 0.3mg/jour et des valeurs de 0.1 à 0.25mg/jour sont rapportées chez des Espagnols<sup>73</sup>. Les stilbènes et lignanes sont en général présents à des taux inférieurs à 1% des polyphénols totaux. Les lignanes seraient par ailleurs la source principale de phytoestrogènes en Europe. Ces phytoestrogènes, à l'inverse des isoflavones, coumestanes et prényl-flavonoïdes sont ubiquitaires dans le régime alimentaire des populations des pays industrialisés. Cependant chez les végétariens, les isoflavones comptent pour 1.9% de l'apport total en polyphénols contre 0.6% pour les lignanes<sup>91</sup>.

### **II-3 Absorption, distribution, métabolisme et excrétion(ADME)**

L'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion a été le sujet de recherches importantes depuis plus de 20 ans<sup>92-100</sup>. Suite à l'ingestion d'un aliment, les glycosides et esters de polyphénols, peuvent être en partie hydrolysés par des estérases salivaires<sup>101</sup>. D'autres polyphénols, notamment des aglycones ou des métabolites des anthocyanines,

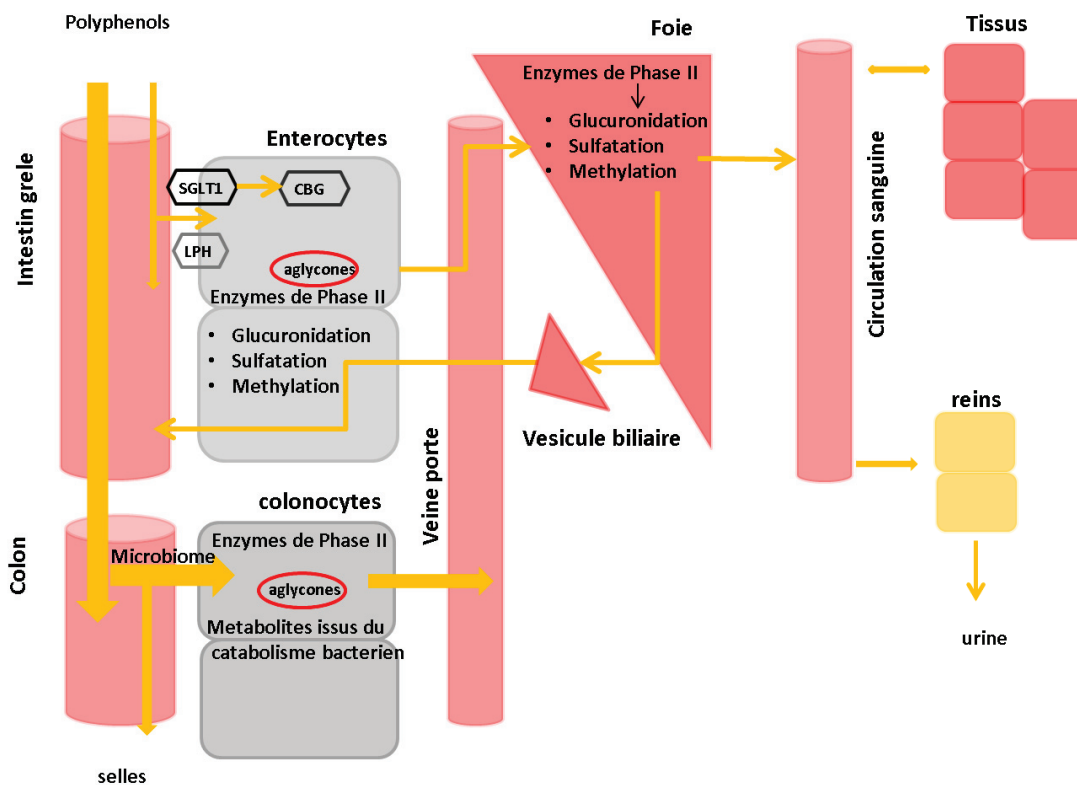
peuvent aussi être absorbés au niveau de la paroi gastrique<sup>102-103</sup>. Cependant, l'intestin reste l'organe majeur pour l'absorption des polyphénols.

A l'exception des flavanols, les flavonoïdes sont principalement présents dans les aliments sous formes glycosylées. Selon la nature du sucre, glucose, arabinose, galactose ou rutinose, leur absorption au niveau gastro-intestinal sera différente. Schématiquement, le lieu d'absorption dépend de la nature des oses liés aux polyphénols<sup>104-106</sup> et l'absorption de certains polyphénols se déroule au niveau de l'intestin grêle. Dans le cas d'un sucre simple lié à l'aglycone, son hydrolyse permet une absorption au niveau du duodénum ou du jéjunum.

Typiquement, l'absorption au niveau de l'intestin grêle est associée à une hydrolyse par la lactase phloridzin hydrolase (LPH) présente au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales<sup>107-109</sup>. L'aglycone libéré, plus lipophile, pénètre au niveau des cellules épithéliales par diffusion passive. Une autre voie implique le co-transporteur du glucose sodium dépendant, SGLT1<sup>108, 110-111</sup>. Une fois transporté dans la cellule épithéliale, des  $\beta$ -glucosidases cytosoliques (CBG) assurent l'hydrolyse du glycoside et libèrent l'aglycone<sup>109, 112-113</sup>. Ainsi, deux grandes voies coexistent au niveau de la partie haute intestinale, et sont nommées, LPH/diffusion et Transport/CBG (Figure 13)

Une fois présents dans la cellule épithéliale intestinale, les aglycones sont soumis surtout à l'action de glucuronotransférases (uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransférase, UGTs)<sup>95, 114-117</sup> pour former des métabolites glucuronidés. Des sulfotransférases (SULT) ou bien des méthyl transférases (Catéchol-*O*-méthyltransférases, COMT) peuvent également coexister et former des métabolites sulfatés ou méthylés<sup>114, 118-121</sup>. Ces métabolites diffusent dans la circulation sanguine via la veine porte et sont soumis à nouveau à un métabolisme supplémentaire de phase II au niveau des cellules hépatiques,<sup>122-123</sup> avec essentiellement des SULT<sup>120, 124-125</sup> et COMT<sup>125</sup>. De très nombreuses formes coexistent en vertu du nombre de groupements hydroxylés. A titre d'exemple, l'(-)-épicatéchine présente des positions préférentielles en 3' et 4' du cycle B et 5 et 7 du cycle A. Généralement mono-glucuronidés en 5-, 7- et 3'-, sulfatés en 7- ou méthylés en 3'- et 4'-. Des formes combinées existent également<sup>126</sup>. Excrétés dans la bile, ces molécules conjuguées peuvent être réabsorbées au niveau du côlon après hydrolyse des glucuronides par le microbiote, et sont donc soumises à un cycle entéro-hépatique. Un nouveau mécanisme permettrait d'augmenter la biodisponibilité de certains polyphénols au niveau intestinal<sup>127</sup>

Cependant, avant le passage dans la circulation sanguine, un efflux dans la lumière intestinale est également possible<sup>118, 128-129</sup> et implique des transporteurs ABC (ATP binding cassette) comme la protéine MDR2 (Multidrug résistance protein2) et la glycoprotéine P (P-gp) ou encore la protéine BCRP (Breast cancer resistance protein)<sup>130</sup>.



**Figure 13** : Mécanismes pour l'absorption et le métabolisme des composés polyphénoliques dans le petit intestin et le côlon.

Toutefois, et même lorsque les polyphénols alimentaires sont absorbés au niveau de l'intestin grêle, une part significative gagne le gros intestin<sup>131</sup> Même si l'absorption est variable selon les composés, avec des absorptions apparentes inférieures à 1% pour les anthocyanines<sup>132-134</sup> ou supérieures à 40% pour les isoflavones<sup>135-136</sup>, il est montré que 90 à 95% des polyphénols ne seraient pas absorbés dans la partie haute intestinale (duodénum)<sup>137</sup>.

Les polyphénols non absorbés au niveau de l'intestin grêle transitent jusqu'au côlon où ils sont largement métabolisés par le microbiote. Les flavonoïdes notamment ceux liés à un diholoside comme le rutinose, seront hydrolysés par la flore intestinale et l'aglycone ainsi libéré absorbé au niveau du côlon. La position des groupes hydroxyles influence également leur absorption et leur dégradation<sup>138</sup>.

Les données *in vitro* et chez l'animal sont nombreuses<sup>139-144</sup> Le microbiote est constitué de plus de 1000 espèces et 7000 souches<sup>145</sup>. Cependant, les microorganismes responsables du catabolisme de telle ou telle classe de polyphénols n'ont pas tous été identifiés. Les travaux se sont surtout focalisés sur les isoflavones et lignanes<sup>146-147</sup> les flavonols<sup>142, 148</sup>, les flavones<sup>149</sup> les flavan-3-ols<sup>126, 150</sup> et les acides chlorogéniques<sup>151</sup>. Des bactéries du genre *Clostridium*, *Eubacterium* ou *Lactobacillus* toutes trois appartenant à l'embranchement des *Firmicutes* ont souvent été trouvées<sup>146, 152</sup> avec parfois des bactéries appartenant à l'embranchement des *Bacteroidetes* ou *Actinobacteria* comme le genre *Bifidobacterium*<sup>144</sup>.

Des études ont montré par exemple que les proanthocyanidines, dimères, trimères et au-delà, étaient pratiquement non absorbés au niveau intestinal mais subissaient une dégradation

extensive au niveau du côlon. Les métabolites sont principalement des acides phénylpropioniques, phénylacétiques ou hydroxybenzoïques. De nombreuses voies métaboliques ont été proposées. Certaines impliquent la scission du cycle C central et la formation d'acides hydroxyphénylvalériques<sup>153</sup> et de lactones telles que les 5-(3',4',5')-trihydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactone et 5-(3',4')-dihydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactone formées à partir de d'(épi)catéchines et d'(épi)gallocatéchines, respectivement<sup>154-156</sup>. Des deshydroxylations et des  $\beta$ -oxydations successives mènent à des acides hydroxyphénylpropioniques et hydroxybenzoïques comme les acides 3,4-dihydroxyphénylpropionique, 3- et 4-hydroxyphénylpropionique, puis les acides hydroxybenzoïques associés<sup>154, 157-159</sup>. Enfin, des  $\alpha$ -oxydations ont été proposées par différents auteurs pour justifier la formation des acides hydroxyphénylacétiques et de l'acide homovanillique (acide (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acétique)<sup>126</sup>.

De nombreux acides hydroxy- et dihydroxyphénylpropioniques, hydroxy- et dihydroxyphénylacétiques, acides homovanillique, hippurique et hydroxyhippurique similaires à ceux formés à partir des flavan-3-ols ont été proposés comme métabolites issus du métabolisme microbien des flavonols, flavanones ou anthocyanines<sup>160</sup>.

Les lignanes, comme le secoisolaricirésinol et le matairesinol sont métabolisés en entérodiol et entérolactone, respectivement, par le microbiote<sup>161</sup>. Il a été montré que le pinorésinol et le laricirésinol, pouvaient également être précurseurs de ces mêmes composés<sup>162</sup>. Les divers alkylrésorcinols, composés phénoliques caractéristiques des céréales complètes, sont les précurseurs de l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque<sup>163</sup>.

La daidzéine peut être convertie par le microbiote en dihydrodaidzéine puis en *O*-desméthylangolensin et equol<sup>147, 164-165</sup>. Des disparités dans la formation de ces métabolites microbiens sont observées d'un individu à un autre<sup>166-168</sup>. Elles sont bien connues en particulier pour la formation de l'equol à partir de la daidzéine par le microbiote<sup>169-170</sup>. Seulement 30% de la population européenne et 50-60% de la population asiatique serait susceptible de synthétiser l'equol<sup>171-172</sup>. Des pourcentages proches de ceux de la population asiatique sont également retrouvés chez les végétariens<sup>173</sup>.

## II- 4 Activités biologiques

De par la quantité considérable de données disponibles dans la littérature sur les polyphénols et la prévention de maladies chroniques, ce chapitre ne se veut pas exhaustif et toutes les publications ne peuvent être bien évidemment citées. Cependant, d'excellentes revues très pertinentes sur les mécanismes d'actions et les activités biologiques des polyphénols dans la prévention des maladies neurodégénératives<sup>174</sup>, cardio-vasculaires<sup>38, 175</sup>, du diabète<sup>39, 176</sup> et du cancer<sup>177-179</sup> permettent de mettre en parallèle des mécanismes d'actions parfois communs et qui reposent sur des mécanismes non spécifiques et spécifiques.

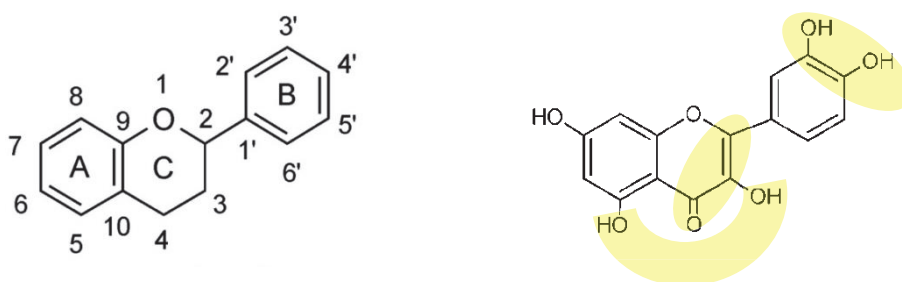
Les mécanismes biochimiques de bases sont proposés afin de rendre compte de l'éventail de l'activité biologique des polyphénols. Les mécanismes proposés pour souligner l'activité biologique se divisent en deux groupes. Des mécanismes non spécifiques liés à la présence de



groupes phénoliques, et des mécanismes spécifiques liés à des caractéristiques structurales des différents polyphénols <sup>7</sup>.

#### II-4-1 Mécanismes non spécifiques antioxydants: piègeurs de radicaux libres et agents chélateurs de métaux

Une activité antioxydante maximale requiert la présence de trois facteurs structuraux. Un groupe catéchol sur le cycle B (3'- et 4'-hydroxyl), une double liaison C2-C3 associée à un groupe céto en C4, sur le cycle C, et la présence de groupes hydroxy en C3 et C5 sur les cycles C et A (Figure 13).



**Figure 14** : Caractéristiques structurales définissant l'action antioxydante des flavonols. Les aires surlignées définissent les 3 zones attribuant l'intensité antioxydante maximale <sup>7</sup>

L'activité antioxydante de piègeur de radicaux libres ou par séquestration des métaux a été démontrée dans de nombreuses études <sup>7, 180</sup>. Cependant, cette activité bénéfique serait plus discutable *in vivo* dû aux concentrations rencontrées, généralement inférieures à 1  $\mu$ M et qui sont loin des concentrations communément utilisées pour les tests *in vitro* <sup>181</sup>. Il a été proposé qu'un mode d'action autre qu'une activité antioxydante directe soit responsable des effets positifs sur la santé des polyphénols.

#### II-4-2 Mécanismes non spécifiques par interaction avec les membranes

La présence de domaines hydrophiles et hydrophobes dans la plupart des polyphénols permet une liaison non spécifique à différents niveaux de la membrane <sup>182-185</sup> notamment par la formation de liaison hydrogène <sup>186</sup>. La structure planaire de polyphénols comme les flavonols ou des flavones facilite l'interaction avec les membranes <sup>187</sup> mais également avec les protéines <sup>188-191</sup>. En modifiant la structure membranaire et ses caractéristiques physiques, les polyphénols pourraient modifier la fonction cellulaire. Même si ces interactions sont non spécifiques, une certaine sélectivité pour des zones spécialisées de la membrane nommés radeaux lipidiques peut se produire <sup>192-193</sup>.

### **II-4-3 Mécanismes spécifiques**

Hormis le groupe phénolique partagé par les polyphénols et lui assurant une activité biologique par un mécanisme non spécifique, les caractéristiques chimiques des différents polyphénols leur confèrent potentiellement une activité via un mécanisme spécifique. La littérature est pléthorique dans le domaine, et de nombreuses études *in vitro* et chez l'animal se sont attachées à définir la protéine ou les protéines impliquées dans l'interaction spécifique. Les interactions polyphénols-protéines suggèrent une activité qui sera dépendante du type de protéines impliquées, et qui peut aller de la modification d'activité enzymatique<sup>194-196</sup>, la fixation à des récepteurs<sup>197-198</sup> ou à des messagers secondaires impliqués dans les voies de transduction du signal<sup>198-200</sup>, et jusqu'à des facteurs de transcription du signal au niveau nucléaire<sup>201-202</sup>.

## **II-5 Les polyphénols et le cancer colorectal**

### **II-5-1 Généralités sur le cancer**

#### **II-5-1-1 Introduction**

En trois décennies, la compréhension des origines du cancer a changé de façon spectaculaire, et ce grâce à la révolution de la biologie moléculaire. La découverte successive des oncogènes cellulaires, des gènes suppresseurs de tumeurs, et des systèmes de réparation de l'ADN a permis d'établir un scénario multifactoriel de la cancérogenèse. Lors de la progression tumorale, les deux fonctions protectrices majeures que sont les gènes suppresseurs de tumeurs et les systèmes de réparation de l'ADN sont perdues et cette perte participe grandement au développement de la majorité des cancers humains. Les mécanismes épigénétiques, comme la méthylation des résidus cytidine dans les séquences CpG de l'ADN et la modification des histones, participent également à la pathogenèse du cancer.

Ainsi, et même si tous les cancers n'ont pas une étiologie commune, une succession d'évènements moléculaires transforme une population cellulaire normale en une population cellulaire cancéreuse. L'instabilité génétique associée à une expression anormale des gènes, soit des oncogènes qui par leur surexpression facilitent le cancer, soit des gènes suppresseurs de tumeurs qui par leur inhibition sont dans l'incapacité de freiner la progression de celui-ci, sont des éléments déterminants. Une transduction du signal anormale, la perte de l'inhibition de contact et une prolifération illimitée, l'expansion de la tumeur localement par invasion de tissus adjacents, ou à distance par métastases, l'induction de l'angiogenèse et enfin l'échappement au contrôle du système immunitaire, sont des évènements partagés par tout développement néoplasique.

Le schéma classique et fortement simplifié du mécanisme de cancérisation (initiation, promotion et progression) a permis de différencier les carcinogènes génotoxiques des

carcinogènes non génotoxiques. Les carcinogènes génotoxiques sont par exemple des agents physiques (UV et radiation ionisante), le benzo[a]pyrène, l'aflatoxine ou l'amiante. Les carcinogènes non-génotoxiques peuvent être des polluants agissant par une signalisation cellulaire propre (récepteurs AhR *aryl hydrocarbon receptor*). Ce sont notamment des pesticides (récepteur PXR *pregnane x receptor*) qui peuvent agir comme perturbateurs endocriniens, perturbateurs enzymatiques (organophosphorés) ou provoquant un stress cellulaire (stress oxydant et inflammation).

Aujourd'hui, la distinction nette entre ces carcinogènes génotoxiques et non-génotoxiques est fortement relativisée. Comme illustré par les classiques expérimentations sur des modèles murins de cancer de la peau, les initiateurs déclenchent la 1<sup>ère</sup> étape de la tumorigénèse alors que les promoteurs sont les éléments moteurs en permettant l'expansion clonale de cellules tumorales déjà initiées, via des mécanismes n'impliquant pas de dommages génétiques.

Il semble néanmoins de plus en plus probable que les facteurs majeurs de l'incidence des cancers opèrent principalement au niveau de l'étape de promotion. L'inflammation chronique des tissus et le relargage de facteurs de croissance par ces tissus inflammés semble jouer un rôle essentiel dans l'étape de promotion. De nombreux facteurs issus de l'alimentation semblent fonctionner comme promoteurs plutôt que mutagènes. Dans ce contexte, si ces idées sont confirmées par de futures recherches, une compréhension plus complète de la pathogénèse du cancer au niveau moléculaire est nécessaire afin de d'expliquer ces mécanismes de promotion tumorale non génétique<sup>203-204</sup>.

## **II-5-1-2 Carcinogénèse environnementale**

Les facteurs environnementaux plus que les facteurs génétiques expliqueraient une part importante de la mortalité par cancer dans le monde. Des centaines de composés carcinogènes confirmés ou suspectés ont été identifiés.

### **Classes de carcinogènes et mécanismes de la carcinogénèse chimique**

Les carcinogènes peuvent être classés en trois catégories : carcinogènes physiques, carcinogènes biologiques et carcinogènes chimiques<sup>205</sup>. Les carcinogènes physiques concernent plusieurs types de radiations comme les UV ou les radiations ionisantes. L'exposition à ces radiations, notamment lors de l'exposition au soleil, provoquent des dommages photochimiques à la peau, pouvant aboutir à la formation de cancer de la peau.

Les carcinogènes biologiques jouent un rôle important puisque 15 à 20% des cancers seraient dus à des agents infectieux comme les bactéries, parasites ou virus. Ceux-ci incluent le virus du papillome humain (HPV), les herpes avec virus de Epstein-Barr (EBV), les virus de l'hépatite C ou B (HCV, HBV), le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), ou encore la bactérie *Helicobacter pylori*. Trois mécanismes majeurs sont reconnus et sont impliqués aussi bien dans l'initiation que la promotion. Le plus commun résulte de l'infection persistante de l'agent infectieux avec inflammation chronique. La formation d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote par les macrophages sur le site de l'infection est à même de provoquer des dommages sur l'ADN et de contribuer à la cancérogenèse. Ce mécanisme sera discuté

plus loin et semble être un élément clef dans la cancérogenèse, y compris celle non directement liée à des agents infectieux connus. Un second mécanisme implique la participation directe de l'agent infectieux dans la transformation cellulaire en activant une voie oncogénique ou en inactivant un gène suppresseur de tumeur. Enfin le troisième mécanisme inclut une immunosuppression et un déficit de reconnaissance des cellules transformées ou infecte par le système immunitaire comme dans le cas dans l'infection par le HIV.

Les carcinogènes chimiques incluent les carcinogènes organiques, les carcinogènes inorganiques, les fibres, et les hormones. Les carcinogènes organiques sont essentiellement des composés à base de carbone comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (benzo[a]pyrène, 3-methylcholanthrene), des mycotoxines (aflatoxine B1 (AFB1)), des amines aromatiques (benzidine, 2-naphthylamine), des amines hétérocycliques (MeIQx, PhIP), des *N*-nitrosamines (NNK, aniline), des agents alkylants ou des solvants (benzène).

De nombreux modèles animaux ont été développés pour étudier les multiples étapes du développement et de la progression tumorale induites par les agents carcinogènes. Dans les premières étapes de la carcinogenèse, Les mutations sur l'ADN sont une conséquence d'une exposition à un carcinogène électrophile, de dommages oxydatifs de l'ADN, de cassure des brins d'ADN ou d'autres attaques de l'ADN. Ces mutations se produisent vraisemblablement dans les cellules souches multipotentes et sont particulièrement critiques dans l'initiation de la cancérogenèse lorsqu'elles touchent les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Ces mutations, lorsqu'elles ne sont pas réparées, deviennent irréversibles et sont transmises aux cellules filles lors de la division cellulaire. Durant la carcinogenèse colorectale, des mutations dans le gène APC (adenomatous polyposis coli) semble initier la tumorigénèse<sup>206</sup>.

L'étape de promotion tumorale est caractérisée par l'expression et la prolifération des cellules initiées, certaines d'entre elles conservant des propriétés proches des cellules souches. La plupart des agents promoteurs exerceraient leurs effets via les récepteurs cellulaires ou les voies de signalisation impliquées dans la croissance et différenciation cellulaire et/ou l'apoptose. Dans la carcinogenèse colorectale, les acides biliaires secondaires issus du métabolisme microbien colique comme l'acide déoxycholique (DCA) pourraient agir en tant qu'agent promoteur<sup>207</sup>.

Des facteurs inflammatoires et des facteurs du tissu conjonctif pourraient participer à ces effets en fournissant un environnement favorable à la croissance tumorale. Ces derniers facteurs sont à rapprocher des mécanismes observés dans le cas de la cancérogenèse par agents infectieux. A l'inverse de l'étape d'initiation, l'étape de promotion est réversible et n'implique pas de mutations sur l'ADN.

L'étape de progression est la phase ultime de la cancérogenèse. La tumeur augmente en taille, et des mutations additionnelles peuvent se produire, pour aboutir à une invasion des tissus environnants puis des métastases. Dans la carcinogenèse colorectale, les foyers de cryptes aberrantes (ACF) faisant suite à la mutation du gène APC, peuvent accumuler des mutations

de l'oncogène K-ras et d'autres oncogènes et autres gènes suppresseurs de tumeurs et progresser de l'adénome vers le carcinome<sup>206, 208</sup>.

Des mutations de gènes associés au maintien de la stabilité génétique sont impliquées dans la formation d'autres mutations. A ce stade, les cellules mutées sont en mesure d'envahir le tissu environnant, et de diffuser dans la circulation sanguine et coloniser des sites distants. Cela implique l'action d'enzymes de dégradation de la matrice (MMPs, matrix metalloproteinases).

Cependant, en plus de l'accumulation de mutations génétiques, de la promotion et de l'invasion tumorale, des lésions non-génotoxiques héréditaires peuvent survenir<sup>206</sup>. Ces changements, nommés reprogrammation épigénétique, impliquent une altération de la méthylation de l'ADN, ou des modifications de l'acétylation et/ou de la méthylation des histones. Une hyperméthylation du promoteur du gène CDKN2A, codant pour la protéine suppresseur de tumeur p16, contribue à l'inactivation de l'allèle sauvage dans les cellules des cancers colorectaux, ayant déjà perdu un allèle par délétion<sup>209-210</sup>.

Enfin, des petits ARN non codants (miRNAs), connu pour réguler de nombreux processus biologiques dans les cellules souches comme le développement, la différenciation et le métabolisme, sont également susceptibles de jouer un rôle dans l'initiation et le développement de plusieurs cancers.

### **Mécanismes endogènes de défense contre les carcinogènes chimiques**

L'exposition d'un organisme à un carcinogène environnemental et son devenir, sont déterminés par de nombreux systèmes endogènes de défense déterminés génétiquement<sup>205</sup>. Les carcinogènes chimiques sont souvent transformés en métabolites moins toxiques, puis éliminés de l'organisme. Les dommages occasionnés à l'ADN peuvent être réparés, ou les cellules portant ces dommages éliminées par apoptose.

Consécutivement à leur absorption à travers la barrière intestinale, les xénobiotiques transitent par la veine porte et parviennent dans le foie où ils sont métabolisés par diverses enzymes essentielles pour la détoxification des xénobiotiques. Ces étapes sont à rapprocher de ce qui a été décrit pour le métabolisme des polyphénols.

Ces réactions de biotransformations sont groupées en deux phases, I et II. La phase I repose principalement sur les cytochromes P450 (CYPs) et inclut des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse et génère des groupes fonctionnels (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, SH). Dix-huit familles (1,2, 3..), 32 sous familles (A, B, C,...) et 50 gènes fonctionnels (1,2..) ont été recensés<sup>205</sup>. Parmi ces CYPs, seules les 3 premières familles sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Cette première étape n'accroît l'hydrophilicité des xénobiotiques que très légèrement et a surtout pour vocation de préparer les métabolites pour la phase II.

La phase II permet la liaison d'un ligand rendant généralement le xénobiotique plus polaire afin de faciliter son excrétion urinaire et biliaire. Cinq systèmes enzymatiques coexistent avec en chef de ligne les UDP-glucuronosyltransférases (UGTs) et les sulfotransférases (SULT) puis viennent les glutathion transférases, les N-acétyltransférases et les méthyltransférases,

qui catalysent le transfert respectivement de l'acide glucuronique, d'un groupe sulfate, du glutathion, d'un groupe acétyle ou d'un méthyle.

Dans certaines circonstances, l'excrétion des métabolites est assurée par diverses protéines de transport ATP-dépendantes comme la P-glycoprotéine codée par le gène multidrug résistance 1 (MDR1/ABCB1), les multidrug résistance protein 2 et 3 (MRP2/ABCC2 et MRP3/ABCC3) et la breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) <sup>211</sup>.

Ces phases de détoxification peuvent parfois générer des métabolites toxiques. L'équilibre entre toxicité et détoxification est parfois précaire, d'autant que les molécules conjuguées peuvent être relarguées via la bile puis réabsorbées (cycle entéro-hépatique) aboutissant à un temps de contact augmenté entre les métabolites et les cellules de l'organisme.

Un deuxième système de défense endogène est représenté par les systèmes de réparation de l'ADN. Ce système est strictement défini comme la réponse cellulaire associée à la réparation de la séquence d'ADN endommagée. Six voies majeures de réparation coexistent et sont la réparation par excision de base (base excision repair, BER), la réparation des mésappariements (Mismatch repair, MMR), la réparation par excision de nucléotides (nucleotide-excision repair, NER), la réparation par combinaison homologue (homologous recombination, HR), la réparation par jonction d'extrémités non homologues (Nonhomologous end joining, NHEJ) et la réparation directe de l'ADN (translesional synthesis, TLS) <sup>212</sup>. Des mutations de MSH2, MSH6, et MLH1 de la voie de réparation des mésappariements sont impliquées dans les formes sporadiques du cancer colorectal, mais également dans la forme héréditaire du syndrome de Lynch (hereditary non polyposis colorectal cancer, HNPCC) <sup>206</sup>.

### **Rôle du microenvironnement dans la carcinogénèse, acteur de la promotion**

En 2011, Bissel et Hines, exposaient une question fondamentale : Pourquoi n'avons-nous pas plus de cancer ? Cette question qui pourrait se voir provocatrice en tant que tel témoigne des recherches encore nécessaires pour comprendre toute l'étiologie du cancer. Ainsi, la probabilité d'abriter un cancer *in situ* ou dit "caché" augmente avec l'âge, et approche les 100% entre 50 et 70 ans pour un organe comme la glande thyroïdienne, alors que seulement 0.1% de la population développera un jour un tel cancer dans cette tranche d'âge <sup>213</sup>.

Comme évoqué précédemment, des mutations sont nécessaires à la tumorigénèse. Elles ne sont néanmoins pas suffisantes. Le rôle du microenvironnement contrôlant la progression tumorale est avancé <sup>214</sup>. Il est suggéré, dans le cas de cancers *in situ* que le microenvironnement entourant la tumeur fournirait des signaux suppresseurs tant que l'architecture et l'homéostasie tissulaire est contrôlée.

Une caractéristique largement étudiée de ce microenvironnement est l'inflammation chronique. Depuis les premières observations de Virchow qui a pu observer la présence de leucocytes dans les tissus tumoraux, suggérant que le cancer pourrait se développer à partir d'une inflammation chronique, de nombreux auteurs ont avancé l'hypothèse du rôle de l'inflammation chronique dans le développement des cancers. Cependant, il est difficile d'établir la part du processus inflammatoire souvent associé à la cancérogenèse.

L'inflammation est un processus naturel de défense de l'organisme contre une infection microbienne, ou d'autres stimuli toxiques, qui inévitablement mène à des dommages tissulaires<sup>215</sup>.

Il est bien établi que l'inflammation aigue joue un rôle protecteur essentiel dans le maintien de l'intégrité cellulaire et de l'organisme suite à une blessure ou une infection<sup>216</sup>. Cependant, et à l'inverse, une inflammation chronique a été associée à de nombreux effets nocifs. Les processus inflammatoires impliquent des interactions complexes et une régulation fine entre les médiateurs de l'inflammation et les voies enzymatiques associées. Dans les tumeurs, les leucocytes, principalement les macrophages et les lymphocytes, représentent 30 à 50% de la masse tumorale<sup>217</sup>. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM, tumeur associated macrophages) représentent les principales cellules immunitaires infiltrant les tumeurs. Elles ont été impliquées dans l'angiogenèse, l'invasion tumorale, et les métastases notamment dans le cancer colorectal<sup>218</sup>. Ces macrophages libèrent des chemokines ou des cytokines qui peuvent à leur tour sécréter tout un arsenal de cytokines, chemokines et métabolites de l'acide arachidonique et amplifier la réponse inflammatoire<sup>219</sup>

Ces différents médiateurs de l'inflammation peuvent activer les voies de transduction du signal et induire des changements dans les facteurs de transcriptions tel que Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), activator protein-1 (AP-1), nuclear factor of activated T cells, et Nuclear Factor-E2 related factor-2 (Nrf2) qui entraîne une réponse immédiate au stress cellulaire<sup>216, 220</sup>.

Les cellules impliquées dans l'inflammation peuvent aussi produire des radicaux libres et des métabolites réactifs communément appelés espèces réactives de l'oxygène (EROs). Ces espèces incluent le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Ces radicaux sont essentiels à la réponse immunitaire. Lors du processus inflammatoire, le métabolisme de l'acide arachidonique à partir des lipoxgénases ou des cyclo-oxygénases (COX II) participent à la formation de grandes quantités de radical superoxyde. Outre leur implication dans l'inflammation, de faibles niveaux sont essentiels pour plusieurs processus physiologiques comme la phosphorylation des protéines, l'activation de certains facteurs de transcription, la différenciation cellulaire ou l'apoptose<sup>221</sup>. Une grande variété de processus enzymatiques et non enzymatiques peuvent générer ces EROs<sup>216, 222</sup>. Parmi les plus importants, les enzymes nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate (NADPH) oxydase (NOX) et xanthine oxydase (XO) sont présentes dans de nombreuses cellules. Les premières se retrouvent dans les macrophages et polynucléaires neutrophiles et une fois activées, produisent des EROs.

Les EROs sont également produits naturellement lors du métabolisme de l'oxygène notamment dans les mitochondries. Ainsi, il est observé que 0.4% à 5% de l'oxygène serait converti en EROs (Reuter, 2010) suite à une fuite continue d'électrons. Cependant, ces EROs provoquent également des dommages oxydatifs sur l'ADN et les peroxy-nitrites entraînent aussi bien des dommages oxydatifs qu'une nitration sur les bases d'ADN. Ainsi, la majorité des mutations induites par les EROs semblent impliquer une conversion guanine ->

thymine (G-> T) <sup>223</sup>. Les EROs, ont été proposés comme éléments non pas fondateurs mais participant à la cancérogenèse, par leur contribution à l'instabilité génétique <sup>224</sup>.

Des systèmes enzymatiques comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (Cat) et la glutathione peroxydase (GPx) associée au glutathion ou le glutathion seul interagissent ensemble pour protéger les systèmes biologiques de la toxicité de ces radicaux libres <sup>225</sup>. Hormis ces systèmes endogènes de détoxification primaire, l'apport exogène d'antioxydants dans notre alimentation participerait à l'équilibre synthèse/destruction des EROs. Même si des désaccords persistent sur les mécanismes impliqués <sup>226</sup>, les flavonoïdes, les vitamines C et E et certains caroténoïdes comme le  $\beta$ -carotène contribueraient à la protection contre les effets délétères des EROs <sup>227-228</sup>.

Depuis plus d'une décennie, de nombreux travaux ont été effectués sur les mécanismes par lesquels le microenvironnement tumoral <sup>229-231</sup> peut promouvoir et même induire les tumeurs <sup>203</sup>. Le microenvironnement semble jouer un rôle déterminant et majeur dans la promotion tumorale. Dans ce contexte, il est concevable de penser que des composés qui pourraient freiner ou réduire ce stress oxydatif, et *in fine* rééquilibrer le microenvironnement seraient à même de réduire l'incidence du cancer.

## **II-5-2 Le cancer colorectal**

### **II-5-2-1 Incidence et mortalité du cancer colorectal**

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent au monde chez l'homme (Figure 15) et le deuxième chez la femme (Figure 16), avec près de 1.4 million de nouveaux cas en 2012 (WCRF), soit 10% de tous les cancers. La distribution géographique est remarquable et le mode de vie occidental apparaît comme le principal facteur associé. Les Etats Unis, l'Australie et l'Europe (Figure 17) présente l'incidence la plus élevée (>35 pour 100 000) alors que l'Afrique (Figure 17) possède l'incidence la plus faible (<5 pour 100 000). La mortalité est plus importante dans les régions les moins développées du monde. Néanmoins le taux de mortalité dans le monde varie moins que pour l'incidence avec les taux estimés les plus importants en Europe centrale et Europe de l'est (20 pour 100 000 chez les hommes) et les taux les plus bas en Afrique de l'ouest (3,5 pour 100 000 chez les hommes) (Figure 17).



Incidence

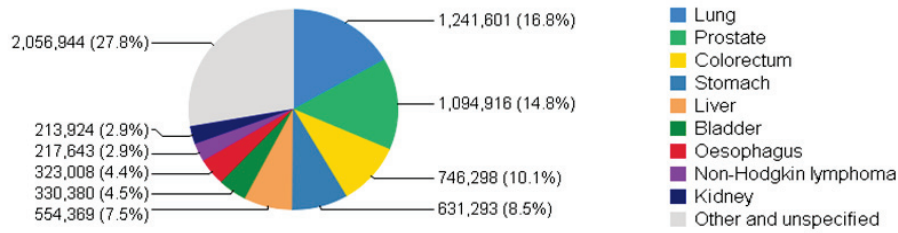


Figure 15 : Incidence dans le monde des principaux types de cancer chez l'homme <sup>232</sup>.

Incidence

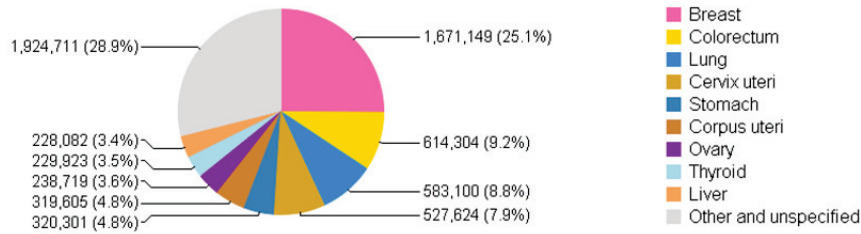


Figure 16 : Incidence dans le monde des principaux types de cancer chez la femme <sup>232</sup>.

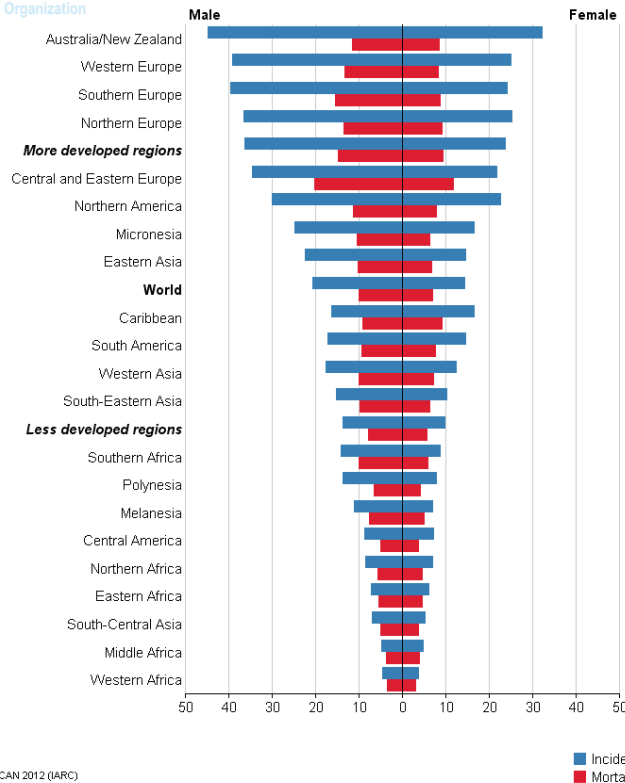


Figure 17 : Taux d'incidence et de mortalité standardisés selon l'âge chez l'homme et la femme selon les régions du monde <sup>232</sup>.

### **II-5-2-2 Changements histopathologiques associés au cancer colorectal**

La surface du gros intestin est recouverte d'un épithélium caractérisé par des invaginations, en forme de doigt dans le tissu conjonctif sous-jacent. Les cellules souches à la base de chaque invagination, nommée crypte, donnent naissance à différents types cellulaires comme les entérocytes, les cellules mucipares et les cellules entéro-endocrines. Ces cellules migrent de la base jusqu'au sommet des cryptes.

Parmi les différents types de lésions bénignes gastro-intestinales, un terme générique, polype, est donné à toutes les lésions protubérantes situées au-dessus de la muqueuse intestinale.

Les polypes de type adénomateux ont des caractéristiques histopathologiques variées. Hormis la taille souvent de 2 à 10mm, la morphologie peut être de type pédiculé, sessile ou semi-sessile. Le degré de dysplasie et l'architecture glandulaire varie et permet de distinguer au niveau microscopique, les adénomes tubuleux, villosités, festonnées ou mixtes. Les polypes adénomateux ou adénomes seraient les précurseurs des cancers colorectaux<sup>206</sup>. Les étapes essentielles au développement du cancer colorectal impliquent successivement la formation de foyers de cryptes aberrantes, de polypes adénomateux, puis de carcinomes<sup>208</sup>.

Cette séquence est étayée par des études épidémiologiques montrant un risque huit fois plus important de développer un cancer colorectal chez des patients n'ayant pas subi une résection des adénomes en comparaison à un groupe témoin pour lequel les adénomes ont été retirés<sup>206</sup>. Des études histopathologiques ont également montré que des foyers de type carcinome pouvaient être détectés au sein d'adénomes, notamment ceux de grandes tailles, dysplasiques et de type villosités. Enfin, les sujets atteints de polyposis adénomateux familial prédisposant au développement de centaines de polypes développent invariablement un cancer colorectal entre 30 et 50ans si le colon n'est pas retiré<sup>233</sup>.

### **II-5-2-3 Mécanismes moléculaires du cancer colorectal**

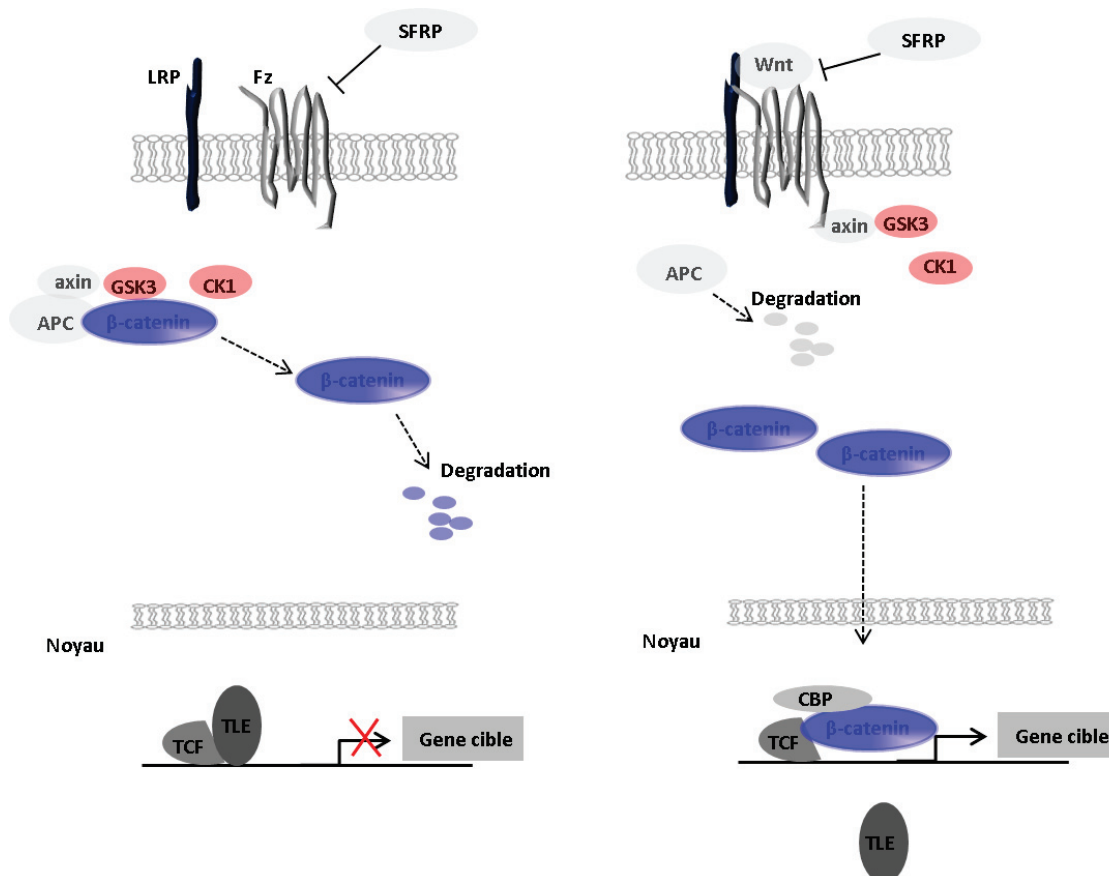
Le développement du cancer colorectal est un processus complexe. Les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes de la cancérogenèse ont permis de mettre en évidence le rôle de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux<sup>209, 234-237</sup>. Bien qu'il soit admis que 90% des cancers aient une origine environnementale, il est nécessaire de considérer l'interaction potentielle entre facteurs génétiques et environnementaux<sup>238-239</sup>.

Les facteurs génétiques comme la polyposis adénomateuse familiale (mutation du gène APC) et le syndrome de Lynch (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer, HNPC) ou les anomalies des gènes codants pour la réparation de l'ADN (MSH2, MSH6, MLH1 et MLH2) n'expliquent pas plus de 5% des cancers colorectaux<sup>240</sup>. Ces cancers surviennent généralement avant 40 ans.

Au-delà de ces formes familiales, des altérations somatiques jouent un rôle clef dans la majorité des cancers colorectaux. Aujourd'hui essentiellement 3 modèles génétiques de développement tumoral sont proposés. Une voie classique, (chromosomal instability pathway, CIN) retrouvée dans environ 70 à 85% des CCR, et caractérisée par des mutations sur les gènes APC, TP53, KRAS, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ . Une deuxième voie implique une inactivation des gènes de réparation de l'ADN, soit par mutation soit par

hyperméthylation de MLH1 (microsatellite instability, MSI pathway) et représentant environ 15% des CCR. Enfin, une voie qui recoupe en partie la précédente et implique une hyperméthylation des sites CpG (CpG islands) de promoteurs induisant l'extinction de gènes suppresseurs de tumeurs.

La voie génétique et de signalisation comme Wnt/APC/ $\beta$ -caténine est une voie majeure dans le développement du cancer colorectal <sup>206</sup>. Wnt est une famille de glycoprotéines impliquées dans l'embryogenèse et l'homéostasie des tissus adulte, notamment dans des cellules proches des cellules souches des cryptes intestinales. Lorsque ces glycoprotéines ne sont pas liées aux récepteurs Frizzled (FRZ), le complexe APC (*adenomatous polyposis coli*)/ Glycogène synthase kinase 3 (GSK3)/Caséine kinase 1 (CK1)/axine phosphoryle la  $\beta$ -caténine, menant ainsi à sa dégradation dans le protéosome. Cette dégradation empêche l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le noyau, permettant la transcription de facteurs partenaires (TGF), et aboutit à la différenciation cellulaire et l'homéostasie des cellules épithéliales coliques (Figure 18). La fixation de Wnt sur les récepteurs FRZ entraîne la dégradation du complexe et l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme puis sa translocation dans le noyau. La  $\beta$ -caténine, qui est un co-activateur transcriptionnel, active des gènes comme *myc*, le gène *CCND1* codant pour la cycline D et d'autres gènes qui permettent la prolifération cellulaire et la survie plutôt que la différenciation.



**Figure 18 :** Modèle fonctionnel de la voie métabolique APC / $\beta$ -caténine.

Des mutations dans la voie Wnt, comme APC, qui est la plus fréquente, GSK3 ou la  $\beta$ -caténine *per se*, sont des événements nécessaires à la transition des cellules prénéoplastiques en foyer de cryptes aberrantes ou atypiques (ACF)<sup>241</sup>. APC, en tant que suppresseurs de tumeurs, requiert que les 2 allèles soient touchés. Il est à noter que dans les polyposes adénomateuses familiales, seul un allèle est muté et le second est en général inactivé dans les 30 ou 40 premières années de la vie via la perte d'hétérozygotie (LOH)<sup>242</sup>.

Ainsi, il est ainsi classiquement admis que le cancer résulte d'un certain nombre d'altérations génétiques incluant des mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes. Cependant des mécanismes épigénétiques interviennent aussi dans de nombreux cancers et en particulier dans le cancer colorectal. Dans les cellules normales, les SFRPs (secreted frizzled-related proteins) fonctionnent comme antagoniste de la voie Wnt en entrant en compétition avec les protéines Wnt pour la liaison aux récepteurs FRZ. Une hyperméthylation anormale dans la région promotrice des gènes de la famille SFRP entraîne une perte de l'expression de ces protéines et une activation permanente de la voie Wnt<sup>210, 243</sup>.

Il est intéressant de noter qu'une accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine sans la présence de mutation APC ou d'un changement épigénétique, peut se produire via le signal pro inflammatoire du TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ )<sup>244</sup>. De même, l'activation du récepteur EP2 par la prostaglandine E2, produite durant l'inflammation aiguë et chronique augmente l'accumulation de ce co-activateur<sup>245</sup>. De nombreuses voies de signalisation de l'inflammation comme les voies NF- $\kappa$ B et Akt entretiennent l'activation de la  $\beta$ -caténine. Ces cancers colorectaux, associés à l'inflammation, se développent à l'inverse de ceux précédemment cités sans la formation de polypes, et font intervenir la voie NF- $\kappa$ B à la fois dans les cellules immunitaires et les cellules épithéliales, avec activation locale de plusieurs cytokines comme TNF $\alpha$ , interleukines IL-1, IL-6, IL-17 et IL-22<sup>206, 208, 246</sup>

Plusieurs autres voies sont susceptibles d'être dérégulées à un stade précoce (adénome) pour progresser vers le carcinome et vers des métastases. De plus, des mutations ultérieures avec une activation des oncogènes K-ras, ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme le TGF- $\beta$ , la p53 ou la protéine proapoptique Bax<sup>208</sup>.

#### **II-5-2-4 Principaux facteurs de risque associés au cancer colorectal**

En 1981, Doll et Peto ont suggéré que 60% des cancers aux Etats-Unis seraient attribuables à deux facteurs environnementaux : le régime alimentaire et le tabac<sup>50</sup>. Plus de 35 ans plus tard, ces estimations restent valides. Les facteurs de risque additionnels comprennent les risques professionnels, les radiations, l'alcool, la pollution, les infections et les facteurs reproductifs et socio-économiques.

Les études épidémiologiques sur le cancer colorectal ont pu mettre en évidence un certain nombre de facteurs de risque du CCR. Comme beaucoup de cancers, l'âge est un facteur important, et dans le cas du cancer colorectal, son incidence augmente à partir de 50 ans. et plus rapidement chez l'homme que chez la femme.

Hormis l'âge, le tabac, le surpoids, l'obésité, la consommation d'alcool, de viandes rouges et viandes transformées comme la charcuterie, sont les principaux facteurs qui ont été associés à une augmentation du risque de CCR<sup>51, 247</sup>.

A l'inverse, une alimentation riche en fruits et légumes, ainsi que la pratique d'une activité physique seraient associées à une diminution du risque<sup>51, 247-248</sup>.

## Facteurs de risques

### Tabac

Il a été estimé que 20% environ des cas de CCR sont liés à l'exposition au tabac<sup>249-250</sup> (IARC monography – 100E). Quatre méta-analyses ont montré une forte association entre le tabac et le cancer colorectal<sup>247, 249, 251-252</sup>. Parmi celle-ci, Liang et coll. ont trouvé un risque relatif (RR) de 1.17 pour une consommation de 20 cigarettes/jour et un RR de 1.38 pour 40 cigarettes /jour.

Plus de 7000 composés toxiques ont été identifiés dans la fumée de tabac et environ 50 appartiennent à plusieurs classes de composés carcinogènes, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les amines aromatiques, les nitrosamines (NOCs) et les amines hétérocycliques (AHCs). Dans le système circulatoire, ces composés peuvent être bioactivés par les enzymes de détoxification de phase I et conduire à la formation d'adduits avec l'ADN. De multiples voies métaboliques sont impliquées dans l'exposition au tabac et l'étiologie du CCR. Les composés aromatiques génotoxiques du tabac peuvent via la formation d'adduits, générer des mutations sur les gènes *KRAS*, *BRAF* et *MYC*. Des modifications épigénétiques de ces mêmes gènes peuvent également être induites. Des dérivés des nitrosamines comme la NNK (nicotine-derived nitrosamine ketone) augmentent la production intracellulaire d'EROs<sup>253</sup>. Ce stress oxydatif entraîne l'activation de voies impliquées dans l'inflammation comme la voie NF-κB, qui régule positivement l'expression de COX-2. La voie MAPK activée induit la formation des oncogènes C-myc ou AP1, menant à la prolifération cellulaire. Ces mécanismes pro inflammatoires contribuent ainsi à l'étape de promotion du CCR. La nicotine peut activer de multiples récepteurs membranaires comme le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, le récepteur adrénergique ou encore EGFR (epidermal growth factor receptor). L'activation de ces récepteurs mène à une régulation positive de l'inflammation, et de protéines métastatiques et une inhibition de l'apoptose, via COX-2, AP1, VEGF, BAD et BCL-2.

### Alcool

L'alcool est un facteur de risque majeur pour de nombreux cancers dont le cancer colorectal. Les non-buveurs ou buveurs occasionnels forment la catégorie de référence. Certains auteurs définissent une consommation légère ( $\leq 1$  verre/jour ou  $\leq 12.5$ g d'alcool), modérée (2-3 verres/jour ou 12.6 - 49.9g d'alcool) ou forte ( $\geq 4$  verres/jour ou  $\geq 50$ g d'alcool)<sup>254</sup>. De nombreuses études et méta-analyses ont associées une consommation modérée à forte d'alcool à un plus grand risque de cancer colorectal (RR=1.2 à 1.6)<sup>254-256</sup>.

Au niveau mécanistique, l'éthanol peut être métabolisé par trois enzymes, l'alcool déshydrogénase (ADH), la catalase et le CYP2E1. L'acétaldéhyde formé par l'ADH est métabolisé à son tour en acétate par l'acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH2)<sup>257-258</sup>. L'effet délétère provient de l'acétaldéhyde<sup>259</sup> et de la production d'EROs lors de ces phases de détoxification. Des peroxydations lipidiques, des mutations de bases d'ADN, des adduits d'ADN et des attaques sur certaines protéines peuvent mener à une inflammation via la libération entre autre de TNF- $\alpha$  et d'IL-6<sup>258</sup>.

## **Obésité**

Le surpoids et l'obésité sont définis comme une accumulation excessive de tissus adipeux. L'indice de masse corporelle (IMC) est le critère globalement accepté pour définir le surpoids et l'obésité. Le surpoids correspond à  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ , alors que l'obésité correspond à un  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ .

Les études épidémiologiques ont associé le surpoids et l'obésité à une augmentation du risque de développer différents types de cancer<sup>260</sup>, bien que les mécanismes inhérents à cette cancérogenèse varient selon le type<sup>261-262</sup>.

Il a été estimé que 11% environ des cas de CCR sont liés à l'obésité et au surpoids en Europe<sup>263</sup>. Avec plus de 20 méta-analyses, 5 revues et 113 études d'observations, il a été montré que l'obésité était associée à une augmentation du risque de 30 à 70% chez l'homme alors que les données sont plus contradictoires chez la femme<sup>263</sup>. Dans un rapport du WCRF en 2011, le risque augmenterait de 2-3% par unité croissante d'IMC<sup>264</sup>.

Les mécanismes qui interviennent dans l'association entre obésité et CRC sont complexes et impliquent les voies de l'insuline et de l'IGF-1, des adipokines, comme la leptine et l'adiponectine, mais également des facteurs de l'inflammation comme le TNF- $\alpha$ <sup>265-266</sup>. L'obésité perturbe le fonctionnement des adipocytes dans l'homéostasie énergétique, et ce déséquilibre aboutit à un syndrome métabolique associé à un processus inflammatoire et une altération des voies de signalisation de la leptine et de l'adiponectine. La libération croissante d'acides gras libres et de TNF- $\alpha$  et la baisse du taux d'adiponectine induit une résistance à l'insuline. L'hypersécrétion d'insuline consécutive au relargage important d'acides gras est le résultat d'une adaptation métabolique qui tend à augmenter le stockage et l'oxydation des acides gras libérés<sup>261, 267</sup>. La légère inflammation successive à la production anormale de cytokine incluant le TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 ou le MCP-1 par les adipocytes ou les macrophages et monocytes du tissu conjonctif semble ainsi jouer également un rôle dans le cancer colorectal, même si les études évaluant la relation directe entre ces marqueurs inflammatoires et le CCR ont montré des résultats ambigus<sup>268</sup>.

## **Viande rouge et viande transformée**

En 2011, le WCRF et l'AICR ont conclu qu'il y avait des preuves convaincantes que la viande rouge et la viande transformée augmentaient le risque de CCR<sup>264</sup>. Récemment, le CIRC a classé les viandes transformées comme cancérogène avéré (Classe 1) et la viande rouge comme probablement carcinogène pour l'homme (Classe 2A). Une récente méta-

analyse a montré une augmentation du risque de 17% pour chaque 100g de viandes rouges et de 18% pour chaque 50g de viandes transformées consommées par jour<sup>269</sup>.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour décrire l'association entre viande rouge et CCR. La viande est une source abondante d'acides aminés soufrés, comme la méthionine et la cystéine, et dans le cas de la viande transformée, une source de soufre inorganique utilisé comme conservateur<sup>270</sup>. Ces nutriments peuvent être à l'origine de la production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) par les bactéries colonique réductrices de sulfate (SRB, Sulphate reducing bacteria). En 2009, Rowan a postulé l'implication du sulfure d'hydrogène dans l'étiologie de la rectocolite ulcéro-hémorragique. D'autres auteurs ont également associés cette pathologie avec le risque de CRC via un processus inflammatoire impliquant H<sub>2</sub>S<sup>271</sup>. Le fer hémique peut également induire un stress oxydatif et pourrait initier la carcinogenèse via une peroxydation lipidique<sup>272</sup> et la formation endogène de nitrosamines<sup>273-275</sup>.

Les NOCs, AHCs et HAPs présents dans les viandes rouges possèdent une activité mutagène. Ces composés nécessitent une activation pour exercer leur mutagénicité, notamment via une N-acétylation (NAT2). Plus de 25 polymorphismes génétiques ont été identifiés et dans ce contexte, il a été montré que les populations inuit et japonaises, qui ont les fréquences les plus importantes pour un phénotype d'acétylation rapide, avaient un risque bien supérieur de développer un CRC, comparé aux populations d'Afrique du Nord qui présentent avec des fréquences importantes, un phénotype acétyleur lent<sup>239, 276</sup>. Enfin la présence de graisses saturées avec notamment un ratio n-6 : n-3 important (>10-30) augmente le risque de CCR. Ces graisses peuvent augmenter l'excrétion intestinale d'acides biliaires, qui, métabolisés par la flore colonique, seraient des agents promoteur du CCR<sup>240</sup>. De nombreuses études montrent qu'une perturbation de la relation hôte-flore microbienne, nommée dysbiose, est maintenant reconnu comme la cause d'un nombre grandissant de maladies, incluant notamment le cancer colorectal<sup>145, 207, 277-278</sup>.

A l'inverse du tabac, alcool, surpoids et obésité et consommation de viandes rouges et transformées, l'activité physique, les produits laitiers et la consommation de fruits et légumes auraient un rôle bénéfique et seraient inversement associés au risque de cancer colorectal.

## **Facteurs protecteurs**

### **Activité physique**

Les associations entre l'activité physique et le cancer ont fait l'objet de nombreuses méta-analyses<sup>279-280</sup>. Dans plusieurs études récentes, il a été montré que l'activité physique réduisait le risque de cancer du côlon de 20 à 25%<sup>281-282</sup>. Une réduction du risque de cancer du côlon et du cancer rectal de 16% et de 13%, respectivement, a été trouvée dans une méta-analyse sur 26 types de cancer et regroupant 12 cohortes avec plus de 1.4 millions de personnes<sup>283</sup>. Les bases biologiques de cette réduction de risque ne sont pas clairement élucidées. Plusieurs mécanismes associés aux voies de transduction de l'insuline mais aussi liés à l'inflammation ont été suggérés<sup>284</sup>. Il est également proposé que la sédentarité puisse avoir un impact sur le microbiote<sup>285</sup>.

## Les produits laitiers

Malgré certaines contradictions dans les résultats des études épidémiologiques, les produits laitiers semblent protéger contre le cancer colorectal <sup>248</sup>. Une récente méta-analyse regroupant 19 cohortes a montré une association inverse non linéaire entre l'apport de lait et le risque de cancer colorectal <sup>286</sup>. Une réduction du cancer du côlon de 9% est observée chez les hommes et les femmes pour un apport de 200g/jour de produits laitiers et de 17% pour un apport de 400g/jour.

Les produits laitiers pourraient protéger contre le cancer colorectal grâce à leurs importantes concentrations en calcium, micronutriments et autres constituant bioactifs. Des études épidémiologiques ont montré en parallèle des niveaux de preuves jugés probable pour le calcium <sup>287</sup>, possible pour la vitamine D <sup>264, 288</sup> mais plus limité pour le sélénium <sup>289</sup>.

Un mécanisme dépendant ou non du calcium serait impliqué. Le calcium pourrait entraîner une inhibition de la prolifération cellulaire, la promotion de la différenciation cellulaire et de l'apoptose <sup>290</sup> et la vitamine D3, ou plus particulièrement sa forme active, 1,25-dihydroxycholecalciferol, pourrait moduler les effets observés <sup>291</sup>. Au-delà de son rôle dans l'homéostasie calcique, la vitamine D peut directement ou indirectement réguler l'expression de 3 à 5% du génome <sup>292</sup> et est impliquée dans de nombreuses activités anti-prolifératives, anti-inflammatoires et anti-métastatiques <sup>291</sup>. De manière intéressante, un des mécanismes d'action de la vitamine D serait une inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténin <sup>293</sup>.

Hormis le calcium et la vitamine D3, des acides linoléiques conjugués, présents dans les produits laitiers, possèdent des propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrices <sup>294-296</sup>. L'acide butyrique, qui est présent dans le lait ou généré par la flore bactérienne intestinale suite à la consommation de produit laitiers, pourrait également participer aux effets bénéfiques des produits laitiers, par ses divers effets sur la fonction cellulaire <sup>297-298</sup>.

## Céréales complètes

La plupart des études épidémiologiques ont montré que l'apport en céréales complètes réduisait le risque de cancer colorectal. Une récente méta-analyse regroupant 25 études prospectives a montré une réduction du risque de CCR de 17% pour un apport important en céréales complètes <sup>299</sup>. Cependant, la définition exacte des céréales complètes est une étape critique pour une évaluation entre l'apport en céréales complètes et le risque de cancer. Aujourd'hui, il n'y a pas de définition acceptée au niveau international <sup>300</sup>. Les céréales complètes sont une source de nombreux composés potentiellement bénéfiques pour la santé avec des composés comme les polyphénols, les caroténoïdes ou la vitamine E, des folates, des minéraux comme le zinc, le sélénium ou le manganèse et des fibres <sup>301</sup>. Le WCRF et l'AICR ont estimé que l'apport en fibre protégeait du CCR avec un niveau de preuves convaincant <sup>264</sup>. Pour améliorer la justesse de mesure de l'exposition aux céréales complètes, des biomarqueurs comme les alkylrésorcinolins, ont été développés <sup>302-303</sup> et dans une grande étude nichée cas-témoins il a été montré qu'une concentration plasmatique élevée en alkylrésorcinolins était associée à une réduction du risque de cancer du côlon distal <sup>304</sup>.



Les mécanismes proposés suggérant un effet protecteur des céréales complètes sont liés notamment à leur teneur élevée en fibres. Cependant, une étude épidémiologique a pu montrer que la réduction du risque de cancer colorectal par l'apport en fibre dépendrait de la source alimentaire de ces fibres <sup>299</sup>. Une alimentation riche en fibres est associée à la production d'acides gras à chaîne courte (acétate, propionate et surtout butyrate) par le microbiote qui réduiraient le risque de développement tumoral par une action anti-inflammatoire et par une régulation du métabolisme énergétique cellulaire <sup>207, 305-306</sup>. Malgré des niveaux de preuve plus limités <sup>228, 307-308</sup>, les composés phytochimiques des céréales pourraient participer aux effets bénéfiques observés grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-prolifératives et à une action inhibitrice sur les tumeurs coliques <sup>309</sup>.

## Fruits et légumes

Un rapport du WCRF de 1997 concluait avec des preuves convaincantes qu'un apport important de légumes réduirait le risque de nombreux cancers, dont le cancer colorectal. Pour ce dernier, des preuves plus limitées et contradictoires étaient apportées pour une consommation importante de fruits. En 2007, puis en 2011, le WCRF révisait le précédent rapport et concluait que les fruits mais aussi les légumes réduisaient le risque de cancer colorectal mais avec un niveau de preuves limité <sup>264</sup>. Une récente méta-analyse a montré une relation non linéaire entre consommation de fruits et légumes et l'incidence du cancer colorectal <sup>310</sup>. Dans 21 études de cohortes, la moitié d'entre elles ont montré de faibles associations inverses avec le risque alors que les autres études n'ont pu montrer la moindre association <sup>248</sup>.

Malgré ces niveaux de preuve limités, les fruits et légumes restent un objet de recherche majeur de par leur richesse en composés potentiellement anti-carcinogènes. Il est notamment nécessaire de déterminer si les bienfaits d'une alimentation riche en fruits et légumes sont le résultat d'une diminution d'exposition à des substances délétères ou bien à une synergie d'action entre les divers constituants présumés protecteurs comme les caroténoïdes, polyphénols, ou encore des acides gras polyinsaturés oméga 3. Parmi ces composés retrouvés dans les fruits et légumes, les antioxydants, comme les caroténoïdes avec le  $\beta$ -carotène ou le lycopène, la vitamine C et la vitamine E possèdent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Des mécanismes impliquant une inhibition de la prolifération cellulaire, une réduction de l'inflammation et une activité pro-apoptotique sont également proposés <sup>311-313</sup>.

Le sélénium, pour son rôle dans les selenoenzymes, est également associé comme nutriment antioxydant. Les légumes et en particulier ceux de la famille des Brassicaceae comme les choux de Bruxelles ou le brocoli, contiennent des glucosinolates (hétérosides soufrés), qui peuvent être métabolisés en isothiocyanates (ITCs) ou indole-3-carbinol par le microbiote. A l'inverse du soufre inorganique ou des acides aminés soufrés de la viande rouge ou transformées, ces nutriments soufrés possèdent des propriétés anticancéreuses via plusieurs mécanismes possibles comme l'inhibition de cytochrome P450, l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la modulation de l'inflammation et la suppression de l'angiogenèse <sup>314-315</sup>.

Néanmoins, les études épidémiologiques ont montré des résultats contradictoires et des méta-analyses récentes d'études de cohortes ont largement relativisé le niveau de preuve des effets protecteurs de ces composés<sup>248, 307, 316</sup>.

Les polyphénols constituent l'une des principales classes de composés bioactifs qui pourraient jouer un rôle protecteur contre les cancers et en particulier le cancer colorectal. Les premières études épidémiologiques ont porté principalement sur quelques flavonoïdes ou aliments<sup>317-320</sup>. Les flavonols comme la quercétine, le kaempférol et l'isorhamnétine, les flavones comme l'apigénine et le lutéoline et des boissons comme le thé ont été examinés et ces quelques polyphénols ou boissons ont focalisé l'attention des chercheurs pendant plusieurs années. Ce biais dans le choix de ces quelques polyphénols, est depuis corrigé, et il est aujourd'hui nécessaire d'explorer le rôle d'un plus grand nombre de polyphénols connus aujourd'hui dans les aliments afin d'obtenir une image plus complète de leurs effets sur la santé et plus particulièrement le risque de cancers.

## **II- 5- 3 Les polyphénols et la prévention du cancer colorectal**

### **II-5-3-1 Epidémiologie du cancer colorectal**

#### **Mesure de l'apport en polyphénols par des questionnaires alimentaires**

Plusieurs études cas-témoins ont trouvé des associations inverses entre l'apport de plusieurs sous classes de flavonoïdes et risque de cancer colorectal. Dans une étude canadienne, les phytoestrogènes, comme les lignanes et les isoflavones, ont été associés à une réduction du risque de 27% et 29% respectivement<sup>321</sup>. Une association inverse comparable et non linéaire a été trouvée dans une étude japonaise entre un apport en isoflavones et le risque d'adénomes colorectaux<sup>322</sup>. Le risque était plus marqué chez les femmes que chez les hommes. Un possible effet oestrogénique a été proposé. Toujours dans des études cas-témoins, il a été montré une association inverse avec le cancer colorectal pour les isoflavones, les anthocyanidines, les flavones et les flavonols<sup>323</sup>, les flavonols, la quercétine, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et les procyanidines<sup>324</sup>, la quercétine<sup>325-326</sup>, les proanthocyanidines<sup>327</sup>. Une seule étude conduite en Espagne a montré une association inverse avec la consommation de flavonoïdes totaux<sup>5</sup>. Ces associations ont pu être confirmées dans des méta-analyses<sup>43, 328</sup>. A l'inverse la majorité des études de cohortes ne retrouvent pas ces associations inverses<sup>4, 6, 43-44, 328-329</sup>. Dans 2 études de cohortes, il a été cependant trouvé une association inverse entre l'apport en catéchine et le risque de cancer rectal<sup>330-331</sup>. De manière intéressante, une étude de cohorte chez les femmes ménopausées asiatiques a pu montrer une réduction du risque de cancer colorectal par l'apport de produits à base de soja, alors que cette association n'a pas été observée en considérant l'apport en isoflavones<sup>332</sup>.

Ces différentes données épidémiologiques, témoignent d'une certaine incohérence quant aux résultats observés. Les études de cohortes réalisées à partir de questionnaires alimentaires montrent généralement une absence d'association alors que les études cas-témoins semblent

indiquer un effet protecteur par réduction du risque de certaines sous classes ou certains polyphénols <sup>43</sup>. Ces différences entre les deux types d'études sont communément décrites. Les études prospectives seules permettent d'éviter divers biais de sélection ou confusion fréquemment rencontrés dans les études cas-témoins pour démontrer d'éventuelles associations <sup>44, 329</sup>.

### **Mesure de l'exposition aux polyphénols par des biomarqueurs**

Les biomarqueurs des polyphénols pourraient remplacer ou compléter la mesure de l'exposition aux polyphénols classiquement évaluée par les questionnaires alimentaires, et améliorer la fiabilité de la mesure. Les études épidémiologiques réalisées grâce à des biomarqueurs sont encore peu nombreuses, et limitées à quelques polyphénols spécifiques comme les phytoestrogènes ou à une sous-classe de polyphénols comme les isoflavones ou les acides phénoliques issus du métabolisme colique microbien.

Deux études prospectives utilisant des biomarqueurs appartenant à certaines classes de polyphénols ont été réalisées. L'une d'elle n'a trouvé aucune association entre les concentrations en phytoestrogènes urinaires ou plasmatiques et le risque de cancer colorectal <sup>48</sup>. Une deuxième a montré une association inverse entre les concentrations urinaires de 2 flavan-3-ols, la (-)-EGC et la 4'-MeEGC et le risque de cancer colorectal <sup>333</sup>.

Dans une étude cas-témoins, une association inverse a été trouvée entre les concentrations plasmatiques d'entérodiol et le risque d'adénomes colorectaux <sup>334</sup> alors que les mêmes auteurs n'ont trouvé aucune association dans une étude nichée cas-témoins entre les concentrations plasmatiques d'enterolactone ou d'entérodiol et le risque de cancer colorectal <sup>49</sup>.

### **II-5-3-2 Etudes d'intervention**

Les études cliniques sont peu nombreuses <sup>42, 335</sup>. Une étude d'intervention randomisée de 12 mois avec des protéines de soja pour une teneur de 83 mg en isoflavones chez des sujets porteurs de polypes adénomateux n'a pas réduit la prolifération des cellules épithéliales du côlon et a même augmenté la prolifération cellulaire au niveau du sigmoïde <sup>336</sup>. A l'inverse, une étude chez le rat a suggéré un effet protecteur <sup>337</sup>. Dans une petite étude sur 5 patients atteints de polypose adénomateuse familiale, et recevant par voie orale 3 fois/jour 480mg de curcumine et 20mg de quercétine, il a été observé une diminution de la taille et du nombre de polypes de 60 et 50%, respectivement <sup>338</sup>. La curcumine a été étudiée chez des fumeurs atteints d'un minimum de 8 foyers de cryptes aberrantes. Une diminution de ces ACF a été observée pour une prise de 2 ou 4g de curcumine par jour pendant 1 mois. <sup>339</sup>. Chez 126 patients atteints de cancer colorectal un traitement à la curcumine (360mg) 3 fois/jour pendant 10 à 30 jours induit une surexpression de la p53 et de la voie de l'apoptose <sup>340</sup>. Enfin, chez 87 patients ayant subi une résection de polypes ou de tissu tumoral colique, un traitement quotidien par un mélange de flavonoïdes contenant 20mg d'apigénine et 20mg d'(+)-épigallocatechine gallate durant 3 ou 4 ans, réduit la récurrence de néoplasie du côlon <sup>341</sup>.

### II-5-3-3 Mécanismes d'action

Comme décrit dans le chapitre II-4, la littérature sur les activités biologiques des polyphénols est considérable et ce chapitre consacré au cancer colorectal ne se veut exhaustif.

De nombreuses voies de signalisations liées à la détoxification (GSTs, UGTs), au stress oxydatif (Nrf2), à l'oncogenèse (C-myc,  $\beta$ -caténine), au cycle cellulaire (AP-1, p53, p16, p21), à l'apoptose (p53, BCL-2, caspase), à la prolifération cellulaire (AP-1,  $\beta$ -caténine, ERK, AKT), à la signalisation hormonale (EGFR, insuline), à l'inflammation (NF- $\kappa$ B, AP-1, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) et à des mécanismes épigénétiques seraient les cibles potentielles des polyphénols pour expliquer leurs effets contre la carcinogénèse colorectale<sup>250, 342-347</sup>

Parmi ces différentes cibles, les facteurs de transcription jouent un rôle prépondérant dans le processus du maintien de l'inflammation chronique, mais auraient également un rôle dans l'initiation et la progression. L'expression de facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, STAT3, Wnt/ $\beta$ -caténine, FoxM1, HIF-1 $\alpha$  et AP1 est souvent perturbée dans les cancers et ces facteurs constituent des cibles potentielles<sup>342</sup>.

Les mécanismes d'action possibles des polyphénols dans la prévention du cancer colorectal ont été évalués par de nombreuses études *in vitro* et chez l'animal, mais le plus souvent, seuls quelques polyphénols ou denrées alimentaires ont été étudiés. Parmi les flavonoïdes, les flavan-3-ols, avec en particulier les (épi)catéchines, l'épigallocatechine gallate, ou le thé vert comme source majeure de ces flavan-3-ols<sup>348-349</sup> ont reçu une attention particulière dans l'étude de différents types de cancers et notamment du cancer colorectal<sup>350-357</sup>.

Le facteur de transcription pro-inflammatoire, NF- $\kappa$ B, est fréquemment activé dans de nombreuses cellules tumorales<sup>358-360</sup>. Les données suggèrent un effet antiprolifératif du thé vert par une inhibition de Cox-2 via la voie NF- $\kappa$ B. L'inhibition de cette voie a été montrée dans des études *in vitro* sur des lignées cellulaires tumorales de côlon par l'EGCG<sup>350-351</sup>. La néoplasie intestinale ou la formation de foyers de cryptes aberrantes (ACF) est inhibée dans des modèles murins via la voie  $\beta$ -caténine/APC<sup>353-356</sup>. Des voies impliquant l'AMPK<sup>352</sup> et l'apoptose<sup>361-362</sup> ont également été impliquées.

Des études sur des lignées cellulaires tumorales du côlon exposées à des concentrations physiologiques d'EGCG et de butyrate, ont montré une activité pro-apoptotique et une induction de l'arrêt du cycle cellulaire par des mécanismes épigénétiques<sup>363</sup>.

Le facteur de transcription Nrf2 (NF-E2-related factor) est largement exprimé dans les tissus et a un rôle majeur dans le contrôle de la détoxification des xénobiotiques électrophiles et d'oxydants et dans la protection contre l'inflammation<sup>364</sup>. L'EGCG stimule la voie de signalisation Nrf2 et augmente l'expression d'UGT1A dans des cellules cancéreuses du côlon dans un modèle murin<sup>1</sup>.

HIF-1 $\alpha$  est un facteur de transcription important dans la croissance tumorale, angiogénèse et l'apoptose. L'EGCG supprime l'accumulation de la protéine HIF-1 $\alpha$  en bloquant les voies PI3K/AKT et ERK1/2<sup>365</sup>.

D'autres flavan-3-ols ont été étudiés, et les procyanidines de haut DP inhibent la croissance cellulaire dans plusieurs types de cellules tumorales du côlon, probablement via la voie PI3K/AKT<sup>366</sup> et montrent un effet pro-apoptotique<sup>367</sup>.

Ces différents mécanismes observés avec les extraits de thé et/ou l'EGCG ne sont pas spécifiques de ces molécules. Des effets similaires ont été décrits pour d'autres polyphénols. Les flavonols avec la quercétine, le kaempférol ou l'isorhamnétine ont été très étudiés dans de nombreux modèles murins ou lignées cellulaires humaines. Dans le cas particulier du cancer colorectal, l'arrêt du cycle cellulaire<sup>368</sup>, l'apoptose via l'activation de la caspase-3<sup>369-372</sup>, ou la voie p38<sup>373</sup>, l'inhibition de la prolifération cellulaire via les voies ERK et PI3K/AKT<sup>374</sup>, l'inhibition de la différenciation cellulaire<sup>375</sup> ou de la formation d'ACF<sup>376</sup> et enfin l'inhibition de l'inflammation et la voie  $\beta$ -caténine<sup>377</sup> ont été proposés.

Les isoflavones comme la génistéine ou la daidzéine ont reçu plus d'attention pour des cancers hormono-dépendants comme le cancer du sein. Dans le cas du cancer colorectal, la génistéine inhibe la prolifération cellulaire et active l'apoptose via la voie mitochondriale<sup>378</sup>. Elle inhibe également l'angiogenèse et supprime les métastases tumorales du côlon dans un modèle murin<sup>379</sup>. D'autres études *in vitro* ont montré que les effets de la génistéine et/ou la daidzéine pourraient impliquer les voies Wnt et NF- $\kappa$ B<sup>3, 380</sup>. Enfin, l'interaction de la quercétine et de la génistéine via les récepteurs ER- $\beta$  a été trouvée<sup>381</sup>.

Les flavanones ont été étudiées et une induction de l'apoptose par la naringénine<sup>382</sup> et une activité antiproliférative de l'hespérintine<sup>383</sup> contre des tumeurs du côlon induites chimiquement ont été décrites.

Les acides phénoliques ont été également étudiés. A titre d'exemple, l'acide gallique<sup>384</sup> et l'acide caféique<sup>385</sup> induisent l'apoptose de cellules tumorales du côlon.

Le resveratrol a été plus largement étudié. Dans différentes lignées tumorales du côlon, il peut induire l'apoptose via les caspase-8 et -3<sup>386</sup> ou par surproduction d'EROs<sup>387</sup> même si d'autres auteurs ont plutôt considéré une inhibition des topoisomérases et une activation de la kinase ATM qui déclenche une apoptose dépendant de la p53<sup>388</sup>. Le resveratrol pourrait empêcher la formation et la croissance tumorale en inhibant l'expression de Kras<sup>377</sup>. Les études *in vitro* sont majoritairement réalisées à partir d'aglycones et une étude intéressante montre un effet synergique des glucuronides du resvératrol dans une induction des dommages à l'ADN et une apoptose des cellules tumorales de côlon<sup>2</sup>. Pour finir, quelques composés moins fréquents dans l'alimentation ont été étudiés. A titre d'exemple, une étude *in vivo* a montré que la phlorétine inhibe la croissance tumorale cellulaire du côlon en inhibant notamment le transporteur de glucose 2 (GLUT2)<sup>389</sup>.

## II-6 Les méthodes et outils analytiques pour mesurer l'exposition aux polyphénols à l'aide de biomarqueurs

### II-6-1 Prétraitement de l'échantillon

L'analyse des polyphénols dans les denrées alimentaires a reçu au cours des 30 dernières années beaucoup d'attention et a été largement discutée <sup>75</sup>. Les méthodes de préparation de l'échantillon, son extraction et l'analyse des polyphénols, après l'éventuelle libération de l'aglycone par hydrolyse chimique ou enzymatique et les diverses méthodes de détection sont sources de variabilité importante et génèrent des imprécisions dans les mesures. Néanmoins même si un consensus général sur des procédures optimales a pu se dégager <sup>75</sup>, des procédures standardisées sont toujours requises <sup>76</sup>.

Dans les plantes, l'extraction liquide-liquide et l'extraction en phase solide (SPE) sont les 2 principales techniques pour extraire ces composés. De par leur diversité structurale, une méthode d'extraction unique ne suffit pas à extraire ces composés aux propriétés physico-chimiques très différentes. La nature du solvant, la température, le pH, le nombre d'extractions et le volume de solvant, et la taille des particules dans l'échantillon sont des facteurs qui influencent l'efficacité de l'extraction <sup>76, 390</sup>.

Sur la base des méthodes développées sur les aliments, l'analyse des polyphénols dans les matrices biologiques a progressé rapidement sans une pleine considération de l'efficacité analytique <sup>75</sup> et le développement d'instruments analytiques hautement spécifiques ne peut compenser une procédure d'extraction inefficace. La mesure juste et précise des polyphénols dans les échantillons biologiques est nécessaire et de nombreux défis demeurent <sup>391</sup>

Dans les fluides biologiques, les polyphénols existent sous des formes différentes de celles observées dans les tissus des végétaux. Ils sont habituellement présents sous forme conjuguée, Les standards de ces formes conjuguées sont difficilement disponibles et leur quantification requiert une hydrolyse préalable pour former les aglycones. L'hydrolyse des conjugués glucuronidés et sulfatés est réalisée par voie chimique ou enzymatique. Une hydrolyse chimique repose sur une hydrolyse acide ou basique. Pour l'hydrolyse acide, les échantillons sont souvent traités avec de l'acide chlorhydrique 2M pendant 15 min à 95°C <sup>75</sup>. Malgré une bonne reproductibilité, ces conditions d'hydrolyse peuvent donner lieu à des pertes de polyphénols par dégradation ou dérivatisation. L'hydrolyse enzymatique est une méthode plus douce et plus spécifique, et est généralement préférable. Les enzymes communément utilisées sont des mélanges de  $\beta$ -glucuronidase et de sulfatase d'*Helix pomatia*, à différents degrés de purification. D'autres sources sont rapportées avec des  $\beta$ -glucuronidases et des sulfatases de mollusques comme *Patella vulgata* ou des  $\beta$ -glucuronidases de Bovin. Des aryl-sulfatases d'*Aerobacter aerogenes* ou des  $\beta$ -glucuronidases recombinantes d'*Escherichia coli* sont également utilisées. Les  $\beta$ -glucuronidases et sulfatases de ces différentes sources présentent des capacités d'hydrolyses très différentes pour un même métabolite. <sup>392-393</sup>.

Pour une même préparation enzymatique, et dans des conditions d'hydrolyse données, la cinétique d'hydrolyse est remarquablement variable selon les métabolites concernés. Il est impératif, au-delà du choix de la source d'enzyme, d'optimiser les paramètres d'hydrolyse pour la quantité d'enzymes, les temps d'incubation, et le pH, afin d'obtenir le meilleur compromis et des rendements d'hydrolyses maximaux pour la majorité des composés. Il est également important de noter que dans le cas des polyphénols, des contaminants sont susceptibles d'être présents dans ces préparations enzymatiques comme *H. pomatia*. Ces différents aspects semblent être sous-estimés par bon nombre d'auteurs<sup>394</sup>.

Une fois l'aglycone libéré, une ou des étapes d'extraction ou de purification sont réalisées afin d'éliminer les protéines, lipides, sels et autres composés susceptibles d'interférer avec la séparation chromatographique, ou colmater la colonne et réduire la vie de celle-ci dans le cas de séparation par HPLC ou UPLC. Ces étapes de purification sont également nécessaires afin de diminuer les interférences lors de la détection finale en fonction des méthodes de détection utilisées. Deux principales méthodes d'extraction sont utilisées : l'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction en phase solide (SPE). Cette dernière reste la méthode pour laquelle de nombreux développements techniques sont proposés<sup>395</sup>.

L'extraction liquide-liquide est une technique flexible qui repose sur la séparation des composés selon leur solubilité dans deux solvants non miscibles, avec habituellement une phase aqueuse et une phase organique. Dans le cas des polyphénols, l'acétate d'éthyle est le solvant le plus utilisé. D'autres solvants comme le méthanol, l'acétonitrile ou l'acétone, peuvent être utilisés pour précipiter les protéines (PPT). La LLE et la PPT sont cependant sujets à des limitations comme une faible sélectivité et des effets de matrice en LC-MS<sup>396</sup>.

La deuxième méthode fréquemment utilisée repose sur l'extraction en phase solide (SPE). La SPE est une technique basée sur le même principe que la séparation par affinité en chromatographie liquide. Classiquement, la SPE présente de nombreux avantages comme l'élimination des contaminants/interférents et une concentration de l'échantillon. Les différentes phases stationnaires disponibles donnent une certaine sélectivité, mais selon les différentes propriétés physico-chimiques des métabolites d'intérêts, ces phases ne sont pas toujours adaptées et des développements importants avec l'utilisation de plusieurs phases peuvent être nécessaires<sup>397</sup>. La SPE est une technique qui est utilisée pour sa capacité à éliminer les effets de matrice. Cependant la SPE peut aussi conduire au relargage de polyéthylène glycols (PEGs) et de phtalates dans l'échantillon<sup>398</sup>. A l'inverse de la LLE ou de la PPT, où les développements techniques sont limités<sup>395</sup> de nouvelles approches ont été proposées pour améliorer les performances des SPE. Parmi ces avancées, on notera la MISPE (molecularly imprinted polymer SPE), la dSPE (dispersive solid phase extraction) plus connu sous le nom de QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), la DPX (disposable pipette extraction), la MEPS (microextraction by packed sorbent), la SPME (Solid phase micro-extraction), la SBSE (stir bar sorptive extraction) et l'OLSPE (On-line solid phase extraction)<sup>395, 399</sup>. Ces différentes techniques ont été employées avec succès sur certains métabolites mais encore assez peu sur les polyphénols<sup>395</sup>.

La plupart de méthodes proposées pour l'analyse des polyphénols repose sur la PPT, LLE ou SPE. Elles ont été utilisées avec succès dans les matrices urinaire ou plasmatique pour des polyphénols appartenant à certaines classes ou sous classes comme les flavonols, flavones,

isoflavones et les acides phénoliques. Ces méthodes ont été souvent appliquées dans le cadre d'études d'intervention visant à étudier le métabolisme de polyphénols ou leurs effets sur le métabolisme, en réponse à un apport en polyphénols. Les limites de quantification de telles méthodes appliquées à la mesure de concentrations relativement élevées, ne sont donc pas toujours pertinentes pour les études épidémiologiques où les niveaux d'exposition aux polyphénols propres à la consommation habituelle de régimes alimentaires sont souvent nettement plus bas.

Les procédures d'extraction des polyphénols, avec ou sans hydrolyse, sont basées sur la LLE<sup>400-403</sup>, la PPT<sup>404-408</sup>, la SPE<sup>402, 404, 409-418</sup>, mais encore assez rarement sur ces différentes variantes de la SPE notamment l'OLSPE<sup>419</sup>.

Cette technique améliore la sélectivité et la sensibilité. Deux types de colonnes OLSPE sont disponibles commercialement. La RAM (restricted access material) et la TFC (turbulent flow chromatography). Le principe de ces colonnes repose sur l'élimination des molécules de haut poids moléculaire comme les protéines. Les colonnes RAM sont caractérisées par des mécanismes hydrophile/hydrophobe, échanges d'ions, ou d'exclusion et peuvent être utilisées comme pré-colonnes pour l'injection directe d'échantillons biologiques. Les colonnes TFC permettent également une injection directe de l'échantillon, sans extraction préalable, ni prétraitement. Les colonnes TFC sont de faible diamètre (0.5 ou 1mm) et greffées avec de grosses particules (20-60µm). Des débits de solvant élevés génèrent des turbulences et favorisent la diffusion des molécules de faible poids moléculaire dans les pores des particules tout en éliminant rapidement les protéines. Ces techniques simplifient la préparation de l'échantillon et augmentent le débit d'analyse.

Des méthodes ont néanmoins été développées pour des études épidémiologiques, toujours pour certaines classes ou sous classes de polyphénols avec des procédures assez similaires<sup>420-421</sup> mais avec des prises d'échantillons parfois importantes<sup>422-423</sup>.

## II-6-2 Plateformes analytiques

Par analogie avec les méthodes d'extraction et de purification, les méthodes analytiques pour l'identification et/ou la quantification des polyphénols seront surtout fonction du type d'échantillon et des concentrations attendues. Les plateformes analytiques pour l'identification et/ou la quantification de polyphénols présents dans des denrées alimentaires ou dans des fluides biologiques peuvent être communes<sup>424-425</sup>. Cependant dans le cas de l'analyse des aliments, les concentrations attendues sont généralement assez importantes d'autant que la quantité possible d'échantillons utilisés peut être conséquente et n'est en théorie pas un facteur limitant. De même, l'analyse des polyphénols dans les fluides biologiques pour des études d'intervention ne nécessite pas des instruments très sensibles. En épidémiologie, les méthodes analytiques pour la quantification dans des fluides biologiques répondent à plusieurs critères essentiels que sont les concentrations attendues, le nombre d'échantillons à analyser et le volume disponible d'échantillons.

Diverses méthodes analytiques peuvent être utilisées pour quantifier les polyphénols. Les deux principales reposent sur une séparation chromatographique suivie d'une détection des



analytes par détection spectroscopique (en UV-visible grâce à des détecteurs à barrettes de diodes) ou détection spectrométrique (par spectrométrie de masse).

De ces deux méthodes, la spectrométrie de masse reste la méthode de choix pour sa sensibilité et spécificité<sup>426-427</sup>. Tous les procédés de spectrométries de masse reposent sur la séparation des molécules ionisées en fonction de leur masse et charge, dans des champs électromagnétiques. Cela implique une étape préalable d'ionisation des molécules à analyser. Brièvement et de façon classique un spectromètre de masse comprend 3 parties.

-Une source, enceinte au sein de laquelle les ions sont formés à partir de l'échantillon vaporisé.

-Un analyseur qui sépare chacune des espèces ioniques qui sort de la source en fonction du rapport entre sa masse ( $m$ ) et son nombre de charge ( $z$ ). Chaque ion détecté se voit donc attribuer un rapport  $m/z$  caractéristique.

-Un détecteur qui mesure, en fonction des différentes valeurs de ( $m/z$ ), l'intensité du signal qui leur correspond.

Malgré la spécificité de détection de la spectrométrie de masse, un couplage chromatographique est souvent nécessaire afin d'améliorer la sensibilité et spécificité des mesures. Une séparation des métabolites d'intérêt est un prérequis pour toute analyse quantitative. La séparation chromatographique par UHPLC reste la technique majeure pour sa grande résolution analytique<sup>428-430</sup>. La séparation par chromatographie gazeuse, mais également par électrophorèse capillaire (CE) est possible mais moins fréquente pour la séparation des polyphénols dans des matrices biologiques.

Différentes méthodes d'ionisation sont rencontrées et expliquent le large spectre de détection. Des méthodes conventionnelles directes comme l'ionisation électronique (EI) ou l'ionisation chimique (CI) sont appliquées lorsque la technique séparative est la chromatographie gazeuse (GC). Des méthodes d'ionisation indirectes, plus douces, comme l'ionisation par électrobulbion (ESI) ou l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) sont utilisées en couplage avec la chromatographie en phase liquide (HPLC et UPLC).

Il existe de nombreux types d'analyseurs comme le quadripôle (Q), la trappe ionique (IT), l'analyseur à temps de vol (ToF), l'Orbitrap et le spectromètre de masse à résonance cyclotronique d'ion (FT-ICR). Les analyseurs peuvent être couplés (MS-MS et MS<sub>n</sub>) pour faire de la spectrométrie de masse à plusieurs dimensions. Les couplages sont nombreux avec par exemple les triples quadripôles (QqQ), le quadripôle couplé à une trappe ionique (Qtrap) ou à un analyseur à temps de vols (QToF) pour n'en citer que quelques-uns.

### **II-6-3 Instrumentation utilisée dans cette thèse**

Nous avons utilisé pour ce projet un spectromètre de masse de type Qtrap (AB Sciex, QTRAP 5500) couplé à un chromatographe liquide à ultra haute pression (UHPLC 1290 - Agilent). Le spectromètre de masse de type Qtrap a été utilisé en mode triple quad pour la quantification des polyphénols dans les matrices urinaires et plasmatiques. Le triple quad est un appareil basse-résolution (résolution ( $m/z$ ) unitaire) et est l'instrument de choix et le plus

utilisé pour la quantification de petites molécules organiques comme les polyphénols. Pour la quantification de biomarqueurs dans des échantillons biologiques, la technique majeure repose sur l'utilisation d'un mode particulier d'analyse, le suivi de réactions multiples (MRM ; Multiple Reaction Monitoring). Le mode MRM a été utilisé pour l'analyse de petites molécules depuis plus de 25 ans<sup>431</sup>. Il reste la technique la plus commune même si une tendance pour une technique de spectrométrie de masse à haute résolution se dessine<sup>432</sup>. Son principe repose sur la sélection par le 1<sup>er</sup> analyseur (Q) des ions avec un certain rapport  $m/z$ . Ces ions sélectionnés sont fragmentés dans une cellule de collision (q) et les fragments séparés dans un deuxième analyseur (Q)<sup>433</sup>.

Il est possible de sélectionner un ou plusieurs fragments issus de l'ion parent. On détermine alors pour chacune des molécules à doser ce qui est nommé une transition MRM définie par la paire spécifique de valeurs  $m/z$  associée à l'ion précurseur et à l'ion fragment sélectionnés. Dans de nombreuses méthodes décrites dans la littérature, une seule transition est utilisée pour doser chaque composé<sup>411, 413</sup>. Cependant, dans les protocoles classiques de développement analytique, il est admis et convenu que 2 transitions sont nécessaires. La 1<sup>ere</sup> permet la quantification du composé d'intérêt et la 2<sup>nde</sup> de confirmer la spécificité du métabolite mesuré. Le rapport entre les intensités de ces 2 transitions et le temps de rétention (RT) associé grâce au couplage par une technique chromatographique de type UPLC permet de confirmer par ses 4 critères l'unicité du métabolite.

**CHAPITRE III**  
**DÉVELOPPEMENT D'UNE**  
**MÉTHODE DE MESURE DE 38**  
**POLYPHÉNOLS DANS L'URINE**

## Contexte

Les polyphénols sont des métabolites secondaires trouvés dans une grande variété d'aliments et de boissons comme le café, le thé, les fruits, les légumes et les céréales. Leur rôle dans la prévention de maladies chroniques a été étayé par de nombreuses études *in vitro*, précliniques et cliniques<sup>335, 434</sup>. Cependant les études épidémiologiques sont plus rares et contradictoires<sup>4</sup>. Les études épidémiologiques sont très utiles pour étudier la relation entre apport alimentaire en polyphénols et la santé. Cependant, l'exposition aux polyphénols repose sur la correcte estimation de l'apport et sur la correcte estimation du contenu en polyphénols dans les aliments. De nombreuses limitations existent et de nombreux biais sont relevés<sup>44, 79</sup> et la complexité des polyphénols (plus de 500 composés connus dans les aliments) associée à la diversité des métabolites formés *in vivo* rend ces études difficiles.

Le développement de biomarqueurs d'exposition aux polyphénols dans les fluides biologiques est primordial pour une mesure objective de la quantité circulante de polyphénols dans les matrices biologiques et pour identifier correctement dans des études épidémiologiques et cliniques, les associations entre l'apport en polyphénols et la survenue de maladies chroniques comme le cancer<sup>79</sup>.

Les méthodes de mesure des polyphénols se sont focalisées sur un nombre restreint de composés appartenant à une classe ou sous-classe de composés pour des études d'interventions<sup>402</sup> afin d'évaluer la pharmacocinétique des polyphénols et parfois dans le cadre d'études épidémiologiques<sup>435</sup>.

Cependant, les polyphénols trouvés dans l'alimentation ont différentes activités biologiques, et divers effets sur la santé et les maladies sont attendus pour chacun des composés. Des méthodes analytiques avec une couverture plus large sont requises pour mesurer une plus grande diversité de polyphénols dans un même échantillon.

## Objectif

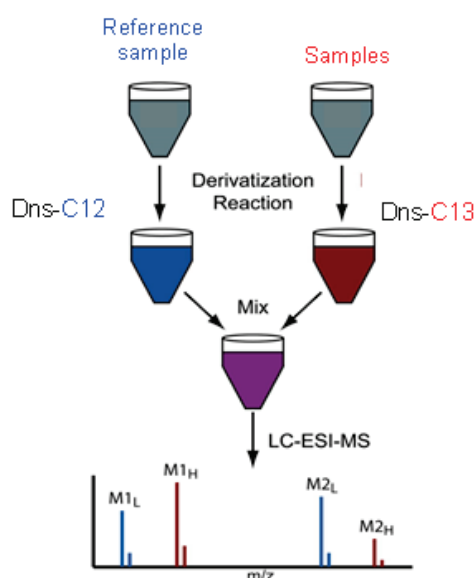
Le but de ce projet est de développer une méthode analytique pour quantifier 38 polyphénols dans l'urine grâce à la dilution isotopique différentielle par spectrométrie de masse.

## Approche

La méthode de dilution isotopique différentielle par spectrométrie de masse a été initialement développée pour mesurer des composés très divers par une approche non ciblée semi-quantitative par FT-ICR<sup>27</sup>. La méthode présentée dans ce projet a été modifiée et optimisée pour l'analyse quantitative ciblée des polyphénols. Elle se base sur le marquage isotopique différentiel par dérivatisation des polyphénols avec des isotopes du chlorure de dansyl (Dns-C12 et Dns-C13).

La méthode repose sur une hydrolyse enzymatique des glucuronides et des esters sulfate des polyphénols dans l'urine, suivis par une extraction liquide-liquide des aglycones libérés. La dansylation différentielle est réalisée par la dérivatisation d'un pool des échantillons d'urine à analyser choisi comme référence par le chlorure de dansyl non marqué (Dns-C12) et la

dérivatisation des échantillons ou des standards par le chlorure de dansyl marqué (Dns-C13). Les échantillons contenant les polyphénols étiquetés par le groupe dansyl  $^{13}\text{C}$  sont mélangés à l'échantillon urinaire de référence contenant les polyphénols étiquetés par le groupe dansyl  $^{12}\text{C}$ . L'analyse des isotopomères est réalisée par UPLC-MS-MS et la mesure de la concentration en polyphénols de chaque échantillon urinaire est déterminée à partir du rapport des intensités des polyphénols non marqués (référence) sur celle des polyphénols marqués au  $^{13}\text{C}$  (Figure 19). Des gammes étalons sont effectuées de manière similaire en remplaçant les échantillons urinaires par une solution d'un mélange de standards en concentrations connues. Des courbes de calibration sont établies en traçant le rapport des intensités des standards polyphénoliques dansylés par le Dns-C13 sur le pool référence dansylé par le Dns-C12 contre les concentrations des standards dansylés par le Dns-C13.



**Figure 19** : Schéma de la quantification relative des polyphénols-Dns- $^{13}\text{C}$  contre un pool référence.

## Principaux résultats

La réaction de dansylation a été optimisée et les rendements les plus importants ont été obtenus pour une concentration de chlorure de dansyl à 1mg/mL (100 $\mu\text{L}$ ) dans l'acétone dans un tampon carbonate (100 $\mu\text{L}$ ) 0.1M, à pH=9 pour une incubation à 60°C pendant 30min. La majorité des polyphénols dansylés se sont avérés être stables pendant 13h à 10°C.

L'hydrolyse enzymatique des glucuronides et des esters sulfate a été étudiée. L'activité enzymatique d'*H. pomatia* a montré la meilleure efficacité. Une hydrolyse par la  $\beta$ -glucuronidase d'*H. pomatia* (1500U) dans un tampon acétate 0.1M, pH=5 à 37°C pendant 2h a montré les meilleurs rendements d'hydrolyse.

L'extraction des aglycones par l'acétate d'éthyle a donné les meilleurs rendements d'extraction par comparaison à d'autres solvants et mélanges de solvants, et à la SPE.

La méthode a été validée selon les recommandations de la FDA. Trente-sept polyphénols sur les 38 testés ont été finalement validés avec des CV intra-batch inférieurs à 10% pour les 37 polyphénols et des CV inter-batch inférieurs à 15% pour 31 des 37 polyphénols.

La méthode a été appliquée au dosage des 37 échantillons dans 475 échantillons urinaires de la cohorte européenne EPIC (Article 2)

## Conclusion

La méthode est unique de par le nombre de polyphénols mesurés. Les composés les plus représentatifs de 13 classes et sous-classes et certains de leurs métabolites formés par le microbiote ou dans les tissus sont quantifiés. La dérivation par le chlorure de dansyl permet d'améliorer la séparation chromatographique et d'augmenter de manière conséquente la sensibilité de détection. L'utilisation de chlorure de dansyl marqué au  $^{13}\text{C}$  et la dilution isotopique différentielle évite d'avoir recours à des standards isotopiques coûteux et le plus souvent non disponibles commercialement. Elle permet également de s'affranchir des effets de matrices fréquemment rencontrés dans les matrices biologiques, et améliore de ce fait la justesse et la précision de la méthode.

## Article

**Contribution :** 1<sup>er</sup> auteur. J'ai initialement discuté de cette nouvelle approche méthodologique avec mon superviseur, puis j'ai conduit la stratégie analytique et le développement méthodologique complet. J'ai rédigé les 1<sup>ères</sup> versions du manuscrit. Le manuscrit a été soumis pour publication par mon superviseur et j'ai répondu aux commentaires des reviewers.

# Differential Isotope Labeling of 38 Dietary Polyphenols and Their Quantification in Urine by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

David Achaintre,<sup>†</sup> Audrey Buleté,<sup>‡</sup> Cécile Cren-Olivé,<sup>‡</sup> Liang Li,<sup>§</sup> Sabina Rinaldi,<sup>†</sup> and Augustin Scalbert<sup>\*,†</sup>

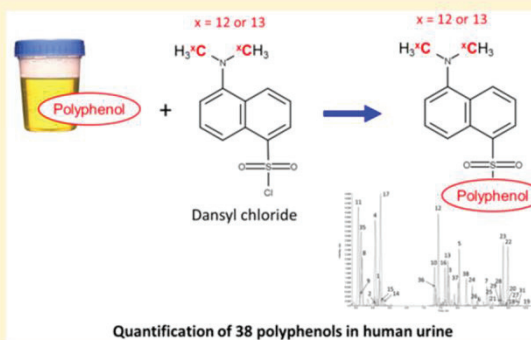
<sup>†</sup>Biomarkers Group, Nutrition and Metabolism Section, International Agency for Research on Cancer (IARC), 150 cours Albert Thomas, Lyon 69372 Cedex 08, France

<sup>‡</sup>Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, CNRS, Université de Lyon 1, ENS-Lyon, 5 rue de la Doua, Villeurbanne 69100, France

<sup>§</sup>Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6G 2G2, Canada

## Supporting Information

**ABSTRACT:** A large number of polyphenols are consumed with the diet and may contribute to the prevention of chronic diseases such as cardiovascular diseases, diabetes, cancers, and neurodegenerative diseases. More comprehensive methods are needed to measure exposure to this complex family of bioactive plant compounds in epidemiological studies. We report here a novel method enabling the simultaneous measurement in urine of 38 polyphenols representative of the main classes and subclasses found in the diet. This method is based on differential <sup>12</sup>C-/<sup>13</sup>C-isotope labeling of polyphenols through derivatization with isotopic dansyl chloride reagents and on the analysis of the labeled polyphenols by tandem mass spectrometry. This derivatization approach overcomes the need for costly labeled standards. Different conditions for enzyme hydrolysis of polyphenol glucuronides and sulfate esters, extraction, and dansylation of unconjugated aglycones were tested and optimized. Limits of quantification varied from 0.01 to 1.1 μM depending on polyphenols. Intra-batch coefficients of variation varied between 3.9% and 9.6%. Interbatch variations were lower than 15% for 31 compounds and lower than 29% for 6 additional polyphenols out of the 38 tested. Thirty seven polyphenols were validated and then analyzed in 475, 24 h urine samples from the European Prospective Investigation on Cancer and Nutrition (EPIC) study. Thirty four polyphenols could be detected and successfully estimated and showed large interindividual variations of concentrations (2–3 orders of magnitude depending on the compound), with median concentrations spanning from 0.01 to over 1000 μM for all 34 compounds.



Polyphenols are secondary plant metabolites found in a large variety of foods and beverages such as coffee, tea, wine, fruit and vegetables, and cereals. Their antioxidant properties and possible role in the prevention of chronic diseases such as cardiovascular diseases, diabetes, cancers, osteoporosis, and neurodegenerative diseases have raised considerable interest.<sup>1–4</sup> These effects have been substantiated in a large number of preclinical and clinical studies.<sup>5,6</sup> However, results from epidemiologic studies are in comparison more limited and often inconsistent in findings. This is largely explained by the complexity of the polyphenol family (over 500 compounds known in foods)<sup>7</sup> and the diversity of their metabolites formed in the body<sup>8</sup> which makes the estimation of polyphenol exposures difficult.<sup>9</sup>

Biomarkers have been used to compare individual exposures to polyphenols and their metabolites in case-control studies, but so far, these studies have been largely limited to

phytoestrogens (isoflavones and lignans) and a few more flavonoids.<sup>9,10</sup> However, the various polyphenols found in foods have highly diverse biological properties, and different effects on health and diseases are expected. Analytical methods with broader polyphenol coverage are therefore clearly needed to measure a larger diversity of polyphenols. A number of methods utilizing mass spectrometry have been proposed to estimate selections of polyphenols in urine after deconjugation of glucuronides and sulfate esters.<sup>11–15</sup> We report here a novel method based on polyphenol derivatization with <sup>13</sup>C- and <sup>12</sup>C-dansyl chloride and the analysis of the dansylated products by mass spectrometry. Derivatization with dansyl chloride has previously been used to quantify phenolic compounds such as

**Received:** September 23, 2015

**Accepted:** January 26, 2016

Table 1. UHPLC-ESI-MS/MS Parameters for Quantification of 38 Dietary Polyphenols and Polyphenol Metabolites

ID	polyphenol	number of dns groups	number of charges	label	retention time (min)	molecular weight	precursor ion ( <i>m/z</i> )	DP (V)	quantifier ion		qualifier ion	
									( <i>m/z</i> )	collision energy (V)	( <i>m/z</i> )	collision energy (V)
1	dns-4-hydroxybenzoic acid <sup>4f</sup>	1	1	<sup>12</sup> C	5.68	371	372.0	200	171.0	55	156.1	75
				<sup>13</sup> C-labeled	5.68	373	374.0		173.0		157.1	
2	dns-3-hydroxybenzoic acid <sup>4f</sup>	1	1	<sup>12</sup> C	5.55	371	372.0	200	171.0	55	156.1	75
				<sup>13</sup> C-labeled	5.55	373	374.0		173.0		157.1	
3	dns-protocatechuic acid <sup>4f</sup>	2	2	<sup>12</sup> C	7.74	620	311.0	200	171.1	40	156.0	65
				<sup>13</sup> C-labeled	7.74	624	313.0		173.1		157.0	
4	dns-vanillic acid <sup>4f</sup>	1	1	<sup>12</sup> C	5.55	401	402.0	200	171.1	45	156.1	80
				<sup>13</sup> C-labeled	5.55	403	404.0		173.1		157.1	
5	dns-3,5-dihydroxybenzoic acid <sup>4f</sup>	2	2	<sup>12</sup> C	8.05	620	311.1	200	170.1	45	171.0	45
				<sup>13</sup> C-labeled	8.05	624	313.1		172.1		173.0	
6	dns-gallic acid	3	1	<sup>12</sup> C	8.6	869	870.0	200	636.0	50	619.1	45
				<sup>13</sup> C-labeled	8.6	875	876.0		640.0		623.1	
7	dns-gallic acid ethyl ester	3	1	<sup>12</sup> C	8.86	897	898.0	76	644.0	39	349.1	57
				<sup>13</sup> C-labeled	8.86	903	904.0		668.0		351.1	
8	dns-4-hydroxyphenylacetic acid <sup>4f</sup>	1	1	<sup>12</sup> C	5.16	385	386.0	200	171.1	55	156.0	75
				<sup>13</sup> C-labeled	5.16	387	388.0		173.1		157.0	
9	dns-3-hydroxyphenylacetic acid <sup>4f</sup>	1	1	<sup>12</sup> C	5.11	385	386.0	200	171.1	55	156.0	75
				<sup>13</sup> C-labeled	5.11	387	388.0		173.1		157.0	
10	dns-3,4-dihydroxyphenylacetic acid <sup>4f</sup>	2	2	<sup>12</sup> C	7.31	634	318.1	200	156.0	65	171.1	40
				<sup>13</sup> C-labeled	7.31	638	320.1		157.0		173.1	
11	dns-homovanillic acid <sup>4f</sup>	1	1	<sup>12</sup> C	5.05	415	416.0	200	156.1	61	171.1	33
				<sup>13</sup> C-labeled	5.05	417	418.0		157.1		173.1	
12	dns-3,4-dihydroxyphenylpropionic acid <sup>4f</sup>	2	2	<sup>12</sup> C	7.42	648	325.0	200	156.1	65	171.1	40
				<sup>13</sup> C-labeled	7.42	652	327.0		157.1		173.1	
13	dns-3,5-dihydroxyphenylpropionic acid <sup>4f</sup>	2	2	<sup>12</sup> C	7.71	648	325.1	200	171.1	45	170.1	45
				<sup>13</sup> C-labeled	7.71	652	327.1		173.1		172.1	
14	dns- <i>p</i> -coumaric acid <sup>4f</sup>	1	1	<sup>12</sup> C	5.77	397	398.0	200	171.1	55	156.2	80
				<sup>13</sup> C-labeled	5.77	399	400.0		173.1		157.2	
15	dns- <i>m</i> -coumaric acid	1	1	<sup>12</sup> C	5.72	397	398.0	200	171.1	55	170.0	50
				<sup>13</sup> C-labeled	5.72	399	400.0		173.1		172.0	
16	dns-caffeic acid	2	1	<sup>12</sup> C	7.62	646	647.1	86	170.1	39	396.0	25
				<sup>13</sup> C-labeled	7.62	650	651.1		172.1		398.0	
17	dns-ferulic acid <sup>4f</sup>	1	1	<sup>12</sup> C	5.7	427	428.1	200	156.1	85	171.1	50
				<sup>13</sup> C-labeled	5.7	429	430.1		157.1		173.1	
18	dns-kaempferol	4	3	<sup>12</sup> C	9.48	1218	407.1	96	493.7	13	170.0	23
				<sup>13</sup> C-labeled	9.48	1226	409.8		496.7		172.0	
19	dns-quercetin	5	3	<sup>12</sup> C	10.05	1467	490.3	96	170.1	23	618.2	13
				<sup>13</sup> C-labeled	10.05	1477	493.5		172.1		622.2	
20	dns-isorhamnetin	4	3	<sup>12</sup> C	9.42	1248	417.2	81	508.7	13	170.0	23
				<sup>13</sup> C-labeled	9.42	1256	419.8		511.7		172.0	
21	dns-apigenin	3	3	<sup>12</sup> C	9.05	969	324.1	71	171.1	25	170.1	27
				<sup>13</sup> C-labeled	9.05	975	326.1		173.1		172.1	
22	dns-naringenin	4	3	<sup>12</sup> C	9.48	1204	402.4	200	486.6	18	170.1	40
				<sup>13</sup> C-labeled	9.48	1212	405.1		489.6		172.1	
23	dns-hesperetin	4	3	<sup>12</sup> C	9.34	1234	412.2	51	501.6	11	170.1	23
				<sup>13</sup> C-labeled	9.34	1242	415.1		504.6		172.1	
24	dns-daidsin	2	1	<sup>12</sup> C	8.43	720	721.1	126	170.1	51	171.2	51
				<sup>13</sup> C-labeled	8.43	724	725.1		172.1		173.2	
25	dns-genistein	3	3	<sup>12</sup> C	8.94	969	324.1	71	171.1	25	170.1	27
				<sup>13</sup> C-labeled	8.94	975	326.1		173.1		172.1	

B

DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03609  
Anal. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX



Table 1. continued

ID	polyphenol	number of dns groups	number of charges	label	retention time (min)	molecular weight	precursor ion ( <i>m/z</i> )	DP (V)	quantifier ion		qualifier ion	
									( <i>m/z</i> )	collision energy (V)	( <i>m/z</i> )	collision energy (V)
26	dns-equol	2	1	<sup>12</sup> C	8.57	708	709.1	101	170.1	57	171.1	57
				<sup>13</sup> C-labeled	8.57	712	713.1		172.1		173.1	
27	dns-phloretin	4	3	<sup>12</sup> C	9.77	1206	403.2	91	170.1	23	487.7	15
				<sup>13</sup> C-labeled	9.77	1214	405.8		172.1		490.7	
28	dns-(+)-catechin	4	3	<sup>12</sup> C	9.3	1222	408.3	86	171.2	29	495.8	17
				<sup>13</sup> C-labeled	9.3	1230	411.1		173.2		498.8	
29	dns-(-)-epicatechin	4	3	<sup>12</sup> C	9.25	1222	408.3	86	171.2	29	495.8	17
				<sup>13</sup> C-labeled	9.25	1230	411.1		173.2		498.8	
30	dns-(-)-galocatechin	5	4	<sup>12</sup> C	9.85	1471	369.1	91	171.1	25	170.0	25
				<sup>13</sup> C-labeled	9.85	1481	371.6		173.1		172.0	
31	dns-(-)-epigallocatechin	5	4	<sup>12</sup> C	9.79	1471	369.1	91	171.1	25	170.0	25
				<sup>13</sup> C-labeled	9.79	1481	371.6		173.1		172.0	
32/33	dns-procyanidin dimer B1/B2 <sup>a</sup>	8	4	<sup>12</sup> C	11.2	2442	611.7	86	170.2	37	171.0	35
				<sup>13</sup> C-labeled	11.2	2458	615.7		172.2		173.1	
34	dns-resveratrol	3	2	<sup>12</sup> C	9.34	927	464.8	86	171.1	31	170.2	33
				<sup>13</sup> C-labeled	9.34	933	467.8		173.1		172.2	
35	dns-tyrosol	1	1	<sup>12</sup> C	5.13	371	372.1	81	171.1	33	156.1	49
				<sup>13</sup> C-labeled	5.13	373	374.1		173.1		157.1	
36	dns-hydroxytyrosol	2	2	<sup>12</sup> C	7.34	620	311.1	200	171.1	40	156.0	65
				<sup>13</sup> C-labeled	7.34	624	313.1		173.1		157.0	
37	dns-enterodiol	2	1	<sup>12</sup> C	8.02	768	769.2	176	517.1	43	170.1	53
				<sup>13</sup> C-labeled	8.02	772	773.2		519.1		172.1	
38	dns-enterolactone	2	1	<sup>12</sup> C	8.26	764	765.1	161	531.1	60	170.1	75
				<sup>13</sup> C-labeled	8.26	768	769.1		533.1		172.1	

<sup>a</sup>For these compounds, sensitivity was voluntarily reduced by modifying the declustering potential and/or the collision energy. <sup>b</sup>Procyanidin dimers B1 and B2 could not be distinguished in the chromatograms.

steroids present at very low concentrations.<sup>16,17</sup> A <sup>13</sup>C-dansyl chloride reagent and a differential isotope labeling method was proposed to introduce an isotope tag on amines and phenols.<sup>18</sup> In this approach, samples containing amines and/or phenols tagged with <sup>13</sup>C-dansyl groups are mixed with a reference sample tagged with <sup>12</sup>C-dansyl groups and analyzed by tandem mass spectrometry. Amine and/or phenol concentrations are estimated through the calculation of ratios of labeled over nonlabeled compounds. This isotope labeling approach limits matrix and ion suppression effects without a need for synthesizing costly isotope-labeled analogs. In the present work, a method is developed and optimized to estimate 38 polyphenols in urine by differential isotope labeling with dansyl chloride. It is applied to 475 urine samples from the European Prospective Investigation on Cancer and Nutrition (EPIC) study.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Chemicals and Reagents.** Caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, quercetin, kaempferol, phloretin, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-galocatechin, vanillic acid, enterolactone, enterodiol, isorhamnetin, hesperetin, naringenin, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-propanoic acid, 3-(3,5-dihydroxyphenyl)-1-propanoic acid, 3,5 dihydroxybenzoic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, dansyl chloride, type H1  $\beta$ -glucuronidase from *Helix pomatia*, LC/MS grade methanol and acetonitrile and acetone for HPLC, and formic acid as eluent additive for UHPLC-MS were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Homovanillic acid, (-)-epi-

galocatechin, procyanidin dimer B2, and procyanidin dimer B1 were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Procatechuic acid, 3- and 4-hydroxybenzoic acids, and ethyl acetate were purchased from Acros (Thermo Fischer Scientific, Geel, Belgium). Daidzein, genistein, equol, *m*-coumaric acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, resveratrol, apigenin, tyrosol, hydroxytyrosol, and gallic acid ethyl ester were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA). <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Dansyl chloride was synthesized as previously described.<sup>18</sup>

**Urine Samples.** Two sets of urine samples were used. The first set (dietary intervention study) was made of spot urine samples collected in the morning from three subjects who received a meal either poor or rich in polyphenols in the previous evening.<sup>19</sup> This sample set was used for evaluating precision, accuracy, and recovery of the method. The second set of urine samples were 24 h urine samples collected from 475 participants of the EPIC study (a large multicenter prospective cohort study designed to investigate the relation between diet, other lifestyle factors, environmental factors, and cancer risk which consists of approximately half a million participants) in four European countries (France, Germany, Italy, and Greece).<sup>19</sup> Subjects were female and male adults, 50–61 years old, following their regular diet. Urine samples were collected between 1995 and 1999 and stored at -20 °C with boric acid as preservative.

**Extraction and Dansylation of Polyphenols.** Urine samples were thawed at room temperature, centrifuged (10 min at 2000 rpm), and treated with deconjugating enzymes. Three

enzyme preparations (sulfatase (EC: 3.1.6.1) type H1 from *H. pomatia* (also showing  $\beta$ -glucuronidase activity), a  $\beta$ -glucuronidase (EC: 3.2.1.31) type H1 from *H. pomatia* (also showing sulfatase activity), and a  $\beta$ -glucuronidase (EC: 3.2.1.31) type IX-A from *Escherichia coli*) and different incubation times (1 to 24 h) and enzyme quantities (360, 750, and 1500 U) were tested on urine samples collected in the dietary intervention study. Yields of unconjugated metabolites were evaluated on the basis of the highest response. The following conditions of hydrolysis were finally selected: 50  $\mu$ L of urine was treated with 25  $\mu$ L of a solution of *H. pomatia* glucuronidase (1500 U  $\beta$ -glucuronidase) for 2 h at 37 °C. Samples were then extracted twice for 5 min with ethyl acetate (800  $\mu$ L), shaken at 1100 rpm, and centrifuged for 15 min at 3000 rpm. The organic phase (1400  $\mu$ L) was evaporated for 40 min under vacuum at room temperature.

Dried urine extracts were redissolved in a  $^{13}\text{C}$ -dansyl chloride solution (100  $\mu\text{g}$  in 100  $\mu\text{L}$  of acetone) and carbonate buffer (pH = 9.0, 0.1 M, 100  $\mu\text{L}$ ) and kept at 60 °C for 30 min. A pooled urine sample generated by mixing equivolumes (10  $\mu\text{L}$ ) of every urine sample analyzed in the batch ( $n = 25$ ) was extracted and treated with  $^{12}\text{C}$ -dansyl chloride in similar conditions. An aliquot (15  $\mu\text{L}$ ) of the dansylated pooled urine sample was added to each dansylated urine sample (15  $\mu\text{L}$ ), and the mixture was directly analyzed by ultra high pressure liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS).

**Analysis of Dansylated Polyphenols by Tandem Mass Spectrometry.** UHPLC-ESI-MS/MS was performed on an Agilent 1290 UHPLC system coupled to a 5500 QTRAP mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA). All dansylated urine samples for a given batch were maintained at 10 °C in the autosampler until analysis. They were injected (2  $\mu\text{L}$ ) onto an Acquity CSH C18 column (Waters, 2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) maintained at 50 °C. The following solvents were used for elution: solvent A, 0.1% formic acid in methanol/water 10/90 (v/v/v); solvent B, acetonitrile. The following gradient was used at a flow rate of 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ : 100% A for 2 min, ramped successively to 50% B in 3 min, 60% in 2.5 min, 90% in 2 min, and 100% B in 2.5 min. It was finally maintained at 100% B for two more min with a flow rate at 600  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Mass detection was carried out in scheduled MRM mode using a Turbo V-ion source operating in positive mode at 600 °C with a nebulizer gas pressure of 50 psi, a drying gas pressure of 60 psi, a curtain gas pressure of 30 psi, and collision activated dissociation (CAD) with medium pressure and capillary voltage of 5500 V. Two transitions were determined for each dansylated compound, and technical parameters (DP and CE) were optimized to obtain the highest sensitivity (Table 1). For some of the most concentrated polyphenols, the sensitivity was voluntarily reduced by modification of these parameters to avoid signal saturation (Table 1).

**Quantification of Dansylated Polyphenols.** Calibration curves were built using a mix of the 38 polyphenol standards at 10 concentration levels corresponding to expected concentrations in free-living subjects. Standards were dansylated with  $^{13}\text{C}$ -dansyl chloride and mixed with the pooled urine sample (made of all samples in the batch) dansylated with  $^{12}\text{C}$ -dansyl chloride. Quantification was carried out using the MultiQuant 2.1 software (AB Sciex, Foster City, CA). Calibration curves were established by plotting  $^{13}\text{C}$ -dansyl (dns)-polyphenol/ $^{12}\text{C}$ -dns polyphenol peak area ratios vs concentrations of  $^{13}\text{C}$ -dns-polyphenols and by fitting data using a quadratic regression

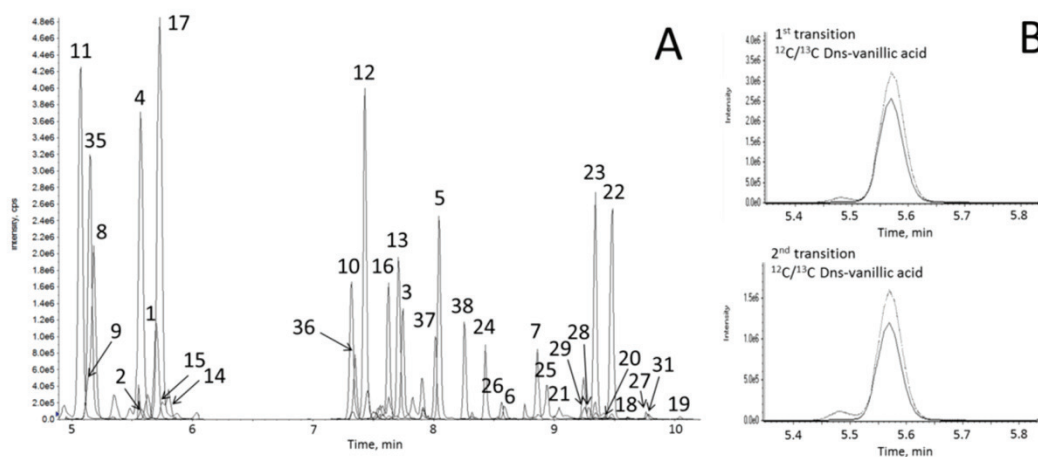
with 1/X weighting. R2 coefficients were above 0.999 for all compounds. The 475 urine samples from the EPIC study were analyzed in 19 batches, with a ten-point calibration curve injected in duplicate along each batch. Three QC samples (two urine samples from the dietary intervention study and a pooled urine sample from the EPIC calibration study) were analyzed in duplicate within each batch, together with a blank sample (urine is replaced by water, and the same procedure used for urine samples is followed to extract and analyze the blank sample), to assess the level of interference and/or contaminations.

**Method Validation.** The method was validated according to FDA guidelines.<sup>20</sup> Intra-batch reproducibility was evaluated by repeated injection ( $n = 6$ ) of four urine samples from the dietary intervention study (two with low polyphenol concentrations and two with high polyphenol concentrations) in a same batch. Interbatch reproducibility was evaluated on two samples from the intervention study (high and low polyphenol concentrations) and on the pooled urine sample from the EPIC calibration study analyzed in duplicate in each of the 19 batches. Accuracy was evaluated by spiking three different urine samples with low polyphenol concentrations (intervention study) with standards at three different concentrations representative of the concentrations found in urine from free-living subjects over a 4-month period. Recovery was determined by comparing the peak area of dansylated polyphenols in the spiked urine samples with that of pure dansylated standards. LOQ was defined as the lowest point of the calibration giving an accuracy varying from 80% to 120% of the theoretical value.

## RESULTS

**Polyphenol Dansylation.** Thirty eight dietary polyphenols and metabolites formed in the tissues and by the microbiota were selected for their widespread occurrence in foods or in human biofluids and for being representative of the main polyphenol classes. They include phenolic acids (Table 1, peaks 1–17), flavonoids (peaks 18–32), one stilbene (peak 34), tyrosols (peaks 35–36), and lignans (peaks 37–38). Phenolic acids can be further divided into the following subclasses: hydroxybenzoic acids (Table 1, peaks 1–7), hydroxyphenylacetic acids (peaks 8–11), hydroxyphenylpropanoic acids (peaks 12–13), hydroxycinnamic acids (peaks 14–17), and flavonoids including flavonols (peaks 18–20), one flavone (peak 21), flavanones (peaks 22–23), isoflavonoids (peaks 24–26), one dihydrochalcone (peak 27), and flavanols (peaks 28–33).

The reaction of dansylation was optimized on pure compounds (ferulic, caffeic and gallic acids, daidzein, and resveratrol) using different solvents (acetone or acetonitrile) and different pH (9 and 10.5). The highest yields of dansylation were observed at pH 9.0 with acetone. Different concentrations of dansyl chloride (1, 5, and 20 mg/mL) and different reaction times (15 min to 2 h) were then compared on the 38 pure polyphenol standards. The highest yields were observed at a dansyl chloride concentration of 1 mg/mL and reaction time of 30 min. The completeness of dansylation was checked in full scan experiments (data not shown). It was found to be quantitative (all phenolic groups dansylated) with the exception of the two flavanones (hesperetin and naringenin). Their carbonyl group was also dansylated with a yield of approximately 50%, and this led to the formation of two different products with 3 and 4 dansyl groups at two different



**Figure 1.** (A) LC-ESI-MS/MS chromatogram of a pool of 25 urine samples from the EPIC cohort. Only the quantifier transition of the  $^{12}\text{C}$ -dansylated polyphenols is shown. Run time is 12 min. See Table 1 for peak identity. (B) Scheduled MRM chromatogram showing quantifier and qualifier mass transitions for dansylated vanillic acid.

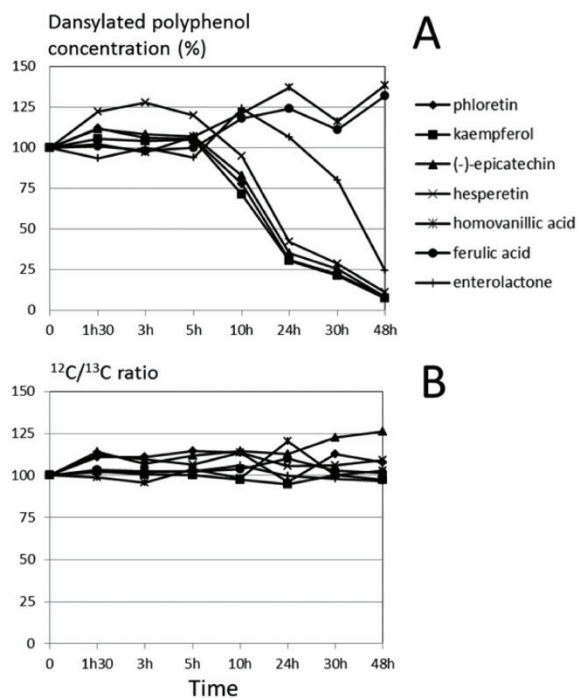
retention times. The tetra-dansylated compounds were selected for quantification.

Dansylated polyphenols, prepared from the 38 standards, were also analyzed at different time points after the reaction to assess their stability. Most dansylated polyphenols were found to be stable for up to 13 h at 10 °C in the conditions of the reaction. Some degradation (up to 50% at 16 h and 90% at 48 h) was observed for about half of the polyphenols measured (Figure 2A). However, the ratio of the  $^{12}\text{C}$ -dansylated polyphenol (sample) to the  $^{13}\text{C}$ -dansylated polyphenol (reference sample) was found to be stable over the 48 h following dansylation (Figure 2B). This result was compatible with the analysis of batches of 25 samples and a duration of about 14 h for the analysis of all samples (including samples for calibration curve, QC, and blank samples) in a batch.

**Quantification of Dansylated Polyphenols by Tandem Mass Spectrometry.** Dansylated polyphenols were quantified by tandem mass spectrometry (Table 1, Figure 1). Multi-charged ions were observed for several compounds and selected for quantification when the mass of the monocharged ions exceeded the higher mass that could be scanned by the mass spectrometer.

Limit of quantification (LOQ) varied from 0.01  $\mu\text{M}$  for equal to 1.10  $\mu\text{M}$  for 4-OH-phenylacetic acid (Table 2). For some of the most concentrated polyphenols (Table 2), sensitivity was voluntarily reduced by modifying the mass spectrometry operational parameters (Table 1) to avoid signal saturation. Within each analytical batch of 25 samples, a blank sample was added to assess the presence of possible polyphenol contaminants in the glucuronidase preparation.<sup>21</sup> Traces of apigenin and protocatechuic and caffeic acids were found in the enzyme preparation, and the corresponding concentrations in the blank were subtracted from the measured concentrations in the samples.

Precision and accuracy of the method were evaluated. Very good intrabatch precision was observed, with CVs varying between 3.9% and 9.6% (See Table S1 for intra- and interbatch CV values). Interbatch CVs varied between 5% and 15% for 31 of the 38 polyphenols tested. It exceeded 15% for catechins [(+)-catechin, 17.4%; (–)-epicatechin, 17.5%; (–)-epigallocatechin, 49.8%], the two flavonols (quercetin, 26.4%; isorhamnetin, 29.1%), apigenin (25.1%), and phloretin, (21.4%).



**Figure 2.** Kinetics of degradation of dansylated polyphenols. Dansylated polyphenol standards were maintained at 10 °C in the conditions of the reaction and analyzed at different time points after the end of the reaction. Seven out of the 38 polyphenols measured are shown. (A) Concentrations of dansylated polyphenols expressed in relative intensity (%) as compared to initial time ( $t = 0$  h). Initial time corresponds to the immediate analysis of the urine sample after dansylation. (B)  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  ratio for each dansylated polyphenol expressed in relative intensity (%) as compared to initial time ( $t = 0$  h).

Recovery of spiked samples varied between 72% and 107%, except for gallic acid, two flavonols (kaempferol and quercetin), (+)-gallocatechin, procyanidin dimer B1 and B2, and phloretin, which showed lower recovery values (25% to 63%) (See Table S1 for recovery values). Recovery after dilution of 1/2 to 1/8 (v/v) varied between 84% and 120% for most compounds with the exception of 3-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, quercetin,

Table 2. Limit of Quantification for 37 Dietary Polyphenols and Urinary Concentrations in 475 Subjects from the EPIC Cohort

polyphenol	limit of quantification ( $\mu\text{M}$ )	lowest concentration ( $\mu\text{M}$ )	number of samples with concentrations <LOQ (%)	highest concentration ( $\mu\text{M}$ )	median concentration ( $\mu\text{M}$ )	average concentration ( $\mu\text{M}$ )	
						mean	SD
4-hydroxybenzoic acid <sup>a</sup>	0.09	2.3	0	59.0	11.2	12.8	7.78
3-hydroxybenzoic acid <sup>a</sup>	0.03	0.03	0	25.1	1.18	1.63	1.72
protocatechuic acid <sup>a</sup>	0.03	0.33	0	11.1	1.93	2.23	1.27
vanillic acid <sup>a</sup>	0.13	0.75	0	192	20.3	27.3	23.1
3,5-dihydroxybenzoic acid <sup>a</sup>	0.06	0.15	0	19.9	2.36	3.3	2.49
gallic acid	0.13	<LOQ	1.1	6.42	0.352	0.617	0.74
gallic acid ethyl ester	0.13	<LOQ	49.3	8.21	<LOQ	1.05	1.37
4-hydroxyphenylacetic acid <sup>a</sup>	1.1	16.8	0	1017	92.2	111	88.7
3-hydroxyphenylacetic acid <sup>a</sup>	0.27	<LOQ	2.3	182	26.1	33	24.5
3,4-dihydroxyphenylacetic acid <sup>a</sup>	0.23	0.34	0	33.1	2.99	3.71	2.92
homovanillic acid <sup>a</sup>	0.19	2.11	0	69.5	14.0	15.2	7.25
3,4-dihydroxyphenylpropionic acid <sup>a</sup>	0.23	0.44	0	38.0	5.17	7.32	6.42
3,5-dihydroxyphenylpropionic acid <sup>a</sup>	0.33	0.62	0	43.4	6.6	8.41	6.22
<i>p</i> -coumaric acid <sup>a</sup>	0.04	0.16	0	29.4	1.18	1.53	1.66
<i>m</i> -coumaric acid <sup>a</sup>	0.08	<LOQ	1.7	51.7	1.27	2.51	4.09
caffeic acid	0.11	0.46	0	14.1	2.78	3.27	2.25
ferulic acid <sup>a</sup>	0.19	3.76	0	92.7	24.2	27.1	16.4
kaempferol	0.04	<LOQ	7.4	>1.83 <sup>c</sup>	0.07	0.098	0.1
quercetin	0.11	0.11	0	2.48	0.286	0.348	0.27
isorhamnetin	0.44	<LOQ	53.7	4.32	<LOQ	0.546	0.42
apigenin	0.02	<LOQ	24.0	3.01	0.043	0.11	0.21
naringenin	0.21	<LOQ	2.3	31.7	0.951	2.34	3.68
hesperetin	0.19	<LOQ	26.1	24.8	0.545	2.46	3.59
daidzein	0.07	<LOQ	2.7	64.1	0.693	1.95	4.2
genistein	0.01	<LOQ	2.5	>1.83 <sup>d</sup>	0.124	0.237	0.3
equol	0.01	<LOQ	11.4	>1.09 <sup>e</sup>	0.03	0.059	0.12
phloretin	0.27	<LOQ	52	>5.5 <sup>e</sup>	<LOQ	0.525	0.51
(+)-catechin	0.04	<LOQ	34.7	>0.92 <sup>f</sup>	0.061	0.125	0.11
(-)-epicatechin	0.1	<LOQ	25.9	2.23	0.13	0.207	0.21
(+)-gallo catechin	0.05	<LOQ	97.5	0.136	<LOQ	0.083	0.03
procyanidin dimers B1/B2 <sup>b</sup>	0.03	<LOQ	100	<LOQ	<LOQ	<LOQ	NA
resveratrol	0.02	<LOQ	10.9	2.85	0.05	0.156	0.28
tyrosol	0.02	0.02	0	9.42	0.458	1.06	1.46
hydroxytyrosol <sup>a</sup>	0.23	0.23	0	58.5	1.31	2.95	5.06
enterodiol	0.05	<LOQ	4.6	9.95	0.208	0.501	1.0
enterolactone <sup>a</sup>	0.05	<LOQ	0.6	30.8	1.73	3.1	4.12

<sup>a</sup>Sensitivity voluntarily reduced for these polyphenols. <sup>b</sup>Procyanidin dimers B1 and B2 could not be distinguished in the chromatograms. <sup>c</sup>One sample with concentration higher than that of the highest concentration of the calibration curve. <sup>d</sup>Nine samples with concentrations higher than that of the highest concentration of the calibration curve. <sup>e</sup>Two samples with concentrations higher than that of the highest concentration of the calibration curve. <sup>f</sup>Three samples with concentrations higher than that of the highest concentration of the calibration curve.

and naringenin which showed higher recoveries (124–149%) (See Table S1 for dilution recovery values). On the basis of these results, 37 compounds out of the 38 tested were kept for further analyses and (-)-epigallocatechin was excluded because of a too high interbatch variability.

#### Polyphenol Concentrations in EPIC Urine Samples.

The 37 polyphenols were measured in urine samples from 475 subjects of the EPIC cohort (Table 2). Out of these 37 polyphenols, procyanidin dimers B1 and B2 could not be detected in any of the samples, and (+)-gallo catechin was detected in a very small number of the samples (2.5%). Thirty four compounds were detected and quantified in a large

fraction of the samples; the proportion of concentration values lower than LOQ varied between 0.6% (enterolactone) and 53.7% (isorhamnetin). Median concentrations varied widely from compounds present at very low concentrations such as equol or resveratrol (median, respectively, 0.03  $\mu\text{M}$  and 0.05  $\mu\text{M}$ ) to phenolic compounds present at high concentration such as 4-hydroxyphenylacetic acid (median, 92  $\mu\text{M}$ ).

## DISCUSSION

Direct analysis of polyphenols by liquid chromatography without chemical derivatization is the analytical method most

commonly used to estimate polyphenols in human biofluids such as urine. We set up a different method based on derivatization with differential isotopic dansyl groups. The present method is applicable to small volumes of urine samples (50  $\mu\text{L}$ ) to estimate 34 polyphenols from 13 different classes or subclasses and excreted in highly variable concentrations (2–3 orders of magnitude for any given compound).

**Dansylation Reaction.** Derivatization with dansyl groups has several advantages when analyzing a large panel of polyphenols and their metabolites showing large differences in molecular weight, chemical structure, and physicochemical properties. It increases lipophilicity of the compounds and their affinity for the reverse phase column and improves chromatographic separation. It also increases the mass of the molecule to avoid the low mass background signal interference often encountered in conventional LC-MS, thereby increasing the signal to background ratio.

The number of phenolic groups in the 38 selected polyphenols varies from one (as in some phenolic acids) to eight (as in procyanidin dimer B1). For all polyphenols tested, all phenolic groups were dansylated, resulting in derivatized products with one to eight dansyl groups (Table 1). Different parameters of the reaction (reaction time, concentration of reagent, pH) were optimized to maximize the yield of derivatization. When analyzed by mass spectrometry, the formation of multicharged ions (Table 1) and some in-source fragmentation were observed for a number of dansylated polyphenols. For example, a full scan chromatogram of dansylated phloretin showed the formation of mono-, di-, tri-, and tetracharged ions from tetradansylated phloretin, all having the same retention time (not shown). However, it was also found that the multiplicity of ions had limited impact on the accuracy of the measurements. The stability of the dansylated products was also assessed. Some degradation of the dansylated groups was observed for some polyphenols starting after 10 h at 10  $^{\circ}\text{C}$  (Figure 1A). However, as our method is based on the measurement of ratios of  $^{13}\text{C}$ -dns- to  $^{12}\text{C}$ -dns-polyphenols which degrade at a similar pace, this partial degradation of the reaction products had limited impact on the measurements (Figure 1B).

Overall, measurements of 28 polyphenols out of the 38 tested could be validated according to FDA guidelines,<sup>20</sup> with intra- and interbatch CVs lower than 15% (See Table S1 for intra- and interbatch CV values). Interbatch CVs were higher than 15% for 6 other polyphenols which were considered still acceptable for epidemiological applications.<sup>22</sup> A total of 37 polyphenols were therefore estimated in urine samples from participants of the EPIC calibration study.

**Application to Polyphenol Measurement in the EPIC Cohort.** Out of the 37 polyphenols measured, 34 were detected in all or a fraction of these subjects and 3 polyphenols could not be detected in any of the subjects (Table 2). Two major reasons may explain these results: either these polyphenols were present at concentrations below the limit of detection or major sources of these polyphenols were not actually consumed. Procyanidin dimer B2 or (+)-gallocatechin were previously detected in urine in two dietary intervention studies with, respectively, cocoa and tea,<sup>23,24</sup> and their concentrations were likely too low to be detected in the present samples. Gallic acid ethyl ester and resveratrol, characteristic of red wine consumption,<sup>25</sup> could not be detected in, respectively, 49% and 10% of the EPIC subjects (Table 2), suggesting that a large fraction of the subjects did not consume

wine in the few days before urine collection. Similarly, hesperetin, mainly found in orange fruit and juice, was absent in 26% of the subjects who most likely did not consume these food items in the few days before urine collection. Interestingly, soy isoflavones (daidzein and genistein) were detected in a large fraction of the subjects (97%; Table 2). Consumption of soy is low in Europe, but soy or soy extracts are widely used as food ingredients or food additives. The low LOQ for equol, a microbial metabolite formed from daidzein in the gut, also made possible its detection in 88% of the subjects. These results are in agreement with a previous work in the EPIC-Norfolk cohort in which daidzein and genistein were detected in a large fraction of the urine and serum samples tested.<sup>26</sup>

Overall, the highest median concentrations in urine were observed for phenolic acids formed by the gut microbiota from dietary polyphenols or aromatic amino acids (phenylacetic acids, benzoic acids, and phenylpropionic acids; 1.2–92  $\mu\text{M}$ ), for caffeic acid consumed with coffee (2.8  $\mu\text{M}$ ), and for ferulic acid, its *O*-methylated metabolite (24  $\mu\text{M}$ ) (Table 2). Enterolactone, the main mammalian lignan, and hydroxytyrosol, originating from olive oil and wine, are also excreted in significant amounts (median concentration, respectively, 1.7 and 1.3  $\mu\text{M}$ ). Other polyphenols, flavonoids, phenolic acids (gallic acid, gallic acid ethyl ester), or stilbenes (resveratrol), are compounds absorbed in the gut from various foods and are present in urine in much lower concentrations (0.03 to 0.95  $\mu\text{M}$ ).

**Comparison with Methods for Polyphenol Quantification Previously Published.** Most methods previously published to measure polyphenols in human urine were targeted at a limited number of compounds from specific polyphenol classes or subclasses. Many of these methods used LC-MS as in the present work. Gasperotti et al. measured 20 phenolic acids and 3 small phenols in urine<sup>14</sup> with a significant overlap (10 compounds) with phenolic acids measured in this work. Nielsen et al. quantified 7 flavonoids (flavonols, flavanols, and dihydrochalcone) in urine samples from a dietary intervention study.<sup>27</sup>

A larger diversity of polyphenols was measured in two other studies. Urpi-Sarda et al. measured 17 phenolic acids, 2 mammalian lignans, and 2 flavanols (including 16 compounds measured in the present work) in urine samples after consumption of cocoa.<sup>12</sup> Magiera et al. developed and fully validated a method to estimate 43 polyphenols and their metabolites in urine.<sup>13</sup> Starting from 2 mL urine aliquots, they were able to detect, in human urine from 32 patients, 24 flavonoids and phenolic acids out of the 43 polyphenols tested. With 34 polyphenols from 13 polyphenol classes or subclasses quantified in urine samples from the EPIC cohort, the number and diversity of polyphenols quantified in the present study are higher than in these two previous studies.

## CONCLUSIONS

The method proposed here has several advantages: it encompasses 13 classes and subclasses of polyphenols and several of the most representative compounds in each of these classes or subclasses. A substantial number of polyphenol metabolites formed either by the microbiota (phenolic acids) or in the human tissues (*O*-methylated metabolites) are also measured. Derivatization with dansyl chloride improves chromatographic separation of highly diverse polyphenols. In addition, the use of  $^{13}\text{C}$ - and  $^{12}\text{C}$ -reagents overcomes the need for costly labeled standards, which are essential to limit matrix

and/or ion suppression effects commonly observed in complex biological matrices. Isotopic dilution has been used to estimate specific polyphenols such as isoflavones and lignans using  $^{13}\text{C}$ -labeled standards chemically synthesized.<sup>28</sup> Isotopic dilution is particularly useful to quantify compounds present in biofluids at very low concentrations. However, the present differential isotope labeling approach allows one, for the first time, to apply isotopic dilution to the estimation of a large diversity of phenolic compounds. Overall, the present method allows one to quantify polyphenols in urine samples with concentrations spanning over 5 orders of magnitude, including very low concentrations without compromising precision and accuracy. This method was initially targeted at a list of polyphenols selected a priori and quantified by tandem mass spectrometry. However, the same method combined with the use of a high resolution mass spectrometer would also permit broad scan acquisitions to measure additional and a priori unknown dansylated phenols and amines as initially proposed by Guo and Li<sup>18</sup> and to semiquantify these compounds for which chemical standards may not be available.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03609.

Intra- and inter-batch precision, spike, and dilution recovery for the measurement of 38 polyphenols (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel. +33 472 73 80 95. E-mail: scalberta@iarc.fr.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Institut National du Cancer, Paris (INCa Grant #2011-105) and the Wereld Kanker Onderzoek Fonds (WCRF NL Grant #2012/604).

## ■ REFERENCES

- (1) Arts, I. C.; Hollman, P. C. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 317S–325S.
- (2) Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 287–306.
- (3) Hollman, P. C.; Cassidy, A.; Comte, B.; Heinonen, M.; Richelle, M.; Richling, E.; Serafini, M.; Scalbert, A.; Sies, H.; Vidry, S. *J. Nutr.* **2011**, *141*, 989S–1009S.
- (4) Rodríguez-Mateos, A.; Vauzour, D.; Krueger, C. G.; Shanmuganayagam, D.; Reed, J.; Calani, L.; Mena, P.; Del Rio, D.; Crozier, A. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1803–53.
- (5) Hooper, L.; Kroon, P. A.; Rimm, E. B.; Cohn, J. S.; Harvey, I.; Le Cornu, K. A.; Ryder, J. J.; Hall, W. L.; Cassidy, A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 38–50.
- (6) Thomasset, S. C.; Berry, D. P.; Garcea, G.; Marczylo, T.; Steward, W. P.; Gescher, A. J. *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 451–458.
- (7) Perez-Jimenez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4959–4969.
- (8) Rothwell, J. R.; Urpi-Sarda, M.; Boto-Ordóñez, M.; Llorach, R.; Farran-Codina, A.; Barupal, D. K.; Neveu, V.; Manach, C.; Andres-Lacueva, C.; Scalbert, A. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 203.
- (9) Zamora-Ros, R.; Touillaud, M.; Rothwell, J. A.; Romieu, I.; Scalbert, A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *100*, 11–26.
- (10) Perez-Jimenez, J.; Hubert, J.; Ashton, K.; Hooper, L.; Cassidy, A.; Manach, C.; Williamson, G.; Scalbert, A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *92*, 801–809.
- (11) Ito, H.; Gonthier, M.-P.; Manach, C.; Morand, C.; Mennen, L.; Rémésy, C.; Scalbert, A. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 500–509.
- (12) Urpi-Sarda, M.; Monagas, M.; Khan, N.; Llorach, R.; Lamuela-Raventos, R. M.; Jauregui, O.; Estruch, R.; Izquierdo-Pulido, M.; Andres-Lacueva, C. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7258–7267.
- (13) Magiera, S.; Baranowska, I.; Kusa, J. *Talanta* **2012**, *89*, 47–56.
- (14) Gasperotti, M.; Masuero, D.; Guella, G.; Mattivi, F.; Vrhovsek, U. *Talanta* **2014**, *128*, 221–230.
- (15) de Ferrars, R. M.; Czank, C.; Saha, S.; Needs, P. W.; Zhang, Q.; Raheem, K. S.; Botting, N. P.; Kroon, P. A.; Kay, C. D. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10052–8.
- (16) Li, X.; Franke, A. A. *Steroids* **2015**, *99*, 84–90.
- (17) Santa, T. *Biomed. Chromatogr.* **2011**, *25*, 1–10.
- (18) Guo, K.; Li, L. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3919–3932.
- (19) Edmands, W.; Ferrari, P.; Rothwell, J. A.; Rinaldi, S.; Slimani, N.; Barupal, D. K.; Biessy, C.; Jenab, M.; Clavel-Chapelon, F.; Fagherazzi, G.; Boutron-Ruault, M. C.; Katzke, V.; Kuhn, T.; Boeing, H.; Trichopoulou, A.; Lagiou, P.; Trichopoulos, D.; Palli, D.; Grioni, S.; Tumino, R.; Vineis, P.; Mattiello, A.; Romieu, I.; Scalbert, A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *102*, 905.
- (20) Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*; 2001. Downloaded from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf> (12 September 2015).
- (21) Nakamura, T.; Tanaka, R.; Ashida, H. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2011**, *75*, 1506–10.
- (22) Zamora-Ros, R.; Achaintre, D.; Rothwell, J. A.; Rinaldi, S.; Assi, N.; Ferrari, P.; Leitzmann, M.; Boutron Ruault, M. C.; Fagherazzi, G.; Auffray, C.; Kuhn, T.; Katzke, V.; Boeing, H.; Trichopoulou, A.; Naska, A.; Vasilopoulou, E.; Palli, D.; Grioni, S.; Mattiello, A.; Tumino, R.; Ricceri, F.; Slimani, N.; Romieu, I.; Scalbert, A. *Scientific Reports* **2016**, submitted.
- (23) Urpi-Sarda, M.; Monagas, M.; Khan, N.; Lamuela-Raventos, R. M.; Santos-Buelga, C.; Sacanella, E.; Castell, M.; Permanyer, J.; Andres-Lacueva, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1545–56.
- (24) Yang, B.; Arai, K.; Kusu, F. *Anal. Biochem.* **2000**, *283*, 77–82.
- (25) Neveu, V.; Perez-Jiménez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D.; Scalbert, A. *Database* **2010**, *2010*, bap024.
- (26) Grace, P. B.; Taylor, J. I.; Low, Y. L.; Luben, R. N.; Mulligan, A. A.; Botting, N. P.; Dowsett, M.; Welch, A. A.; Khaw, K. T.; Wareham, N. J.; Day, N. E.; Bingham, S. A. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* **2004**, *13*, 698–708.
- (27) Nielsen, S. E.; Freese, R.; Cornett, C.; Dragsted, L. O. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1503–1509.
- (28) Grace, P. B.; Taylor, J. I.; Botting, N. P.; Fryatt, T.; Oldfield, M. F.; Al-Maharik, N.; Bingham, S. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 1350–1357.

Supporting Information for Publication

## **Differential Isotope Labelling of 38 Dietary Polyphenols and their Quantification in Urine by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry**

David Achaintre,<sup>†</sup> Audrey Buleté,<sup>‡</sup> Cécile Cren-Olivé,<sup>‡</sup> Liang Li,<sup>§</sup> Sabina Rinaldi,<sup>†</sup> Augustin Scalbert<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup>Biomarkers Group, Nutrition and Metabolism Section, International Agency for Research on Cancer (IARC), 69372 Lyon Cedex 08, France

<sup>‡</sup>Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280 CNRS (Equipe TRACES), Université Lyon 1, ENS-Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

<sup>§</sup>Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2G2 Canada

### **Content**

Table S1. Intra- and Inter-Batch Precision, Spike and Dilution Recovery for the Measurement of 38 Polyphenols.

**Table S1. Intra- and Inter-Batch Precision, Spike and Dilution Recovery for the Measurement of 38 Polyphenols**

Polyphenol	concentration ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	precision		accuracy			
		intra-batch CV (%) <sup>b</sup>	inter-batch CV (%) <sup>c</sup>	spike recovery (%) <sup>d</sup>	SD	dilution recovery (%) <sup>e</sup>	SD
4-hydroxybenzoic acid	10.6 - 19.8	5.0	8.4	106.9	10.3	97.8	6.5
3-hydroxybenzoic acid	0.113 - 0.505	7.2	7.6	91.1	5.6	149.4	25.7
protocatechuic acid	0.502 - 3.40	5.4	6.4	96.7	3.9	116.5	10.9
vanillic acid	4.52 - 19.7	4.2	7.9	96.4	9.9	99.6	4.7
3,5-dihydroxybenzoic acid	2.85 - 7.97	4.5	5.7	72.0	4.7	104.7	6.9
gallic acid	< LOQ - 1.65	9.6	15.1	49.3	8.1	94.2	8.0
gallic acid ethyl ester	< LOQ - 4.87	9.1	7.3	96.7	6.0	107.2	11.6
4-hydroxyphenylacetic acid	54.5 - 869	4.3	7.3	97.5	14.1	104.8	5.1
3-hydroxyphenylacetic acid	14.0 - 194	4.7	6.3	83.3	15.3	101.4	5.6
3,4-dihydroxyphenylacetic acid	4.41 - 27.3	4.3	7.5	73.2	5.4	107.4	7.5
homovanillic acid	12.8 - 31.4	4.0	5.5	84.1	11.0	116.9	11.3
3,4-dihydroxyphenylpropionic acid	0.437 - 13.5	4.7	6.3	100.1	5.5	98.6	9.3
3,5-dihydroxyphenylpropionic acid	6.88 - 20.0	6.8	8.4	103.2	8.8	84.2	4.9
<i>p</i> -coumaric acid	0.101 - 3.25	5.7	8.1	96.6	8.9	105.6	11.8
<i>m</i> -coumaric acid	0.271 - 2.32	4.1	10.6	99.1	2.6	100.2	10.9
caffeic acid	0.463 - 5.08	4.9	10.4	90.3	4.8	130.1	13.6
ferulic acid	3.73 - 30.7	3.9	7.0	87.5	14.9	101	6.9
kaempferol	< LOQ - 0.484	8.9	11.1	24.7	6.5	114.7	9.4
quercetin	< LOQ - 0.528	7.0	26.4	40.0	13.7	138.6	25.9
isorhamnetin	0.466 - 0.537	3.8	29.1	97.7	9.3	ND <sup>e</sup>	N/A
apigenin	0.020 - 0.103	7.5	25.1	90.8	7.8	N/A	N/A
naringenin	< LOQ - 8.03	6.5	9.8	88.5	3.5	124.6	14.5
hesperetin	< LOQ - 8.06	9.3	8.2	84.3	4.7	112.3	7.5
daidzein	< LOQ - 0.397	7.4	11.2	106.9	3.4	104	7.5
genistein	0.052 - 0.195	8.0	11.7	92.9	5.4	109.1	5.7
equol	0.038 - 0.420	6.1	7.5	99.8	3.4	107.2	9.8
phloretin	< LOQ - 3.79	7.3	21.4	59.7	18.3	111.1	9.5
(+)-catechin	< LOQ - 0.963	7.5	17.4	79.0	14.8	N/A	N/A
(-)-epicatechin	< LOQ - 8.26	6.0	17.5	72.8	11.4	119.9	16.3
(+)-gallic acid	< LOQ	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	63.5	17.4	ND <sup>e</sup>	N/A
(-)-epigallocatechin	< LOQ - 8.82	5.1	49.8	95.8	31.3	90.1	12.8
procyanidin dimers B1/B2 <sup>f</sup>	< LOQ	N/A	N/A	52.5	12.7	ND <sup>e</sup>	N/A
resveratrol	< LOQ - 0.772	7.5	10.0	77.5	8.4	114.3	12.0
tyrosol	0.047 - 3.10	4.1	7.5	94.3	1.7	102.9	4.2
hydroxytyrosol	0.316 - 7.68	4.9	7.9	98.4	7.7	112.5	11.0
enterodiol	0.072 - 2.94	5.0	6.0	99.6	8.1	94.1	3.9
enterolactone	0.521 - 6.46	3.9	5.2	100.3	4.1	103.1	7.6



<sup>a</sup>Range of concentrations in urine samples used for validation.

<sup>b</sup>Measured on 4 urine samples from the dietary intervention study.

<sup>c</sup>Measured on 2 samples from the dietary intervention study and the pooled urine sample from the EPIC study in 19 batches.

<sup>d</sup>Measured on 3 urine samples from the dietary intervention study (meal poor in polyphenols) spiked at 3 concentrations.

<sup>e</sup>Measured on 3 urine samples from the dietary intervention study at dilution 1/8, 1/4 and 1/2.

<sup>f</sup>Procyanidin dimers B1 and B2 could not be distinguished in the chromatograms.

<sup>g</sup>Not determined because of too low concentrations.

# CHAPITRE IV

**APPLICATION DE LA MÉTHODE DE  
DOSAGE DES POLYPHENOLS DANS  
L'URINE DANS UNE ÉTUDE  
TRANSVERSALE AU SEIN DE LA  
COHORTE EPIC**

## Contexte

Les polyphénols alimentaires constituent une vaste famille avec environ 500 composés différents possédant des structures et une distribution dans les aliments très variées. L'apport alimentaire des polyphénols varie entre ~0.5 et 2g/jour dans différents pays Européens<sup>91</sup>. L'absorption des polyphénols au niveau intestinal est fortement dépendante de leurs structures et est largement limitée au niveau duodénal. Les composés absorbés sont soumis à un important métabolisme de conjugaison de phase II dans les cellules intestinales et hépatiques, et sont rapidement éliminés dans l'urine ou la bile. Un cycle entéro-hépatique maintient néanmoins un pool de composés pendant un temps plus important. La grande majorité des polyphénols non absorbés au niveau duodénal subit un métabolisme important par le microbiote, produisant une quantité importante d'acides phénoliques. Ces derniers peuvent également être soumis à des conjugaisons de phase II<sup>47</sup>. Ce métabolisme est cependant influencé par différents facteurs comme le genre, l'âge, le BMI, l'activité du microbiote, des facteurs génétiques ou la matrice alimentaire<sup>436</sup>. L'exposition aux polyphénols habituellement mesurés par des questionnaires alimentaires ne peut évaluer avec précision ces facteurs. Une approche par des biomarqueurs permettrait une évaluation plus objective de l'exposition aux polyphénols et pourrait améliorer les études d'associations entre exposition et risque de maladies<sup>79</sup>. De plus les polyphénols mesurés dans une même analyse sont limités à quelques composés, comme les isoflavones ou les lignanes<sup>420, 437</sup>. Le développement d'une nouvelle méthode de quantification des polyphénols (Chapitre III) est mis à profit pour mesurer leurs concentrations urinaires chez 475 sujets de l'étude EPIC<sup>438</sup>.

## Objectifs

- Comparer l'excrétion urinaire des polyphénols chez des sujets provenant de 4 pays européens présentant une grande variabilité dans l'apport en polyphénols.
- Evaluer l'influence des facteurs alimentaires et du style de vie sur les concentrations urinaires en polyphénols.

## Approche

EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) est une vaste cohorte regroupant ½ million de personnes des 2 genres recrutées dans la population générale entre 1992 et 2000 dans 23 centres de 10 pays Européens. Les données utilisées dans cette étude dérivent de l'étude de calibration EPIC, dans laquelle un rappel alimentaire de 24h a été collecté sur un échantillon aléatoire des sujets de la cohorte (n=36.694). Dans un sous échantillon (n=1.386) les urines de 24h ont été collectées. Une fraction de ces échantillons (n=475) a été sélectionnée sur la base d'une collecte simultanée du rappel alimentaire de 24h et de l'échantillon d'urine. Les polyphénols ont été analysés dans ces échantillons par la méthode de dilution isotopique différentielle par spectrométrie de masse (Chapitre III).

Les niveaux d'excrétions urinaires des polyphénols sont représentés par la médiane et les 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. Une heatmap des coefficients de corrélations Pearson entre les

différents polyphénols a été générée. Les corrélations Spearman entre les concentrations urinaires des polyphénols et les consommations des groupes alimentaires ont été évaluées. Enfin l'analyse partielle des moindres carrés en composante principale a permis d'identifier et de quantifier les sources de variabilité et les tests de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour évaluer les différences de concentrations urinaires selon les facteurs démographiques et le style de vie.

## Principaux résultats

Des différences de concentration urinaire très importantes sont observées entre les polyphénols. Les acides phénoliques sont les plus abondants avec des niveaux d'excrétion de 157  $\mu\text{mol}/24\text{h}$  pour l'acide 4-hydroxyphénylacétique et des quantités de 20 à 50  $\mu\text{mol}/24\text{h}$  pour les acides 3-hydroxyphénylacétique, férulique, vanillique et homovanillique. A l'inverse l'equol, l'apigénine et le resvératrol présentent les niveaux d'excrétion les plus faibles avec des quantités inférieures à 0.1  $\mu\text{mol}/24\text{h}$ .

Des corrélations modérés à fortes ont été trouvées entre les polyphénols. Deux cas de figure se présentent avec en 1<sup>er</sup> lieu, une forte corrélation pour des composés simultanément présents dans la même source alimentaire avec par exemple les 2 isoflavones génistéine et daidzéine ( $r=0,83$ ) et les 2 flavanones naringénine et hespérétine ( $r=0,8$ ). De fortes corrélations sont aussi observées entre les métabolites microbiens et leurs précurseurs ou entre métabolites microbiens issus d'un même précurseur avec par exemple les acides 3,5-dihydrobenzoïque et 3,5-dihydroxyphénylacétique ( $r=0,86$ ), les acides protocatéchique et caféique ( $r=0,81$ ) ou l'entérolactone et l'entérodiol ( $r=0,82$ ). Une forte corrélation entre les acides férulique et caféique ( $r=0,8$ ) ou les acides 3,4-dihydroxyphénylacétique et homovanillique est expliquée par les réactions d'*O*-méthylations par les COMT

Les niveaux d'excrétion urinaire en polyphénols varient considérablement selon les centres avec des rapports de 1 à 10 pour la daidzéine, la naringénine ou l'hespérétine et des rapports de 1 à 5 pour le tyrosol, le resvératrol ou l'equol.

L'excrétion urinaire en polyphénols est associée à plusieurs facteurs sociodémographiques, et anthropométriques et au style de vie. La consommation d'alcool, l'apport calorique et le niveau d'éducation sont des sources de variabilité alors que l'âge, le tabac ou l'activité physique ne le sont pas.

Les corrélations entre l'excrétion en polyphénols et l'apport alimentaire souligne la cohérence des résultats analytiques et indique l'utilité potentielle de ces composés phénoliques comme biomarqueurs de l'alimentation.

## Conclusion

Cette étude montre d'importantes variations dans l'excrétion urinaire des polyphénols au sein de populations européennes. La mesure de ces polyphénols dans l'urine permet une évaluation plus fine de l'exposition aux polyphénols et donne la possibilité d'identifier d'autres associations avec le risque de maladies chronique dans de grandes études épidémiologiques.

## Article

**Contribution** : 2<sup>nd</sup> auteur. J'ai réalisé les analyses des polyphénols dans les urines et participé à la rédaction du manuscrit.

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Urinary excretions of 34 dietary polyphenols and their associations with lifestyle factors in the EPIC cohort study

Received: 04 February 2016

Accepted: 28 April 2016

Published: 07 June 2016

Raul Zamora-Ros<sup>1,2</sup>, David Achaintre<sup>1</sup>, Joseph A. Rothwell<sup>1</sup>, Sabina Rinaldi<sup>1</sup>, Nada Assi<sup>1</sup>, Pietro Ferrari<sup>1</sup>, Michael Leitzmann<sup>1</sup>, Marie-Christine Boutron-Ruault<sup>3</sup>, Guy Fagherazzi<sup>3</sup>, Aurélie Auffret<sup>3</sup>, Tilman Kühn<sup>4</sup>, Verena Katzke<sup>4</sup>, Heiner Boeing<sup>5</sup>, Antonia Trichopoulou<sup>6,7</sup>, Androniki Naska<sup>6,7</sup>, Effie Vasilopoulou<sup>7</sup>, Domenico Palli<sup>8</sup>, Sara Grioni<sup>9</sup>, Amalia Mattiello<sup>10</sup>, Rosario Tumino<sup>11</sup>, Fulvio Ricceri<sup>12</sup>, Nadia Slimani<sup>1</sup>, Isabelle Romieu<sup>1</sup> & Augustin Scalbert<sup>1</sup>

Urinary excretion of 34 dietary polyphenols and their variations according to diet and other lifestyle factors were measured by tandem mass spectrometry in 475 adult participants from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cross-sectional study. A single 24-hour urine sample was analysed for each subject from 4 European countries. The highest median levels were observed for phenolic acids such as 4-hydroxyphenylacetic acid (157  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ), followed by 3-hydroxyphenylacetic, ferulic, vanillic and homovanillic acids (20–50  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ). The lowest concentrations were observed for equol, apigenin and resveratrol (<0.1  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ). Urinary polyphenols significantly varied by centre, followed by alcohol intake, sex, educational level, and energy intake. This variability is largely explained by geographical variations in the diet, as suggested by the high correlations ( $r > 0.5$ ) observed between urinary polyphenols and the intake of their main food sources (e.g., resveratrol and gallic acid ethyl ester with red wine intake; caffeic, protocatechuic and ferulic acids with coffee consumption; and hesperetin and naringenin with citrus fruit intake). The large variations in urinary polyphenols observed are largely determined by food preferences. These polyphenol biomarkers should allow more accurate evaluation of the relationships between polyphenol exposure and the risk of chronic diseases in large epidemiological studies.

Polyphenols are non-nutritive plant secondary metabolites commonly found in the human diet. Over the past two decades, both experimental and epidemiological data have suggested a role of polyphenols in the prevention of chronic diseases, particularly cardiovascular diseases, type 2 diabetes and certain cancers<sup>1–4</sup>.

Dietary polyphenols constitute a large family of approximately 500 different compounds with very diverse structures and distribution in foods<sup>5</sup>. Daily intake of total polyphenols has been shown to vary between ~0.5 and 2 g/d across European countries<sup>6</sup>. Their absorption in the gut varies widely and is largely determined by their

<sup>1</sup>Nutrition and Metabolism Unit, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France. <sup>2</sup>Unit of Nutrition and Cancer, Epidemiology Research Program, Catalan Institute of Oncology, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Inserm, Centre for Research in Epidemiology and Population Health, and the Université Paris-Sud, and the Institute Gustave Roussy, Villejuif, France. <sup>4</sup>Division of Cancer Epidemiology, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany. <sup>5</sup>Department of Epidemiology, German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke, Nuthetal, Germany. <sup>6</sup>Hellenic Health Foundation, Athens, Greece. <sup>7</sup>WHO Collaborating Center for Nutrition and Health, Unit of Nutritional Epidemiology and Nutrition in Public Health, Dept. of Hygiene, Epidemiology and Medical Statistics, University of Athens Medical School, Greece. <sup>8</sup>Molecular and Nutritional Epidemiology Unit, Cancer Research and Prevention Institute – ISPO, Florence, Italy. <sup>9</sup>Epidemiology and Prevention Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy. <sup>10</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Federico II University Naples, Naples, Italy. <sup>11</sup>Cancer Registry and Histopathology Unit, “Civic - M.P. Arezzo” Hospital, ASP Ragusa, Italy. <sup>12</sup>Center for Cancer Prevention (CPO-Piemonte), and Human Genetic Foundation (HuGeF), Turin, Italy. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.S. (email: ScalbertA@iarc.fr)

chemical structures<sup>7</sup>. Once absorbed, most polyphenols undergo phase II conjugation and are rapidly eliminated in urine and bile as glucuronides and sulfate esters. Non-absorbed polyphenols as well as those excreted back to the gut lumen with the bile are extensively metabolized by the microbiota, producing a range of simple phenolic compounds. Polyphenol metabolism is known to be influenced by factors such as gender, age, body mass index (BMI), renal function, gut microbiota activity, recent use of antibiotics, and genetic traits<sup>8,9</sup>. Due to these many factors that may determine polyphenol bioavailability, biomarkers may be better indicators of polyphenol exposures and better predictors of disease risk than intake measurements assessed using dietary questionnaires<sup>3</sup>.

To date, concentrations of polyphenols have been measured in urine or blood in a limited number of epidemiologic studies<sup>3,10</sup>. However, the range of polyphenols simultaneously measured was limited to a few compounds, most often isoflavones or lignans. Recently, we developed a new method that allows the quantification in urine of 37 polyphenols and polyphenol metabolites representative of the major polyphenol classes and subclasses<sup>11</sup>.

These polyphenols are measured in urine from 475 participants of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. This study offers a unique opportunity to compare the urinary excretion of polyphenols in subjects from different European countries with a large variability in polyphenol intakes<sup>6</sup>. The influence of several lifestyle and dietary factors on urinary polyphenol concentrations is also examined.

## Material and Methods

**Study population.** The EPIC study is a large cohort study with over half a million participants of both genders mostly recruited from the general population between 1992 and 2000 in 23 centres from 10 European countries<sup>12</sup>. Data used in the present study were derived from the EPIC calibration study ( $n = 36,994$ ), in which a single 24-hour dietary recall (24-HDR) was collected from a random sample of the entire cohort<sup>13</sup>. In a convenience sub-sample ( $n = 1,386$ ), 24-hour urine specimens were collected between 1995 and 1999<sup>14</sup>. Individuals who collected the 24-hour urine specimen and the 24-HDR on the same day were included for the present study ( $n = 475$ ). The study was performed in accordance with the approved guidelines. Approval for the study was obtained from ethical review boards of the International Agency for Research on Cancer (IARC) and from all participating institutions. All participants provided written informed consent.

**24-Hour urine specimen.** 24-Hour urine samples were collected over 2 g boric acid used as preservative and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Completeness of collection was monitored using *p*-aminobenzoic acid (PABA) given to participants in tablet form<sup>14</sup>.

**Urinary polyphenol measurements.** Urine samples were first hydrolysed with a  $\beta$ -glucuronidase/sulfatase enzyme mixture and the resulting polyphenol aglycones were extracted twice with ethyl acetate. Quantitative dansylation of phenolic hydroxyl groups was carried out with either  $^{13}\text{C}$ -labelled dansyl chloride (samples) or non-labelled dansyl chloride (well-characterized reference pooled sample) as previously described<sup>11</sup>. Each  $^{13}\text{C}$ -dansylated sample was mixed with the  $^{12}\text{C}$ -dansylated reference sample, and the relative concentrations in samples over the reference sample were determined by UPLC-ESI-MS-MS in batches of 25 samples. Limits of quantification (LOQ) for the 37 polyphenols varied between  $0.01\ \mu\text{M}$  for equol and  $1.1\ \mu\text{M}$  for 4-hydroxyphenylacetic acid. Intra-batch coefficients of variation varied between 3.9% and 9.6% depending on polyphenols. Inter-batch variations were lower than 15% for 31 compounds and lower than 29% for 6 additional polyphenols out of the 38 tested.

**Dietary and lifestyle information.** Dietary data were collected using a single 24-HDR using a harmonized methodology (EPIC-Soft)<sup>15</sup>. The 24-HDR was administered in a face-to-face interview. Total energy and alcohol intakes were estimated by using the standardized country-specific EPIC Nutrient Database<sup>15</sup>. Data on lifestyle factors, including educational level, physical activity and smoking history, were collected at baseline through questionnaires<sup>13,16</sup>. Data on age, body weight and height were self-reported by study participants during the 24-HDR interview.

**Statistical analyses.** Urinary polyphenol concentrations that fell below the LOQ were set to values corresponding to half the limit of quantification<sup>17,18</sup>. Three polyphenols (procyanidins B1 and B2, and (+)-gallic acid) were excluded from the analysis, since 98–100% of the values were  $<\text{LOQ}$ <sup>11</sup>. Levels of polyphenol 24-hour urinary excretion are presented as medians and 10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentiles, since they had skewed distributions. Pearson correlation coefficients between excretion levels of the 34 remaining compounds were computed after log-transformation and visualized using a heatmap plot. Spearman correlation coefficients between the 34 urinary polyphenols and 110 plant-derived food groups were also calculated.

The sources of variability within the urinary polyphenol excretion pertaining to lifestyle characteristics and technical processing parameters were assessed using principal component partial R-square (PC-PR2) analysis<sup>19</sup>. PC-PR2 identifies and quantifies sources of variability by combining features of principal component analysis with those of multivariable linear regression analysis. In this study, the list of variables scrutinized included: age, sex, study centre, BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), alcohol intake ( $\text{g}/\text{d}$ ), educational level, smoking status, physical activity, and batch. Categorical variables were modelled using indicator variables in regression analyses. A variance threshold equal to 80% was used in the PC-PR2. Analytical missing values of urinary polyphenols were imputed using the expectation-maximization algorithm prior to PC-PR2 analysis<sup>20</sup>. Urinary polyphenols with a percentage of missing values greater than 20% (gallic acid and 3-hydroxyphenylacetic acid) were excluded from the PC-PR2 analysis. Kruskal-Wallis tests were used to assess differences of 34 urinary polyphenol levels according to demographic and lifestyle factors. The threshold for statistical significance was set after Bonferroni correction for the number of measured polyphenols, to a  $P$  value  $< 0.001$  ( $0.05/34$ ) (two-tailed).

All analyses were conducted using the R software, version R.3.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Centre (Country)	n	Women	Age	Never smoking	Physically inactive	University studies	BMI	Energy intake	Alcohol intake
		%	years*	%	%	%	kg/m <sup>2</sup> *	kcal/d*	g/d†
Ile-de-France (France)	67	100	53 (7)	67	19	43	23 (4)	2,082 (683)	9 (0–18)
Florence (Italy)	45	71	56 (6)	42	27	16	26 (4)	2,022 (546)	12 (0–21)
Varese (Italy)	51	37	57 (7)	45	8	6	25 (3)	2,525 (880)	12 (0–32)
Ragusa (Italy)	17	35	50 (7)	29	24	12	26 (4)	2,529 (999)	5 (0–25)
Turin (Italy)	42	48	53 (7)	52	36	29	25 (3)	2,439 (697)	22 (0–38)
Naples (Italy)	20	100	48 (6)	40	55	15	27 (5)	1,955 (545)	5 (0–12)
Greece	56	52	58 (11)	54	45	4	30 (4)	1,728 (659)	0 (0–8)
Heidelberg (Germany)	59	61	51 (9)	54	9	29	25 (5)	2,431 (995)	11 (1–38)
Potsdam (Germany)	118	41	54 (9)	48	31	41	27 (4)	2,212 (707)	1 (0–20)
TOTAL	475	58	54 (9)	51	26	26	26 (4)	2,200 (785)	8 (0–23)

**Table 1. Centre-specific characteristics of the study population.** \*mean (standard deviation). †median (25th–75th).

## Results

The 475 participants included in the study were 33–77 years old and mostly recruited from the general population residing in defined geographical areas in France (Paris and surroundings), Germany (Heidelberg and Potsdam), Greece (nation-wide) and Italy (Florence, Naples, Ragusa, Turin, and Varese). The percentage of women ranged from 35% (Ragusa) to 71% (Florence), except in France and Naples where only women were recruited (Table 1). Anthropometric and lifestyle characteristics are given in Table 1.

Thirty four polyphenols were detected and quantified in 24-hour urine collected in the 475 subjects. Medians of urinary excretion are shown in Table 2 and Fig. 1. 4-Hydroxyphenylacetic acid was the most abundant polyphenol in urine (157  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ), followed by 3-hydroxyphenylacetic, ferulic, vanillic and homovanillic acids, with excretion levels varying between 20 and 50  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ . Equol, apigenin and resveratrol were found in the lowest quantities ( $<0.1\ \mu\text{mol}/24\text{ h}$ ). A high percentage of participants with urinary concentrations below the limit of quantification was observed for isorhamnetin (55%), phloretin (52%), gallic acid ethyl ester (52%), (+)-catechin (37%), (–)-epicatechin (27%), hesperetin (26%) and apigenin (25%).

When correlations between urinary polyphenols were examined, forty-one moderate to high correlations ( $r > 0.5$ ) were found (Fig. 2). The highest correlations were observed for the following compounds: 3,5-dihydroxybenzoic acid and 3,5-dihydroxyphenylpropionic acid ( $r = 0.86$ ), genistein and daidzein ( $r = 0.83$ ), protocatechuic acid and caffeic acid ( $r = 0.81$ ), ferulic acid and caffeic acid ( $r = 0.80$ ), resveratrol and gallic acid ethyl ester ( $r = 0.80$ ), naringenin and hesperetin ( $r = 0.77$ ), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid ( $r = 0.77$ ), and caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid ( $r = 0.76$ ).

Large differences in the urinary excretion of each polyphenol were observed between subjects. PC-PR2 analysis showed that 23.5% of the total variance in urinary polyphenol excretion was explained by lifestyle and analytical factors. Study centre displayed the largest  $R_{\text{partial}}^2$  value (9.6%), followed by batch (5.1%) and alcohol intake (4.1%). The remaining factors (age, sex, BMI, educational level, smoking status, and physical activity) accounted for a minor fraction of the variability ( $<1.2\%$  for each factor).

Differences in polyphenol urinary excretion between study centres are illustrated in Fig. 1 and Supplemental Table 1. For example, median urinary excretion of hesperetin was 17-fold higher in Ragusa-Italy (7.8  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ) than in France (0.46  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ). Median excretion levels of daidzein were 15-fold higher in Heidelberg-Germany (2.38  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ) than in Ragusa-Italy (0.16  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ), 11-fold higher for naringenin in Ragusa-Italy (9.9  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ) than in France (0.91  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ), and 7-fold higher for tyrosol in Ragusa-Italy (2.56  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ) than in Potsdam-Germany (0.35  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ).

Variations of urinary polyphenol excretions according to other lifestyle factors were also examined. For sex, 10 urinary polyphenols were significantly more abundant in men than in women. Indeed, median urinary levels of tyrosol, hesperetin, naringenin, vanillic and 4-hydroxyphenylacetic acids were at least 1.4-fold higher in men than in women (Supplementary Table 2). For schooling level, urinary daidzein (3.1-fold change), enterolactone (1.8-fold change), gallic acid (1.6-fold change), and 4-hydroxybenzoic acid (1.2-fold change) levels were significantly lower in less educated people (none or primary school completed) compared to subjects with higher education (Supplementary Table 3). For total energy intake, higher levels of 7 polyphenols in urine (4-hydroxyphenylacetic, ferulic, vanillic, homovanillic, protocatechuic and *p*-coumaric acids, and equol) were observed in those who fell into the top tertile of energy intake (Supplementary Table 4). For BMI, only the excretion of gallic acid was significantly different across BMI subgroups (data not shown). Its level decreased with increasing BMI: 0.87  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$  for subjects with BMI  $<25\ \text{kg}/\text{m}^2$ , 0.64  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$  for subjects with BMI between 25 and 30  $\text{kg}/\text{m}^2$ , and 0.50  $\mu\text{mol}/24\text{ h}$  for subjects with BMI  $\geq 30\ \text{kg}/\text{m}^2$ . For total alcohol consumption, subjects drinking  $>20\ \text{g}$  of alcohol/d showed urinary concentrations 9-fold, 7-fold, 5-fold, 4-fold, 3-fold, and 2.3-fold higher for tyrosol, gallic acid ethyl ester, resveratrol, hydroxytyrosol, (+)-catechin, and gallic acid, respectively, when compared to subjects drinking  $<0.1\ \text{g}$  alcohol/d (Supplementary Table 5). No significant differences were observed for the remaining factors studied: age, smoking status, and physical activity (data not shown).

Correlations between urinary excretion of specific polyphenols and intakes of 110 food groups were systematically studied. Plant-derived foods were considered in this analysis due to the plant origin of polyphenols. The urinary excretions of a large number of the measured polyphenols were found to be correlated to the intake of 14



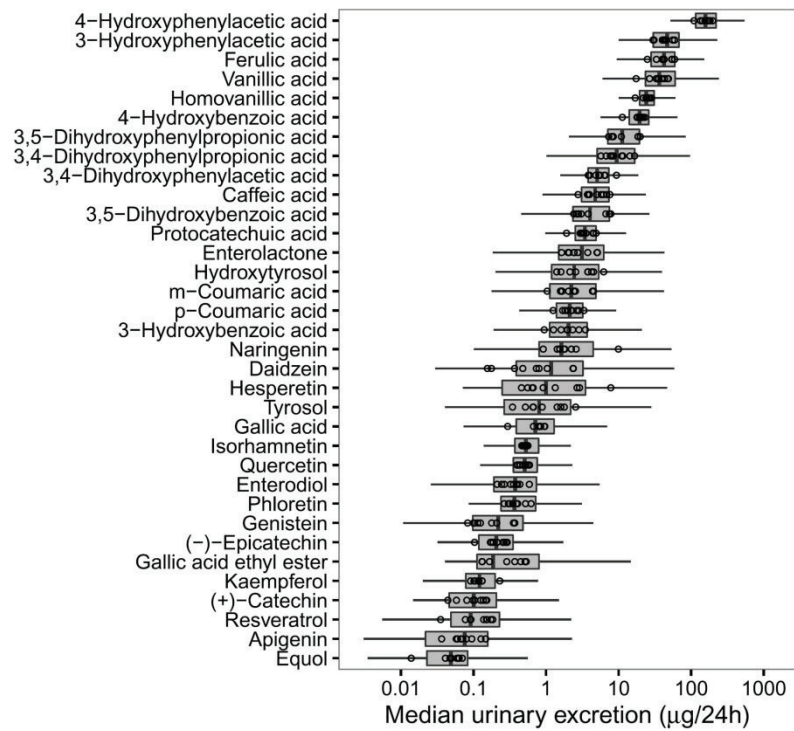
Urinary polyphenols	Polyphenol class/subclass	Origin <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	<LOQ (n)	Median	P10th	P90th
4-Hydroxybenzoic acid	Phenolic acids/Hydroxybenzoic acids	Microbiota	473	0	19.37	9.90	35.65
3-Hydroxybenzoic acid	Phenolic acids/Hydroxybenzoic acids	Microbiota	475	0	2.03	0.66	6.37
Protocatechuic acid	Phenolic acids/Hydroxybenzoic acids	Microbiota	475	0	3.43	1.80	6.30
Gallic acid	Phenolic acids/Hydroxybenzoic acids	Food	336	5	0.71	0.26	2.25
Vanillic acid	Phenolic acids/Hydroxybenzoic acids	Microbiota/food	464	0	36.45	14.59	93.76
3,5-Dihydroxybenzoic acid	Phenolic acids/Hydroxybenzoic acids	Microbiota	468	0	4.04	1.61	12.31
Gallic acid ethyl ester	Phenolic acids/Hydroxybenzoic acids	Food	450	234	0.19	0.08	2.65
4-Hydroxyphenylacetic acid	Phenolic acids/Hydroxyphenylacetic acids	Microbiota	474	0	156.82	91.19	324.80
3-Hydroxyphenylacetic acid	Phenolic acids/Hydroxyphenylacetic acids	Microbiota	299	11	46.72	19.93	95.50
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	Phenolic acids/Hydroxyphenylacetic acids	Microbiota	475	0	5.06	2.82	10.69
Homovanillic acid	Phenolic acids/Hydroxyphenylacetic acids	Microbiota/endogenous	475	0	24.08	15.63	38.70
3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	Phenolic acids/Hydroxyphenylpropanoic acids	Microbiota	453	0	9.45	3.24	29.02
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	Phenolic acids/Hydroxyphenylpropanoic acids	Microbiota	473	0	11.19	4.60	28.44
<i>p</i> -Coumaric acid	Phenolic acids/Hydroxycinnamic acids	Food/microbiota	464	0	2.13	0.92	4.82
<i>m</i> -Coumaric acid	Phenolic acids/Hydroxycinnamic acids	Microbiota	467	8	2.22	0.55	9.57
Caffeic acid	Phenolic acids/Hydroxycinnamic acids	Food	475	0	4.75	1.98	10.60
Ferulic acid	Phenolic acids/Hydroxycinnamic acids	Endogenous/food	470	0	42.21	18.37	83.02
Kaempferol	Flavonoids/Flavonols	Food	408	35	0.12	0.05	0.30
Quercetin	Flavonoids/Flavonols	Food	444	0	0.51	0.23	1.10
Isorhamnetin	Flavonoids/Flavonols	Endogenous	462	255	0.52	0.27	1.17
Apigenin	Flavonoids/Flavones	Food	448	113	0.08	0.01	0.34
Naringenin	Flavonoids/Flavanones	Food	470	11	1.63	0.43	9.32
Hesperetin	Flavonoids/Flavanones	Food	469	122	1.00	0.16	8.29
Daidzein	Flavonoids/Isoflavonoids	Food	407	13	1.18	0.14	8.33
Genistein	Flavonoids/Isoflavonoids	Food	413	12	0.22	0.05	1.19
Equol	Flavonoids/Isoflavonoids	Microbiota	397	54	0.05	0.01	0.14
Phloretin	Flavonoids/Dihydrochalcones	Food	475	248	0.37	0.17	1.14
(+)-Catechin	Flavonoids/Flavanols	Food	452	165	0.10	0.03	0.37
(-)-Epicatechin	Flavonoids/Flavanols	Food	456	123	0.21	0.08	0.55
Resveratrol	Stilbenes	Food	429	52	0.09	0.02	0.54
Tyrosol	Tyrosols	Food	457	0	0.80	0.10	5.25
Hydroxytyrosol	Tyrosols	Food	474	0	2.44	0.75	12.85
Enterodiol	Lignans	Microbiota	433	22	0.37	0.09	1.73
Enterolactone	Lignans	Microbiota	469	3	3.12	0.54	12.22

**Table 2. Urinary polyphenol excretion ( $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ) in 475 subjects from the EPIC cohort.** LOQ, limit of quantification; P, percentile <sup>1</sup>The main origin of the phenolic compound in urine is indicated. Food: the compound present in food is directly absorbed in the gut or it is absorbed after hydrolysis of the corresponding glycosides or esters. Microbiota: the compound results from the transformation by the microbiota of food polyphenols and/or eventually other food or endogenous compounds. Endogenous: the compounds results from the *O*-methylation of phenolic compounds of food or endogenous origin. <sup>2</sup>Number of samples in which each phenolic compound was firmly identified.

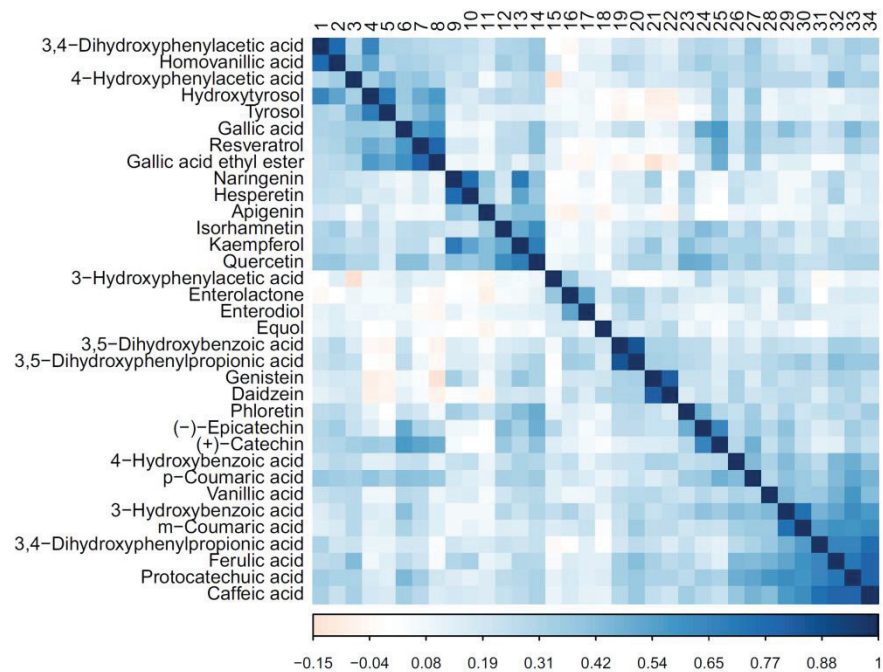
of the 110 plant-derived food groups documented in the 24-HDR (Table 3)<sup>19,20</sup>. For each of these food groups, polyphenols were ranked according to their Spearman correlation coefficient. The first two to nine most highly correlated polyphenols are shown in Table 3. Correlations with 4 of these food groups need to be interpreted with caution due to the high percentage of non-consumers (>90%): olives (90.7%), berries (91.2%), grapes (96.4%), and soy products (98.1%). Correlations of polyphenols with intake of these 4 polyphenol-rich food groups were low (data not shown). In addition, correlation between urinary excretion of equol and intake of dairy products was also examined because of the known occurrence of equol in these food products<sup>21</sup>. Statistically significant correlations between levels of urinary equol and the intake of dairy products ( $r = 0.33$ ), especially with milk ( $r = 0.27$ ) and cheese ( $r = 0.18$ ), were found. Correlations between intake of polyphenol-rich foods or food groups were also examined. Correlations were low (data not shown) except for olive oil and coffee intake ( $r = -0.48$ ).

## Discussion

In the current study, a new analytical method was used to estimate, in an adult European population, the concentrations of 34 urinary polyphenols of all main polyphenol classes: flavonoids, phenolic acids, lignans and stilbenes. These polyphenols detected in urine after enzymatic deconjugation are either parent compounds as found in food, phenolic microbial metabolites or *O*-methylated tissular metabolites (Table 2). Far fewer polyphenols



**Figure 1.** Urinary polyphenol concentrations by study centre in the EPIC cohort. Dots in the boxplot are the medians of urinary polyphenol concentrations in each centre.



**Figure 2.** Heatmap of Pearson correlations between the log-transformed urinary polyphenol excretions in the EPIC study.

Food	Consumers (n)	Polyphenol (Spearman correlation coefficient)
Red wine	121	Gallic acid ethyl ester (0.69), resveratrol (0.59), gallic acid (0.48), hydroxytyrosol (0.43), tyrosol (0.36), (+)-catechin (0.34), <i>p</i> -coumaric acid (0.27), 4-hydroxyphenylacetic acid (0.19), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (0.15)
Coffee	410	Caffeic acid (0.65), protocatechuic acid (0.60), ferulic acid (0.58), <i>m</i> -coumaric acid (0.53), 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid (0.51), 3-hydroxybenzoic acid (0.39), vanillic acid (0.31)
Tea	117	Gallic acid (0.38), (–)-epicatechin (0.30), (+)-catechin (0.22), quercetin (0.19)
Chocolate	111	(–)-Epicatechin (0.22), vanillic acid (0.15)
Citrus fruits	185	Hesperetin (0.60), naringenin (0.56), kaempferol (0.33)
Citrus juices	131	Hesperetin (0.15), naringenin (0.15), kaempferol (0.10)
Apple and pear	226	Phloretin (0.40), (–)-epicatechin (0.20), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (0.19), homovanillic acid (0.16)
Berries	42	<i>p</i> -Coumaric acid (0.20), (+)-catechin (0.19)
Onion, garlic	220	Quercetin (0.17), apigenin (0.11), isorhamnetin (0.10)
Olive oil	238	Hydroxytyrosol (0.36), tyrosol (0.31), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (0.17), apigenin (0.17)
Olives	44	Hydroxytyrosol (0.34), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (0.29), homovanillic acid (0.22), tyrosol (0.11)
Bread, non-white	260	3,5-Dihydroxybenzoic acid (0.45), 3,5-dihydroxyphenylpropionic acid (0.43), enterolactone (0.25), daidzein (0.20), enterodiol (0.20), genistein (0.19), <i>m</i> -coumaric acid (0.16), ferulic acid (0.13)
Breakfast cereals	32	3,5-Dihydroxybenzoic acid (0.17), 3,5-dihydroxyphenylpropionic acid (0.16), daidzein (0.15), equol (0.08), enterolactone (0.08)
Soya products	9	Genistein (0.17), daidzein (0.10)

**Table 3. Urinary polyphenols most highly correlated to recent food intake in the EPIC cohort.** The top two to nine polyphenols (out of 34 measured polyphenols) most highly correlated with the intake of each food group are listed. The number of reported correlations for each food group was based on current knowledge on polyphenol food composition and polyphenol metabolism. Some additional polyphenols may also be correlated to intake of each food, but they were excluded if not known as a component of the food considered or as a possible metabolite derived from a component of this food.

were measured in previous population studies<sup>22,23</sup>, most of them being focused on the analysis of a specific polyphenol class, such as stilbenes<sup>24</sup>, phytoestrogens (isoflavones and lignans)<sup>25</sup>, or alkylresorcinols<sup>26</sup>.

As expected, levels of urinary excretion varied highly between polyphenols. The most abundant urinary polyphenols detected in our study were phenolic acids formed by the microbiota: 4- and 3-hydroxyphenylacetic acids, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, protocatechuic acid (and their *O*-methylated metabolites: homovanillic acid and vanillic acid, respectively), 4-hydroxybenzoic acid, 3,5- and 3,4-dihydroxyphenylpropionic acids, and 3,5-dihydroxybenzoic acid<sup>27</sup>, with median excretion levels ranging from 3.4 to 157  $\mu\text{mol}/24\text{h}$ . These phenolic acids are produced by microbial transformation of a wide range of dietary polyphenols<sup>28,29</sup>, as well as endogenous metabolites such as dopamine<sup>30</sup> and aromatic amino acids<sup>31</sup>. Two hydroxycinnamic acids were also excreted in urine at high levels: caffeic acid (4.7  $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ) mainly derived from the hydrolysis of caffeoyl esters such as chlorogenic acids abundant in coffee, and ferulic acid (42  $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ) that may originate both from *O*-methylation of caffeic acid in the tissues and the hydrolysis in the gut of ferulic acid esterified to cereal cell walls<sup>32</sup>. Urinary levels of flavonoids, lignans, tyrosols and stilbenes were low (median excretions <3.1  $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ). These low levels are explained by either low intakes (e.g. isoflavonoids, stilbenes, lignans, tyrosols)<sup>6,33</sup>, or poor absorption (often 0.1–10% depending on the specific polyphenol)<sup>7</sup>. Levels of polyphenol urinary excretion were comparable to those of 11 polyphenols previously measured in a population of 53 French adults<sup>22</sup>.

Excretion levels of the different polyphenols showed correlations that can be explained by either co-occurrence in a given food group or by metabolic parentage. Typical examples of food co-occurrence are genistein and daidzein in soy products ( $r = 0.82$ ), resveratrol and gallic acid ethyl ester in wine ( $r = 0.76$ ), naringenin and hesperetin in citrus fruits ( $r = 0.78$ ), tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil ( $r = 0.70$ ), (–)-epicatechin and (+)-catechin in tea, apple, wine and chocolate ( $r = 0.66$ ), phloretin and quercetin ( $r = 0.53$ ) and phloretin and (–)-epicatechin ( $r = 0.49$ ) in apple<sup>34,35</sup>. Correlations between metabolites participating in a common metabolic pathway involve both metabolites linked through microbial catabolic reactions and *O*-methylation reactions carried out in tissues such as the liver. High correlations were observed between microbial metabolites and their precursors: 3,5-dihydroxyphenylpropionic acid and 3,5-dihydroxybenzoic acid ( $r = 0.86$ ), two main metabolites of alkylresorcinols<sup>36</sup>, enterodiol and enterolactone ( $r = 0.50$ ), *m*-coumaric acid and 3-hydroxybenzoic acid ( $r = 0.71$ ), caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid ( $r = 0.74$ ), caffeic acid and protocatechuic acid ( $r = 0.79$ ), and protocatechuic acid and 3-hydroxybenzoic acid ( $r = 0.58$ ). *O*-methylation reactions explain correlations between 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid ( $r = 0.76$ ), quercetin and isorhamnetin ( $r = 0.64$ ), protocatechuic acid and vanillic acid ( $r = 0.52$ ), and caffeic acid and ferulic acid ( $r = 0.79$ ). The particularly high correlation observed between caffeic and ferulic acids suggests that ferulic acid originates mainly

from the *O*-methylation of caffeic acid, although the weak correlation observed with intake of non-white bread (Table 3) also supports its formation through hydrolysis of ferulic acid bound to cereal cell walls<sup>37</sup>.

Urinary polyphenol excretion differed widely according to study centre, with 10-fold higher changes for hesperetin, naringenin and daidzein, and 5-fold higher changes for tyrosol, resveratrol and equol. Similar magnitudes of changes in plasma concentrations between centres were observed for isoflavones (13-fold for daidzein and 8-fold for genistein) and lignans (4-fold for enterolignans) in a previous EPIC study<sup>25</sup>. These large variations of urinary excretions across study centres could be due to differences in dietary patterns across European countries. Polyphenols and polyphenol-rich foods are consumed diversely across centres of the EPIC study<sup>6</sup>, and polyphenol urinary excretion is expected to differ similarly.

In addition to study centre, polyphenol urinary excretion was found to be associated with several other socio-demographic, lifestyle and anthropometric factors, Total alcohol consumption was a relevant source of variability. Among sources of alcohol, red wine is particularly rich in polyphenols and its consumption varies widely between study centres<sup>38</sup>. In the current study, red wine was significantly correlated with levels of several polyphenols in urine, including gallic acid ethyl ester and resveratrol. Men also excreted more polyphenols than women, although differences were relatively small (<2.4) compared to differences by study centre or alcohol consumption. A potential explanation is that men consume more calories than women (mean 2,502 vs. 2,108 kcal/d), and higher total energy intake was shown to be positively associated with higher polyphenol intake<sup>6</sup>. This is consistent with the higher urinary excretion of polyphenols we observed in subjects in the highest tertile of total energy intake. Concentrations of 4-hydroxyphenylacetic, ferulic, vanillic, homovanillic and *p*-coumaric acids were higher in men and in subjects consuming more calories. Higher polyphenol excretion in men can also be explained by a higher consumption of coffee in men as compared to women (343 vs. 244 mL/d). In agreement with this interpretation, two of the compounds showing higher concentrations in men (ferulic and vanillic acids; see Table 3) were also highly correlated with coffee consumption. Education level was associated with the excretion of certain phenolic compounds. Subjects with no or only a primary level of education had lower levels of 4-hydroxybenzoic acid, enterolactone, daidzein and gallic acid than those with a higher education level. Polyphenol intake was also previously found to be higher in people with a university degree than in those without one<sup>6</sup>. Concentrations of gallic acid in urine were inversely associated with BMI. They were also moderately correlated with tea and wine consumption ( $r = 0.44$  and  $0.45$ , respectively), which are usually related to a healthier lifestyle and higher education level<sup>39</sup>. Dietary flavonoids, characteristic of wine and tea<sup>34</sup>, are also higher in subjects with lower BMI (<25 kg/m<sup>2</sup>) in the EPIC cohort<sup>6,40</sup>. No differences were observed by age, smoking status, and physical activity.

Correlations between urinary polyphenol excretions and food intake (Table 3) show the consistency of our analytical results and point towards the potential use of these phenolic compounds as dietary biomarkers<sup>10,41</sup>. As expected, we observed high correlations between red wine intake and the main polyphenols coming from red wine, such as gallic acid ethyl ester ( $r = 0.69$ ) and resveratrol ( $r = 0.59$ )<sup>41,42</sup>. These correlations are similar to those observed with total alcohol consumption. High correlations were also observed between coffee consumption and caffeic acid ( $r = 0.65$ ), and citrus fruit intake and hesperetin and naringenin ( $r = 0.60$  and  $0.56$  respectively)<sup>43</sup>. Weaker correlations ( $0.31 < r < 0.45$ ) were observed between tea intake and gallic acid, apple intake and phloretin, olive oil consumption and hydroxytyrosol and tyrosol, non-white bread intake and 3,5-dihydroxybenzoic acid and 3,5-dihydroxyphenylpropionic acid. All these phenolic compounds are known to be characteristic of the foods with which they are correlated or particularly abundant in these foods<sup>34</sup> and several of them have been proposed as biomarkers of intake for these foods<sup>41,44–46</sup>. Correlation of urinary equol with consumption of dairy products ( $r = 0.33$ ) provides new information of their dietary sources in this population. Equol, a metabolite of daidzein formed by the gut microbiota, was detected in 86% of the subjects (Table 2). Its correlation with dairy products and not soy food intake provides new evidence of its dairy origin through its formation from daidzein in the rumen of cows fed soybeans and secretion in milk<sup>21</sup>.

The magnitude of the correlations observed between polyphenols in urine and food intake depends on various factors, including the reliability of the dietary intake measurements, the variability of polyphenol contents in a given food, the existence of confounders such as other foods containing the same polyphenol or polyphenol precursors (see in Table 3, gallic acid correlated with both red wine and tea, ferulic acid correlated with both coffee and non-white bread, hydroxytyrosol correlated with both red wine and olive oil), and inter-individual variability in the transformation of the food parent compound to the phenolic biomarker. For these reasons, levels of correlation observed here have limited value *per se* to evaluate the usefulness of a potential biomarker. However, they are useful indicators when comparing the potential value of different biomarkers for a particular food. Polyphenols showing the highest correlations (Table 3) should also be the best predictors of food intake in this population.

This study is the first showing variations of a broad profile of urinary polyphenols in healthy European people. The present study has a number of strengths, in particular the novel analytical method based on the use of tandem mass spectrometry, which made possible the estimation of a large number of polyphenols. Another advantage was the collection of 24 h urine samples rather than spot urine samples, which is not so common in large epidemiological studies. Furthermore, methods of urine collection, sample handling and storage, and dietary assessment were highly standardized in all study centres<sup>14</sup>. The main limitation of the current study is that our results are not fully generalizable, since not all EPIC cohorts are population-based<sup>12</sup>. Another limitation is that exposure to some important polyphenols could not be measured in urine with our method (anthocyanidins and gallocatechins) or could not be measured with sufficient sensitivity (e.g. proanthocyanidin dimers not detected)<sup>11</sup>. Finally, no data are available regarding the effect of long term storage on the concentrations of urinary polyphenols, although a prior study has shown that urinary resveratrol concentrations remained unchanged when samples had been stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 5 years<sup>47,48</sup>. However, possible degradation of test compounds in urine over time should affect similar to all participants since all samples have a long but relatively similar storage time.

In conclusion, this study shows large variations in excretions of urinary polyphenols across adult European populations, reflecting considerable variability in the consumption of polyphenol-rich foods. Some of these

urinary polyphenols may also be used as dietary biomarkers for some polyphenol-rich foods, and further research in other large epidemiological studies and intervention studies is warranted for further validation. Measurement of these polyphenols in urine should allow more accurate evaluation of polyphenol exposure to reveal new associations with risk of chronic diseases in large epidemiological studies.

## References

1. Wang, X., Ouyang, Y. Y., Liu, J. & Zhao, G. Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Br J Nutr.* **111**, 1–11 (2014).
2. van Dam, R. M., Naidoo, N. & Landberg, R. Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings. *Curr Opin Lipidol.* **24**, 25–33 (2013).
3. Zamora-Ros, R., Touillaud, M., Rothwell, J. A., Romieu, I. & Scalbert, A. Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: current tools and applications and their limits. *Am J Clin Nutr.* **100**, 11–26 (2014).
4. Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J. & Spencer, J. P. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients.* **2**, 1106–1131 (2010).
5. Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Vos, F. & Scalbert, A. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J Agric Food Chem.* **58**, 4959–4969 (2010).
6. Zamora-Ros, R. *et al.* Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Nutr.* Epub ahead of print (2015).
7. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. & Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* **81** Suppl 1, 230S–242S (2005).
8. Williamson, G. & Clifford, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br J Nutr.* **104** Suppl 3, S48–S66 (2010).
9. Zamora-Ros, R. *et al.* Comparison of 24-h volume and creatinine-corrected total urinary polyphenol as a biomarker of total dietary polyphenols in the Invecchiare in Chianti study. *Anal Chim Acta.* **704**, 110–115 (2011).
10. Perez-Jimenez, J. *et al.* Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* **92**, 801–809 (2010).
11. Achaintre, D. *et al.* Differential Isotope Labelling of 38 Dietary Polyphenols and their Quantification in Urine by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem.* **88**, 2637–2644 (2016).
12. Riboli, E. & Kaaks, R. The EPIC Project: rationale and study design. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Epidemiol.* **26** Suppl 1, S6–S14 (1997).
13. Slimani, N. *et al.* European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) calibration study: rationale, design and population characteristics. *Public Health Nutr.* **5**, 1125–1145 (2002).
14. Slimani, N. *et al.* Group level validation of protein intakes estimated by 24-hour diet recall and dietary questionnaires against 24-hour urinary nitrogen in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) calibration study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **12**, 784–795 (2003).
15. Slimani, N. *et al.* Standardization of the 24-hour diet recall calibration method used in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC): general concepts and preliminary results. *Eur J Clin Nutr.* **54**, 900–917 (2000).
16. Wareham, N. J. *et al.* Validity and repeatability of a simple index derived from the short physical activity questionnaire used in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr.* **6**, 407–413 (2003).
17. Helsel, D. R. Less than obvious—statistical treatment of data below the detection limit. *Environ Sci Technol.* **24**, 1766–1774 (1990).
18. Accorsi, A. *et al.* Urinary sevoflurane and hexafluoro-isopropanol as biomarkers of low-level occupational exposure to sevoflurane. *Int Arch Occup Environ Health.* **78**, 369–378 (2005).
19. Fages, A. *et al.* Investigating sources of variability in metabolomic data in the EPIC study: the Principal Component Partial R-square (PC-PR2) method. *Metabolomics.* **10**, 1074–1083 (2014).
20. Dempster, A. P., Laird, N. M. & Rubin, D. B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol.* **39**, 1–38 (1977).
21. Kuhnle, G. G. C. *et al.* Phytoestrogen content of foods of animal origin: dairy products, eggs, meat, fish, and seafood. *J Agric Food Chem.* **56**, 10099–10104 (2008).
22. Mennen, L. I. *et al.* Urinary excretion of 13 dietary flavonoids and phenolic acids in free-living healthy subjects - variability and possible use as biomarkers of polyphenol intake. *Eur J Clin Nutr.* **62**, 519–525 (2008).
23. Magiera, S., Baranowska, I. & Kusa, J. Development and validation of UHPLC-ESI-MS/MS method for the determination of selected cardiovascular drugs, polyphenols and their metabolites in human urine. *Talanta.* **89**, 47–56 (2012).
24. Urpi-Sarda, M. *et al.* HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans. *Clin Chem.* **53**, 292–299 (2007).
25. Peeters, P. H. *et al.* Variations in plasma phytoestrogen concentrations in European adults. *J Nutr.* **137**, 1294–1300 (2007).
26. Landberg, R. *et al.* Determinants of plasma alkylresorcinol concentration in Danish post-menopausal women. *Eur J Clin Nutr.* **65**, 94–101 (2011).
27. Selma, M. V., Espin, J. C. & Tomas-Barberan, F. A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem.* **57**, 6485–6501 (2009).
28. Rothwell, J. A. *et al.* Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database. *Mol Nutr Food Res.* **60**, 203–211 (2015).
29. Crozier, A., Del Rio, D. & Clifford, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med.* **31**, 446–467 (2010).
30. Ebinger, G., Michotte, Y. & Herregodts, P. The significance of homovanillic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations in human lumbar cerebrospinal fluid. *J Neurochem.* **48**, 1725–1729 (1987).
31. Okuda, S. *et al.* KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways. *Nucleic Acids Res.* **36** Web Server issue: W423–W426 (2008).
32. Adam, A. *et al.* The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J Nutr.* **132**, 1962–1968 (2002).
33. Perez-Jimenez, J. *et al.* Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr.* **93**, 1220–1228 (2011).
34. Neveu, V. *et al.* Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)*. **2010**, bap024 (2010).
35. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **79**, 727–747 (2004).
36. Ross, A. B., Aman, P. & Kamal-Eldin, A. Identification of cereal alkylresorcinol metabolites in human urine-potential biomarkers of wholegrain wheat and rye intake. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **809**, 125–130 (2004).
37. Adam, A. *et al.* The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J Nutr.* **132**, 1962–1968 (2002).

38. Sieri, S. *et al.* Alcohol consumption patterns, diet and body weight in 10 European countries. *Eur J Clin Nutr.* **63** Suppl 4, S81–S100 (2009).
39. Zamora-Ros, R. *et al.* Dietary intakes and food sources of phenolic acids in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Nutr.* **110**, 1500–1511 (2013).
40. Zamora-Ros, R. *et al.* Differences in dietary intakes, food sources, and determinants of total flavonoids between Mediterranean and non-Mediterranean countries participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Nutr.* **109**, 1498–1507 (2013).
41. Edmands, W. M. *et al.* Polyphenol metabolome in human urine and its association with intake of polyphenol-rich foods across European countries. *Am J Clin Nutr.* **102**, 905–913 (2015).
42. Zamora-Ros, R. *et al.* Resveratrol metabolites in urine as a biomarker of wine intake in free-living subjects: The PREDIMED Study. *Free Radic Biol Med.* **46**, 1562–1566 (2009).
43. Gonthier, M. P., Verny, M. A., Besson, C., Rémésy, C. & Scalbert, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr.* **133**, 1853–1859 (2003).
44. Scalbert, A. *et al.* The food metabolome: a window over dietary exposure. *Am J Clin Nutr.* **99**, 1286–1308 (2014).
45. Mennen, L. I. *et al.* Urinary flavonoids and phenolic acids as biomarkers of intake for polyphenol-rich foods. *Br J Nutr.* **96**, 191–198 (2006).
46. Landberg, R. *et al.* Alkylresorcinol metabolite concentrations in spot urine samples correlated with whole grain and cereal fiber intake but showed low to modest reproducibility over one to three years in U.S. women. *J Nutr.* **142**, 872–877 (2012).
47. Urpi-Sarda M. *et al.* HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans. *Clin Chem.* **53**, 292–299 (2007).
48. Medina-Remon A. *et al.* Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Anal Chim Acta.* **634**, 54–60 (2009).

### Acknowledgements

We thank Mr. Bertrand Hémon for his valuable help with the EPIC database. This work was supported by the Institut National du Cancer, Paris (INCa grant 2011-105) and the Wereld Kanker Onderzoek Fonds (WCRF NL 2012/604). The national cohorts are supported by the French National Cancer Institute (L'Institut National du Cancer; INCA grant 2009-139); Ligue contre le Cancer, Institut Gustave Roussy, Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) (France); German Cancer Aid; German Cancer Research Center (DKFZ); German Federal Ministry of Education and Research (Germany); the Hellenic Health Foundation (Greece); Italian Association for Research on Cancer (AIRC-Italy). The work reported in this paper was undertaken during the tenure of a Senior Visiting Scientist Award granted by the International Agency for Research on Cancer (Michael Leitzman).

### Author Contributions

R.Z.-R., I.R. and A.S. designed the research. D.A. and S.R. performed the laboratory analysis; R.Z.-R., J.A.R. and N.A. performed the statistical analysis. R.Z.-R., S.R., P.F., M.L. and A.S. interpreted the results. R.Z.-R. and A.S. wrote the paper. R.Z.-R., D.A., J.A.R., S.R., N.A., P.F., M.L., M.-C.B.-R., G.F., A.A., T.K., V.K., H.B., A.T., A.N., E.V., D.P., S.G., A.M., R.T., F.R., N.S., I.R., A.S. contributed to recruitment, data collection/acquisition, follow-up and/or management of the EPIC cohort, as well as the interpretation of the present findings and approval of the final version for publication.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Zamora-Ros, R. *et al.* Urinary excretions of 34 dietary polyphenols and their associations with lifestyle factors in the EPIC cohort study. *Sci. Rep.* **6**, 26905; doi: 10.1038/srep26905 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## **Supplementary material**

### **Urinary excretions of 34 dietary polyphenols and their associations with lifestyle factors in the EPIC cohort study**

Raul Zamora-Ros, David Achaintre, Joseph A. Rothwell, Sabina Rinaldi, Nada Assi, Pietro Ferrari, Michael Leitzmann, Marie-Christine Boutron-Ruault, Guy Fagherazzi, Aurélie Auffret, Tilman Kühn, Verena Katzke, Heiner Boeing, Antonia Trichopoulou, Androniki Naska, Effie Vasilopoulou, Domenico Palli, Sara Grioni, Amalia Mattiello, Rosario Tumino, Fulvio Ricceri, Nadia Slimani, Isabelle Romieu, Augustin Scalbert

Supplementary Table 1a. Urinary polyphenol concentrations by study centre in the EPIC cohort.

Urinary polyphenols ( $\mu\text{mol}/24\text{h}$ )	Florence (n=45)					Varese (n=51)					Ragusa (n=17)					Turin (n=42)					Naples (n=20)				
	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	
4-Hydroxybenzoic acid	44	18.0	9.56	28.8	51	17.9	9.60	31.0	17	21.8	14.4	36.5	42	21.1	12.8	57.4	20	18.2	9.56	30.6	20	18.2	9.56	30.6	
3-Hydroxybenzoic acid	45	1.61	0.58	3.75	51	1.27	0.60	3.88	17	1.98	0.77	6.52	42	1.95	0.97	3.90	20	1.95	0.94	8.04	20	1.95	0.94	8.04	
Protocatechuic acid	45	3.08	1.88	6.09	51	2.95	1.84	5.16	17	4.53	2.46	6.85	42	3.56	2.30	5.98	20	3.34	1.26	5.07	20	3.34	1.26	5.07	
Gallic acid	31	0.84	0.37	2.38	41	0.96	0.25	1.97	14	0.67	0.36	2.06	31	0.84	0.36	2.54	15	0.95	0.23	2.25	15	0.95	0.23	2.25	
Vanillic acid	45	35.8	14.3	63.2	46	34.0	17.6	140	17	43.0	17.7	124	38	47.3	18.3	117.7	20	33.0	15.1	74.9	20	33.0	15.1	74.9	
3,5-Dihydroxybenzoic acid	45	2.61	1.66	6.22	49	2.80	1.39	4.52	17	6.67	2.93	12.4	42	2.76	1.40	7.90	20	3.81	1.42	15.6	20	3.81	1.42	15.6	
Gallic acid ethyl ester	45	0.45	0.08	5.00	49	0.53	0.09	3.97	15	0.52	0.07	4.20	41	0.37	0.09	4.47	18	0.29	0.08	4.18	18	0.29	0.08	4.18	
4-Hydroxyphenylacetic acid	44	143	95.2	232	51	198	108	405	17	179	112	325	42	167	103	352	20	134	83.6	296	20	134	83.6	296	
3-Hydroxyphenylacetic acid	31	40.0	23.5	90.8	27	41.5	10.1	95.5	5	29.8	0.1	68.6	28	55.5	28.0	91.5	17	43.2	11.6	103	17	43.2	11.6	103	
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	45	5.35	3.32	9.13	51	5.55	3.36	9.68	17	9.35	5.13	24.0	42	6.51	4.56	15.4	20	5.49	3.28	21.9	20	5.49	3.28	21.9	
Homovanillic acid	45	26.0	16.5	41.1	51	24.7	18.0	37.0	17	28.5	18.5	51.0	42	26.8	19.9	40.1	20	24.6	15.2	60.6	20	24.6	15.2	60.6	
3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	45	8.49	3.90	21.3	50	8.06	2.92	18.1	13	14.3	8.30	35.6	40	7.68	3.32	38.0	19	11.1	2.63	23.8	19	11.1	2.63	23.8	
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	45	8.45	4.52	19.6	51	7.30	3.46	13.3	17	18.5	6.17	29.5	42	8.33	3.65	15.6	20	11.0	3.53	23.5	20	11.0	3.53	23.5	
p-Coumaric acid	45	1.83	0.75	3.36	51	1.96	0.92	3.96	17	3.33	1.45	6.27	42	2.83	1.39	6.10	19	1.69	0.78	4.47	19	1.69	0.78	4.47	
m-Coumaric acid	44	1.58	0.55	5.07	50	1.64	0.47	4.72	17	2.54	0.70	8.93	39	2.42	0.67	7.37	20	1.67	0.39	4.43	20	1.67	0.39	4.43	
Caffeic acid	45	3.87	1.98	7.70	51	3.97	1.98	7.59	17	6.85	3.15	15.9	42	5.02	3.12	9.14	20	5.76	1.85	7.38	20	5.76	1.85	7.38	
Ferulic acid	45	40.4	19.2	64.4	51	42.3	19.7	68.5	17	59.2	16.2	91.4	40	40.1	16.8	70.7	20	42.5	19.8	63.6	20	42.5	19.8	63.6	
Kaempferol	36	0.10	0.06	0.40	36	0.12	0.05	0.27	15	0.23	0.08	0.51	40	0.12	0.05	0.30	18	0.09	0.05	0.42	18	0.09	0.05	0.42	
Quercetin	43	0.51	0.27	0.85	46	0.48	0.21	1.17	13	0.43	0.22	0.93	39	0.44	0.22	0.99	20	0.41	0.23	0.87	20	0.41	0.23	0.87	
Isorhamnetin	44	0.49	0.27	1.07	50	0.46	0.24	1.04	16	0.53	0.19	1.29	40	0.48	0.28	0.98	20	0.56	0.25	1.57	20	0.56	0.25	1.57	
Apigenin	40	0.13	0.04	0.53	51	0.06	0.02	0.31	16	0.15	0.02	1.16	40	0.07	0.01	0.30	17	0.07	0.01	0.16	17	0.07	0.01	0.16	
Naringenin	44	2.24	0.57	18.7	50	2.61	0.79	12.8	17	9.93	1.54	18.0	42	1.42	0.29	7.80	20	1.78	0.53	5.52	20	1.78	0.53	5.52	
Hesperetin	45	2.67	0.14	12.4	49	2.89	0.20	13.9	17	7.80	1.01	20.4	41	0.56	0.11	8.29	20	0.68	0.16	5.99	20	0.68	0.16	5.99	
Daidzein	34	0.48	0.14	4.98	40	0.73	0.16	8.77	10	0.16	0.09	2.23	28	0.81	0.18	5.37	15	0.37	0.12	6.55	15	0.37	0.12	6.55	



Genistein	38	0.11	0.04	0.92	41	0.18	0.07	1.04	9	0.10	0.06	0.51	38	0.10	0.03	0.65	19	0.12	0.01	0.64
Equol	37	0.05	0.01	0.12	46	0.06	0.01	0.15	15	0.06	0.01	0.10	35	0.05	0.01	0.14	16	0.07	0.04	0.16
Phloretin	45	0.30	0.15	0.87	51	0.35	0.17	0.97	17	0.62	0.14	1.14	42	0.39	0.19	1.50	20	0.34	0.16	0.88
(+)-Catechin	42	0.10	0.02	0.26	49	0.13	0.03	0.31	16	0.08	0.03	0.26	42	0.15	0.04	0.67	19	0.06	0.02	0.55
(-)-Epicatechin	42	0.18	0.05	0.34	48	0.21	0.09	0.46	14	0.19	0.08	0.36	40	0.25	0.10	0.70	20	0.17	0.06	0.48
Resveratrol	40	0.17	0.03	0.84	46	0.15	0.03	0.95	16	0.19	0.04	1.21	38	0.15	0.02	0.69	18	0.09	0.03	0.84
Tyrosol	45	1.60	0.57	6.00	49	1.78	0.21	5.50	17	2.56	0.26	7.31	39	1.42	0.32	5.88	19	0.67	0.16	2.16
Hydroxytyrosol	45	3.76	1.28	11.4	51	3.78	0.83	9.76	17	6.23	2.32	33.6	41	4.52	1.50	20.4	20	4.27	1.33	53.9
Enterodiol	40	0.36	0.07	0.69	45	0.21	0.05	1.04	16	0.25	0.06	0.63	38	0.32	0.05	1.42	19	0.27	0.06	1.35
Enterolactone	45	2.01	0.54	6.08	51	1.64	0.36	4.09	17	2.44	0.46	6.01	42	2.73	0.32	5.45	20	2.08	0.43	4.60

Supplementary Table 1b. Urinary polyphenol concentrations by study centre in the EPIC cohort.

	Greece (n=56)					Ile-de-France (n=67)					Heidelberg (n=59)					Potsdam (n=118)					Fold change	P-value
	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th		
4-Hydroxybenzoic acid	55	11	5.1	26	67	19	11.6	36	59	20	13.3	33	118	23	12.3	44	2.0				<0.001	
3-Hydroxybenzoic acid	56	0.9	0.2	3.2	67	2.3	0.9	5.5	59	3.5	0.8	10	118	2.8	1.1	9.0	3.7				0.006	
Protocatechuic acid	56	1.92	0.89	3.06	67	3.22	2.03	5.65	59	4.90	2.47	8.86	118	4.42	2.34	6.86	2.6				<0.001	
Gallic acid	44	0.3	0.1	0.6	49	0.8	0.4	2.8	37	0.8	0.4	2.2	74	0.8	0.3	2.4	3.3				<0.001	
Vanillic acid	56	17.4	5.1	61.3	67	26.7	13.9	63.7	59	39.2	22.0	104	116	48.6	24.8	97.3	2.8				<0.001	
3,5-Dihydroxybenzoic acid	56	2.4	0.9	6.1	66	3.1	1.4	8.6	59	7.8	3.1	16.2	114	7.5	3.3	13.5	3.2				<0.001	
Gallic acid ethyl ester	53	0.1	0.09	0.3	65	0.5	0.1	2.5	58	0.2	0.1	1.2	106	0.1	0.1	1.1	4.1				<0.001	
4-Hydroxyphenylacetic acid	56	109.37	64.08	221.1	67	155.06	90.54	247.1	59	182.2	93.14	363.6	118	171.0	98.50	357.9	1.8				<0.001	
3-Hydroxyphenylacetic acid	30	30.76	14.13	90.7	55	59.10	33.78	95.0	33	45.3	19.82	131.5	73	43.6	23.61	91.9	2.0				<0.001	
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	56	3.98	2.15	12.6	67	3.82	2.50	8.83	59	6.38	3.36	12.8	118	4.85	2.97	7.36	2.4				<0.001	
Homovanillic acid	56	16.93	10.70	40.93	67	21.95	16.03	41.18	59	27.42	14.38	40.8	118	23.88	16.51	33.5	1.7				<0.001	
3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	56	5.70	1.52	21.60	66	6.74	3.50	17.77	56	16.63	5.77	47.8	108	11.42	3.43	32.4	2.9				<0.001	
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	56	8.08	3.85	15.0	67	8.18	4.00	21.61	59	19.85	9.27	40.3	116	18.47	9.48	34.0	2.7				<0.001	
p-Coumaric acid	56	1.25	0.51	4.1	67	2.22	1.32	4.68	57	2.64	1.33	6.1	110	2.27	1.21	4.35	2.7				<0.001	
m-Coumaric acid	54	1.04	0.11	2.40	67	2.04	0.50	5.73	59	4.51	1.71	19.1	117	4.36	1.13	17.6	4.4				<0.001	
Caffeic acid	56	2.76	1.08	5.40	67	3.72	2.30	6.96	59	7.59	2.66	14.99	118	6.17	2.36	11.98	2.7				<0.001	
Ferulic acid	56	24.86	8.92	45.05	67	33.19	15.86	63.10	58	53.93	29.26	94.4	116	54.78	29.45	96.79	2.4				<0.001	
Kaempferol	50	0.11	0.04	0.25	64	0.12	0.04	0.3	52	0.13	0.05	0.24	97	0.13	0.06	0.27	2.5				<0.001	
Quercetin	55	0.40	0.20	0.84	67	0.53	0.25	1.17	53	0.59	0.28	1.1	108	0.56	0.24	1.3	1.5				<0.001	
Isorhamnetin	56	0.52	0.29	1.04	66	0.50	0.36	1.69	58	0.56	0.30	1.28	112	0.53	0.25	1.02	1.2				<0.001	
Apigenin	53	0.09	0.02	0.36	66	0.04	0.01	0.24	55	0.08	0.01	0.42	110	0.06	0.01	0.24	4.0				<0.001	
Naringenin	55	1.54	0.43	8.60	67	0.91	0.33	10.84	59	1.55	0.52	8.15	116	1.81	0.50	7.13	10.9				<0.001	
Hesperetin	55	0.66	0.16	7.59	66	0.46	0.13	1.46	59	0.91	0.16	4.50	117	1.34	0.16	6.98	17.0				0.47	
Daidzein	47	0.18	0.04	3.17	61	1.04	0.20	6.68	56	2.38	0.71	17.52	116	2.35	0.44	10.97	15.3				0.018	

Genistein	42	0.08	0.02	0.38	57	0.21	0.08	1.05	58	0.36	0.11	2.60	111	0.37	0.11	1.57	4.5	<0.001
Equol	40	0.01	0.01	0.10	57	0.04	0.01	0.14	48	0.06	0.01	0.41	103	0.05	0.01	0.12	5.1	<0.001
Phloretin	56	0.27	0.17	0.74	67	0.31	0.15	0.91	59	0.41	0.18	1.37	118	0.52	0.19	1.61	2.3	<0.001
(+)-Catechin	55	0.04	0.03	0.12	65	0.14	0.04	0.41	52	0.15	0.04	0.48	112	0.10	0.03	0.36	3.4	<0.001
(-)-Epicatechin	55	0.10	0.07	0.27	65	0.28	0.09	0.61	58	0.29	0.08	0.88	114	0.26	0.10	0.59	2.8	<0.001
Resveratrol	50	0.04	0.02	0.10	64	0.14	0.03	0.48	53	0.09	0.04	0.24	104	0.08	0.03	0.54	5.4	0.09
Tyrosol	56	0.88	0.11	4.43	66	0.66	0.11	2.77	54	0.52	0.08	6.14	112	0.35	0.07	4.40	7.4	<0.001
Hydroxytyrosol	56	2.13	0.75	23.00	67	1.60	0.68	6.98	59	2.56	0.71	16.11	118	1.40	0.50	4.19	4.4	<0.001
Enterodiol	49	0.39	0.06	4.12	61	0.40	0.15	1.18	58	0.59	0.13	4.35	107	0.44	0.13	1.73	2.8	<0.001
Enterolactone	52	2.43	0.35	14.49	67	3.76	1.07	10.82	58	5.04	1.06	23.02	117	5.11	0.82	17.93	3.1	<0.001

Significant P value <0.001 (0.05/35) using Kruskal-Wallis test

Supplementary Table 2. Urinary polyphenol concentrations by sex in the EPIC cohort

Urinary polyphenols ( $\mu\text{mol}/24\text{h}$ )	Men				Women				Fold change	P- value
	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th		
4-Hydroxybenzoic acid	197	21.6	16.0	26.9	276	18.0	12.9	25.0	1.2	<0.001
3-Hydroxybenzoic acid	198	2.14	1.09	3.90	277	1.94	1.13	3.49	1.1	0.31
Protocatechuic acid	198	3.85	2.63	5.44	277	3.21	2.49	4.57	1.2	0.002
Gallic acid	152	0.83	0.37	1.61	184	0.65	0.40	1.07	1.3	0.16
Vanillic acid	190	43.3	29.1	74.5	274	30.6	20.4	50.2	1.4	<0.001
3,5-Dihydroxybenzoic acid	193	4.17	2.64	7.97	275	3.95	2.13	6.83	1.1	0.028
Gallic acid ethyl ester	191	0.19	0.12	1.20	259	0.18	0.11	0.66	1.1	0.11
4-Hydroxyphenylacetic acid	197	191	140	268	277	135	108	188	1.4	<0.001
3-Hydroxyphenylacetic acid	96	43.1	27.7	65.9	203	50.0	31.1	69.1	1.2	0.08
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	198	5.79	4.25	7.84	277	4.75	3.45	6.70	1.2	<0.001
Homovanillic acid	198	26.9	21.6	32.3	277	22.1	18.1	28.5	1.2	<0.001
3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	187	11.1	5.21	19.1	266	8.43	5.03	14.9	1.3	0.039
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	197	13.3	7.69	22.2	276	10.3	6.08	17.6	1.3	0.001
p-Coumaric acid	190	2.44	1.60	3.73	274	1.96	1.33	2.93	1.2	<0.001
m-Coumaric acid	194	2.70	1.20	6.14	273	2.05	1.06	4.31	1.3	0.003
Caffeic acid	198	5.33	3.15	8.48	277	4.43	3.06	6.75	1.2	0.032
Ferulic acid	195	51.0	33.4	72.5	275	36.9	25.0	51.0	1.4	<0.001
Kaempferol	162	0.13	0.09	0.20	246	0.12	0.07	0.19	1.1	0.06
Quercetin	184	0.55	0.40	0.85	260	0.47	0.32	0.68	1.2	<0.001
Isorhamnetin	190	0.58	0.39	0.85	272	0.49	0.36	0.74	1.2	0.037
Apigenin	184	0.07	0.03	0.16	264	0.08	0.02	0.16	1.0	0.72
Naringenin	195	2.23	0.92	5.59	275	1.44	0.73	3.31	1.6	<0.001
Hesperetin	195	1.60	0.44	5.47	274	0.81	0.22	2.74	2.0	<0.001
Daidzein	173	1.85	0.39	3.91	234	1.00	0.39	2.61	1.9	0.06
Genistein	169	0.29	0.11	0.69	244	0.18	0.09	0.37	1.6	0.003
Equol	164	0.05	0.02	0.08	233	0.05	0.02	0.09	1.0	0.68
Phloretin	198	0.47	0.25	0.82	277	0.34	0.23	0.66	1.4	0.002
(-)-Epicatechin	192	0.23	0.14	0.38	264	0.19	0.10	0.32	1.2	0.003
(+)-Catechin	187	0.12	0.06	0.23	265	0.08	0.04	0.18	1.5	0.002
Resveratrol	179	0.10	0.05	0.33	250	0.09	0.04	0.19	1.2	0.010
Tyrosol	185	1.58	0.36	3.92	272	0.65	0.25	1.43	2.4	<0.001
Hydroxytyrosol	197	2.82	1.37	6.81	277	2.21	1.10	4.52	1.3	0.043
Enterodiol	181	0.34	0.18	0.69	252	0.41	0.21	0.79	1.2	0.10
Enterolactone	195	3.12	1.20	6.54	274	3.13	1.65	6.08	1.0	0.69

Significant P value <0.001 (0.05/35) using Kruskal-Wallis test

Supplementary Table 3. Urinary polyphenol concentrations by the highest educational level in the EPIC cohort

Urinary polyphenols ( $\mu\text{mol}/24\text{h}$ )	None and primary school					Technical and secondary school					University			Fold change	P-value
	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th			
	4-Hydroxybenzoic acid	181	17.4	12.1	23.6	170	20.9	15.8	27.6	122	19.9	15.0	27.1		
3-Hydroxybenzoic acid	182	1.84	0.98	3.21	171	2.24	1.21	3.90	122	2.30	1.28	4.37	1.3	0.004	
Protocatechuic acid	182	3.06	2.03	4.65	171	3.56	2.88	4.90	122	3.83	2.58	5.20	1.3	0.002	
Gallic acid	128	0.56	0.32	1.10	121	0.67	0.41	1.15	87	0.90	0.54	1.92	1.6	<0.001	
Vanillic acid	181	32.6	20.3	61.3	166	36.4	24.8	57.7	117	40.0	25.2	63.5	1.2	0.26	
3,5-Dihydroxybenzoic acid	181	3.57	2.13	6.22	168	4.06	2.54	7.12	119	4.79	2.63	8.92	1.3	0.003	
Gallic acid ethyl ester	171	0.18	0.12	0.87	161	0.21	0.11	0.60	118	0.19	0.11	1.07	1.1	0.81	
4-Hydroxyphenylacetic acid	182	142	108	200	170	171	117	239	122	156	116	233	1.2	0.022	
3-Hydroxyphenylacetic acid	111	41.8	27.1	62.8	104	50.5	33.6	68.9	84	47.2	31.4	79.0	1.2	0.09	
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	182	4.90	3.62	7.55	171	5.54	3.83	7.41	122	5.01	3.81	6.69	1.1	0.32	
Homovanillic acid	182	23.3	17.6	30.6	171	25.2	19.8	31.9	122	23.6	20.3	28.8	1.1	0.16	
3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	178	9.05	4.97	17.3	160	9.41	5.58	14.2	115	9.76	4.67	18.1	1.1	0.99	
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	182	9.80	6.14	16.6	170	11.4	7.12	19.3	121	14.2	7.89	24.6	1.4	0.001	
p-Coumaric acid	181	1.80	1.17	3.17	168	2.10	1.49	3.07	115	2.33	1.69	3.44	1.3	0.007	
m-Coumaric acid	177	1.83	1.00	3.92	169	2.64	1.35	5.44	121	2.49	1.11	5.07	1.4	0.005	
Ferulic acid	181	38.7	25.0	56.0	169	44.4	30.7	58.4	120	47.0	29.4	70.6	1.2	0.002	
Caffeic acid	182	4.23	2.62	6.90	171	5.25	3.34	7.50	122	4.77	3.19	8.43	1.2	0.06	
Kaempferol	156	0.12	0.08	0.21	144	0.12	0.08	0.18	108	0.12	0.08	0.21	1.0	0.71	
Quercetin	171	0.49	0.33	0.74	155	0.54	0.36	0.78	118	0.52	0.37	0.76	1.1	0.59	
Isorhamnetin	180	0.53	0.37	0.80	167	0.52	0.38	0.75	115	0.51	0.36	0.85	1.1	0.82	
Apigenin	174	0.09	0.04	0.22	159	0.06	0.02	0.13	115	0.07	0.02	0.15	1.4	0.009	
Naringenin	180	1.98	0.88	5.10	168	1.60	0.79	4.67	122	1.38	0.77	3.40	1.4	0.11	
Hesperetin	180	1.28	0.25	4.33	168	1.05	0.33	3.50	121	0.77	0.22	2.86	1.7	0.09	
Daidzein	149	0.60	0.18	1.99	147	1.83	0.59	4.20	111	1.81	0.60	3.93	3.1	<0.001	

Genistein	155	0.17	0.07	0.35	149	0.23	0.11	0.53	109	0.30	0.11	0.61	1.8	0.005
Equol	153	0.04	0.02	0.08	142	0.05	0.03	0.09	102	0.05	0.03	0.10	1.2	0.12
Phloretin	182	0.36	0.24	0.72	171	0.37	0.23	0.68	122	0.39	0.25	0.74	1.1	0.79
(+)-Catechin	171	0.08	0.04	0.17	164	0.12	0.05	0.21	117	0.11	0.05	0.23	1.5	0.045
(-)-Epicatechin	174	0.18	0.10	0.33	162	0.22	0.14	0.36	120	0.25	0.13	0.41	1.4	0.018
Resveratrol	162	0.08	0.04	0.21	154	0.09	0.05	0.21	113	0.12	0.06	0.26	1.6	0.07
Tyrosol	176	0.76	0.26	1.88	167	0.77	0.22	2.43	114	0.86	0.34	2.27	1.1	0.39
Hydroxytyrosol	182	2.46	1.20	5.43	170	2.25	1.10	5.61	122	2.44	1.37	4.19	1.1	0.77
Enterodiol	166	0.36	0.17	0.82	156	0.36	0.16	0.70	111	0.40	0.26	0.72	1.1	0.26
Enterolactone	179	2.45	1.23	4.58	169	3.15	1.30	6.01	121	4.50	2.05	8.57	1.8	<0.001

---

Significant P value <0.001 (0.05/35) using Kruskal-Wallis test

Supplementary Table 4. Urinary polyphenol concentrations by total energy intake in the EPIC cohort

Urinary polyphenols (µmol/24h)	<1780kcal/d			1780-2375kcal/d			>2375kcal/d			Fold change	P-value			
	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	N			Median	10th	90th
4-Hydroxybenzoic acid	157	17.4	12.5	24.2	158	20.0	13.9	26.0	158	20.4	15.9	26.7	1.2	0.013
3-Hydroxybenzoic acid	158	1.85	1.09	3.62	159	1.98	1.07	3.53	158	2.30	1.23	3.97	1.2	0.12
Protocatechuic acid	158	3.05	2.17	4.12	159	3.47	2.41	5.05	158	3.96	2.87	5.68	1.3	<0.001
Gallic acid	108	0.51	0.33	0.97	111	0.72	0.42	1.39	117	0.84	0.51	1.56	1.7	0.023
Vanillic acid	158	29.5	18.3	49.1	156	32.7	22.6	55.7	150	43.3	28.5	73.2	1.5	<0.001
3,5-Dihydroxybenzoic acid	157	3.82	2.12	6.27	155	4.04	2.39	7.80	156	4.19	2.67	8.30	1.1	0.023
Gallic acid ethyl ester	147	0.16	0.11	0.42	150	0.21	0.10	1.02	153	0.23	0.12	1.16	1.4	0.046
4-Hydroxyphenylacetic acid	158	134	103	192	158	153	111	210	158	187	136	261	1.4	<0.001
3-Hydroxyphenylacetic acid	111	44.2	29.6	66.7	103	44.6	29.2	65.8	85	53.3	32.4	70.7	1.2	0.28
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	158	4.82	3.41	6.13	159	5.00	3.73	7.35	158	5.59	4.14	8.09	1.2	0.001
Homovanillic acid	158	21.8	17.9	27.5	159	25.1	20.0	31.5	158	25.8	20.7	32.1	1.2	<0.001
3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	150	8.24	4.86	14.1	155	9.05	5.02	17.3	148	10.7	5.70	18.1	1.3	0.11
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	156	10.2	5.82	17.3	159	12.5	7.12	20.8	158	11.7	7.69	20.3	1.2	0.07
p-Coumaric acid	155	1.95	1.25	2.90	154	2.03	1.33	3.14	155	2.38	1.68	3.88	1.2	<0.001
m-Coumaric acid	158	2.03	0.94	4.35	153	2.24	1.13	4.70	156	2.63	1.45	6.19	1.3	0.010
Caffeic acid	158	4.17	3.08	6.90	159	4.64	2.81	6.96	158	5.41	3.29	8.41	1.3	0.032
Ferulic acid	156	37.8	24.7	50.7	158	40.7	29.0	59.4	156	49.1	29.6	66.3	1.3	<0.001
Kaempferol	133	0.12	0.07	0.18	140	0.12	0.08	0.20	135	0.13	0.09	0.21	1.1	0.26
Quercetin	144	0.45	0.31	0.69	153	0.52	0.37	0.75	147	0.55	0.38	0.81	1.2	0.039
Isorhamnetin	155	0.51	0.39	0.77	156	0.54	0.35	0.81	151	0.53	0.39	0.78	1.1	0.84
Apigenin	150	0.07	0.03	0.14	150	0.07	0.02	0.16	148	0.08	0.02	0.18	1.2	0.77
Naringenin	157	1.47	0.75	4.80	158	1.62	0.92	3.35	155	1.94	0.79	4.57	1.3	0.71
Hesperetin	155	0.99	0.24	4.03	158	0.99	0.32	3.36	156	1.08	0.23	3.44	1.1	0.93
Daidzein	133	0.81	0.22	2.26	134	1.89	0.41	3.93	140	1.64	0.45	3.61	2.3	0.006
Genistein	129	0.17	0.08	0.35	145	0.23	0.10	0.60	139	0.28	0.11	0.59	1.6	0.008

Equol	129	0.04	0.02	0.06	132	0.05	0.03	0.09	136	0.06	0.03	0.10	1.7	<0.001
Phloretin	158	0.36	0.24	0.69	159	0.38	0.22	0.80	158	0.36	0.25	0.70	1.1	0.75
(+)-Catechin	155	0.08	0.04	0.18	148	0.10	0.04	0.21	149	0.13	0.06	0.22	1.5	0.006
(-)-Epicatechin	153	0.18	0.10	0.31	149	0.20	0.13	0.36	154	0.23	0.13	0.37	1.3	0.018
Resveratrol	141	0.08	0.03	0.19	140	0.08	0.05	0.20	148	0.11	0.06	0.31	1.4	0.003
Tyrosol	153	0.64	0.21	1.68	154	0.77	0.25	1.89	150	1.10	0.40	3.44	1.7	0.005
Hydroxytyrosol	158	2.08	1.08	3.48	159	2.69	1.19	5.22	157	2.99	1.43	6.98	1.4	0.006
Enterodiol	140	0.37	0.18	0.78	148	0.36	0.17	0.69	145	0.39	0.22	0.72	1.1	0.73
Enterolactone	154	3.01	1.34	6.04	158	3.09	1.50	5.65	157	3.24	1.56	7.11	1.1	0.62

Significant P value <0.001 (0.05/35) using Kruskal-Wallis test



Supplementary Table 5. Urinary polyphenol concentrations by baseline alcohol intake in the EPIC cohort

Urinary polyphenols ( $\mu\text{mol}/24\text{h}$ )	<0.1g/d				0.1-20g/d				>20g/d				Fold change	P-value
	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th	N	Median	10th	90th		
4-Hydroxybenzoic acid	151	17.6	12.1	23.9	189	19.5	14.1	25.3	133	21.4	15.8	27.8	1.2	0.009
3-Hydroxybenzoic acid	151	1.57	0.84	3.48	190	2.11	1.21	3.59	134	2.36	1.34	4.60	1.5	0.001
Protocatechuic acid	151	2.90	1.99	4.50	190	3.55	2.63	5.05	134	3.83	2.90	5.61	1.3	<0.001
Galic acid	91	0.48	0.29	0.72	133	0.68	0.38	1.11	112	1.08	0.64	1.98	2.3	<0.001
Vanillic acid	149	31.9	19.0	56.8	187	35.5	22.8	57.7	128	42.1	27.2	64.4	1.3	0.018
3,5-Dihydroxybenzoic acid	149	4.09	2.13	7.72	186	4.48	2.61	7.95	133	3.65	2.38	6.75	1.2	0.262
Galic acid ethyl ester	137	0.13	0.09	0.17	182	0.19	0.11	0.65	131	0.92	0.25	2.83	7.2	<0.001
4-Hydroxyphenylacetic acid	151	121	92	171	190	151	115	206	133	204	158	273	1.7	<0.001
3-Hydroxyphenylacetic acid	101	48.4	28.1	66.1	126	44.3	29.5	66.5	72	52.8	33.1	69.7	1.2	0.34
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	151	4.58	3.16	6.26	190	4.91	3.67	6.83	134	6.24	4.86	8.10	1.4	<0.001
Homovanillic acid	151	22.9	17.3	28.9	190	22.9	19.0	29.8	134	26.4	21.3	32.3	1.2	<0.001
3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	146	7.81	4.43	15.9	181	10.3	5.78	16.6	126	9.41	5.31	18.5	1.3	0.09
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	150	10.7	6.14	19.6	189	12.6	7.59	19.8	134	10.5	6.88	18.5	1.2	0.34
p-Coumaric acid	150	1.63	1.01	2.41	184	2.19	1.40	3.04	130	2.82	1.95	4.72	1.7	<0.001
m-Coumaric acid	147	1.66	0.73	4.31	189	2.28	1.37	4.10	131	3.08	1.48	6.95	1.9	<0.001
Ferulic acid	151	36.9	24.6	51.8	187	42.5	29.7	61.6	132	45.6	30.4	61.8	1.2	<0.001
Caffeic acid	151	3.87	2.58	6.18	190	5.24	3.16	7.25	134	5.39	3.62	8.35	1.4	<0.001
Kaempferol	134	0.12	0.07	0.18	160	0.13	0.08	0.21	114	0.12	0.09	0.21	1.1	0.44
Quercetin	144	0.43	0.29	0.68	176	0.52	0.38	0.77	124	0.54	0.42	0.79	1.3	0.004
Isorhamnetin	149	0.52	0.36	0.74	182	0.52	0.36	0.79	131	0.53	0.39	0.85	1.0	0.72
Apigenin	140	0.08	0.02	0.18	180	0.07	0.03	0.16	128	0.08	0.02	0.15	1.1	0.88
Naringenin	149	1.46	0.75	3.25	190	1.90	0.87	4.66	131	1.60	0.82	4.58	1.3	0.30
Hesperetin	147	0.76	0.22	2.29	189	1.25	0.26	3.90	133	1.00	0.35	4.95	1.6	0.026
Daidzein	128	1.01	0.33	2.54	171	1.30	0.43	4.08	108	1.37	0.43	3.69	1.4	0.14

Genistein	128	0.18	0.08	0.43	172	0.26	0.12	0.63	113	0.21	0.10	0.38	1.5	0.050
Equol	124	0.05	0.02	0.08	167	0.05	0.02	0.09	106	0.05	0.02	0.08	1.1	0.75
Phloretin	151	0.34	0.22	0.72	190	0.39	0.25	0.79	134	0.36	0.25	0.65	1.1	0.41
(+)-Catechin	144	0.06	0.04	0.12	179	0.09	0.04	0.17	129	0.18	0.11	0.34	3.1	<0.001
(-)-Epicatechin	143	0.18	0.10	0.32	184	0.21	0.12	0.35	129	0.26	0.15	0.40	1.5	0.006
Resveratrol	134	0.05	0.03	0.08	174	0.10	0.05	0.19	121	0.25	0.10	0.54	4.8	<0.001
Tyrosol	151	0.36	0.13	0.98	189	0.60	0.27	1.57	117	3.25	1.69	5.88	9.0	<0.001
Hydroxytyrosol	151	1.48	0.84	2.68	190	2.05	1.16	3.89	133	6.07	3.19	11.5	4.1	<0.001
Enterodiol	139	0.31	0.17	0.72	172	0.46	0.21	0.78	122	0.35	0.19	0.69	1.5	0.28
Enterolactone	148	2.62	1.11	4.76	189	3.28	1.64	6.96	132	3.36	1.67	6.16	1.3	0.032

**CHAPITRE V**  
**DÉVELOPPEMENT D'UNE**  
**MÉTHODE DE MESURE DE 38**  
**POLYPHÉNOLS DANS LE**  
**PLASMA**

## Contexte

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans l'ensemble du règne végétal et plus de 500 composés différents dans plus de 450 denrées alimentaires ont été recensés<sup>45</sup>. Leurs rôles dans la prévention du cancer colorectal est encore à déterminer. En effet, les résultats des études épidémiologiques cas-témoins ou de cohortes sont encore contradictoires<sup>5-6</sup>, et ne permettent pas d'étayer les nombreuses études *in vitro* ou chez l'animal<sup>1, 386</sup>. Les études épidémiologiques sont généralement réalisées sur la base de questionnaires alimentaires et celles effectuées avec des biomarqueurs sont peu nombreuses et comportent seulement une classe ou sous classe de composés<sup>439</sup>. Afin d'évaluer ce rôle prometteur des polyphénols, des études épidémiologiques à l'aide de biomarqueurs sont requises. A ceci, de faibles volumes sanguins sont habituellement disponibles dans les bio-banques. Ces éléments impliquent de développer de nouvelles méthodes robustes, nécessitant des volumes limités d'échantillons biologiques et portant sur un nombre plus important de composés représentatifs des différentes classes et sous-classes de polyphénols.

## Objectif

Le but de ce projet est de développer une méthode pour quantifier 38 polyphénols dans une matrice plasmatique grâce à la dilution isotopique différentielle par spectrométrie de masse.

## Approche

La méthode de dilution isotopique par spectrométrie de masse développée dans l'urine nous a permis de définir les bases pour ce nouveau développement. Une approche similaire utilisant la dansylation et le marquage isotopique différentiel a été utilisée et appliquée aux échantillons de plasma (Chapitre III). L'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des glucuronides et des esters sulfate des polyphénols a été testée et les conditions d'hydrolyse optimisées. Les procédures d'extractions ont également été optimisées et l'effet du marquage isotopique différentiel sur la correction des effets de matrice fréquemment rencontrés dans le plasma ou le sérum évalué.

## Principaux Résultats

L'hydrolyse enzymatique a été évaluée avec la même préparation enzymatique utilisée précédemment pour l'analyse des urines. La préparation enzymatique d'*Helix pomatia* a montré une efficacité d'hydrolyse inférieure à celle observée dans la matrice urinaire notamment pour les acides phénoliques. Des conditions similaires avec une activité de 1500U dans un tampon acétate 0.1M, pH=5 à 37°C pendant 2h ont été définies comme le meilleur compromis. On a pu souligner néanmoins une probable sous-estimation de la concentration de certains acides phénoliques.

L'extraction par l'acétate d'éthyle a été conservée mais les volumes et les temps d'extractions modifiés. La réaction de dansylation a été peu modifiée hormis le pH, mais a nécessité un quenching afin de prévenir la dégradation des composés phénoliques dansylés lors du séjour des échantillons dans le passeur d'échantillons réfrigéré. En effet, par rapport aux urines, ce temps de séjour est plus long, compte tenu de la durée d'analyse plus longue pour chacun des échantillons. Les effets de matrices ont été évalués et la méthode de dilution isotopique différentielle permet une réduction majeure de ces effets pour la plupart des polyphénols.

La méthode a été validée selon les recommandations de la FDA. Trente-sept polyphénols sur les 38 de départ ont été finalement validés avec des CV intra-batch inférieurs à 10% pour les 37 polyphénols et des CV inter-batch inférieurs à 15% pour 33 des 37 polyphénols validés.

La méthode a été appliquée à l'analyse de 1618 échantillons plasmatiques dans une évaluation de l'association entre concentrations en polyphénols et risque de cancer colorectal dans une étude nichée dans la cohorte EPIC (**Chapitre VI**).

## **Conclusion**

La méthode développée est la 1<sup>ère</sup> application de la dilution isotopique différentielle pour mesurer les polyphénols dans le plasma. De par le nombre de composés représentatifs des principales sous classes et sous classes, du faible volume de plasma requis et de la sensibilité et robustesse, cette nouvelle méthode est particulièrement adaptée à l'analyse de grandes séries d'échantillons dans des études épidémiologiques.

## **Article**

**Contribution** : 1<sup>er</sup> auteur. J'ai conduit la stratégie analytique et le développement méthodologique complet. J'ai rédigé les 1<sup>ères</sup> versions du manuscrit. Le manuscrit a été soumis par mon superviseur.



# Quantification of 38 dietary polyphenols in plasma by differential isotope labelling and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry



David Achaintre<sup>a,\*</sup>, Audrey Gicquiau<sup>a</sup>, Liang Li<sup>b</sup>, Sabina Rinaldi<sup>a</sup>, Augustin Scalbert<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biomarkers Group, Nutrition and Metabolism Section, International Agency for Research on Cancer (IARC), 69372, Lyon Cedex 08, France

<sup>b</sup> Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6G 2G2, Canada

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 2 February 2018

Received in revised form 10 April 2018

Accepted 8 May 2018

Available online 9 May 2018

### Keywords:

Polyphenols

Isotope-labelling

Plasma profiling

Dansylation

## ABSTRACT

Polyphenols constitute one of the most complex classes of phytochemicals in the human diet and have been suggested to play a role in the prevention of chronic diseases such as cardiovascular diseases, diabetes and cancers. However, evidence from epidemiological studies is still needed to better understand their role in disease prevention. To do so, robust methods for the accurate measurement of these molecules in large series of samples are needed. We report here the development of a highly-sensitive method based on differential isotope labelling with <sup>13</sup>C- and <sup>12</sup>C-dansyl chloride for the analysis of 38 structurally diverse polyphenols in 50 μL plasma by tandem mass spectrometry with limits of quantification varying between 0.11 to 44 nmol/L. Full validation of the method was achieved for 37 compounds out of the 38 tested. The method showed intra- and inter-batch coefficients of variations of 2.3–9.0% and 2.8–20.3% respectively depending on polyphenols when applied to 1163 plasma samples from the European Prospective Investigation on Cancer and Nutrition (EPIC) study. For the first time this method allowed to quantify with high accuracy and reproducibility a large selection of compounds representative of the main classes of dietary polyphenols in low volumes of plasma.

© 2018 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Polyphenols form a large family of plant secondary metabolites, with more than 500 different compounds identified in foods and beverages such as coffee, tea, wine, fruits, vegetables and cereals [1,2]. They have raised considerable interest for their possible role in the prevention of major chronic diseases such as cardiovascular diseases, diabetes, cancers and neurodegenerative diseases in pre-clinical and clinical studies [3–5]. While a protective role against chronic diseases like diabetes and cardiovascular diseases has also been supported by a number of epidemiological studies [6,7], epidemiological evidence for cancer prevention is still limited and inconsistent [8–12]. This may be partly explained by insufficient accuracy of exposure assessments most often based on dietary

questionnaires [8]. Biomarkers may constitute a good alternative to measure polyphenol exposures with improved accuracy. So far, most of the methods developed for the analyses of polyphenols in human samples were focused on a single or limited number of polyphenol biomarkers, mostly isoflavones and lignans [8]. Other polyphenol biomarkers such as alkylresorcinols and catechins have also been measured in some studies [13–15] but none of these studies did appraise the high complexity of polyphenol exposures in some large-scale epidemiological studies.

We previously described a method based on differential isotope labelling with <sup>13</sup>C- and <sup>12</sup>C-dansyl chloride which allows measuring 37 compounds from all main classes of dietary polyphenols in urine [16]. In this method, polyphenols in urine samples are successively deconjugated with enzymes, treated with <sup>13</sup>C-dansyl chloride to form <sup>13</sup>C-dansylated polyphenols, and mixed with a reference urine sample tagged with <sup>12</sup>C-dansyl chloride. Polyphenol concentrations are determined through measurement of ratios of signals for <sup>13</sup>C-labelled polyphenols and their <sup>12</sup>C-labelled analogs by tandem mass spectrometry.

We report here the development and validation of a method to measure 38 polyphenols in plasma samples, biospecimens most

\* Corresponding authors at: Biomarkers Group, Nutrition and Metabolism Section, International Agency for Research on Cancer (IARC), 50 cours Albert Thomas, F-69372, Lyon Cedex 08, France.

E-mail addresses: [achaintred@iarc.fr](mailto:achaintred@iarc.fr) (D. Achaintre), [scalberta@iarc.fr](mailto:scalberta@iarc.fr) (A. Scalbert).

commonly available in large cohort studies and showing concentrations of polyphenols much lower than in urine. The method was applied to 1163 plasma samples from the European Prospective Investigation on Cancer and Nutrition (EPIC) study.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

Caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, gallic acid, quercetin, kaempferol, phloretin, (+)-catechin, (–)-epicatechin, (+)-gallocatechin, vanillic acid, enterolactone, enterodiol, isorhamnetin, hesperetin, naringenin, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-propanoic acid, 3-(3,5-dihydroxyphenyl)-1-propanoic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, dansyl chloride, type H1  $\beta$ -glucuronidase from *Helix pomatia*, LC/MS grade methanol and acetonitrile and acetone for HPLC, formic acid as eluent additive for UHPLC–MS were purchased from Sigma–Aldrich (St-Louis, MO, USA). Homovanillic acid, (–)-epigallocatechin, procyanidin dimer B2 and procyanidin dimer B1 were purchased from Extrasynthese (Genay, France). Protocatechuic acid, 3- and 4-hydroxybenzoic acids, and ethyl acetate were purchased from Acros (Thermo Fischer Scientific, Geel, Belgium). Daidzein, genistein, (R,S)-equol, *m*-coumaric acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, resveratrol, apigenin, tyrosol, hydroxytyrosol and gallic acid ethyl ester were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA).  $^{13}\text{C}_2$ -Dansyl chloride was synthesized as previously described [17].

### 2.2. Plasma samples

Citrated plasma samples were collected from subjects of the European Prospective Investigation on Cancer and Nutrition (EPIC) study (a large multicenter prospective cohort study designed to investigate the relation between diet, other lifestyle factors, environmental factors and cancer risk which consists of approximately half a million participants) in 23 centres located in 10 European countries (Denmark, France, Germany, Greece, Italy, The Netherlands, Spain, Sweden, Norway and The United Kingdom) [18]. Samples analysed in this work ( $n = 1163$ ) originated from 8 of the 10 countries (Denmark, France, Germany, Greece, Italy, The Netherlands, Spain and The United Kingdom) and were part of a case-control study on colorectal cancer nested in EPIC [19]. For evaluating precision, accuracy and recovery of the method, two sets of plasma samples were used: ‘orphan’ citrate plasma samples from the EPIC study for which any information on individuals except for the center of origin was missing, and citrate plasma samples from the Blood Donor Centre (Etablissement Français du Sang, Lyon, France).

### 2.3. Extraction and dansylation of polyphenols

Plasma samples were thawed at room temperature, centrifuged (5 min at 3000g) and treated with  $\beta$ -glucuronidase (EC: 3.2.1.31) type H1 from *H. pomatia* (also showing sulfatase activity). The enzyme was tested at different incubation times (1–24 h) and enzyme quantities (1500 and 3000 U), as well as for the presence of ascorbic acid.

The following conditions were finally selected: 50  $\mu\text{L}$  plasma was treated with 25  $\mu\text{L}$  of a solution of  $\beta$ -glucuronidase (1500 U) containing 10  $\mu\text{g}$  ascorbic acid for 2 h at 37 °C. After hydrolysis, samples were extracted twice with ethyl acetate (400 + 200  $\mu\text{L}$ ) shaken at 1100 rpm for 10 min, and centrifuged for 5 min at 12,000g. The organic phase (540  $\mu\text{L}$ ) was evaporated for 30 min under vacuum at room temperature. Dried plasma extracts were dissolved in

a  $^{13}\text{C}$ -dansyl chloride solution (100  $\mu\text{g}$  in 100  $\mu\text{L}$  acetone) and carbonate buffer (pH = 9.5, 0.1 M, 100  $\mu\text{L}$ ) and kept at 60 °C for 30 min. Dansylated plasma samples were evaporated for 90 min under vacuum at 43 °C. Dried dansylated plasma extracts were redissolved in 100  $\mu\text{L}$  acetonitrile/water mixture (1/1, v/v)(quenching).

For each analytical batch (50 samples), a pooled plasma sample was prepared by mixing equivolumes (10  $\mu\text{L}$ ) of every plasma sample analysed in the batch. This pooled sample was extracted and treated with  $^{12}\text{C}$ -dansyl chloride in similar conditions. An aliquot (18  $\mu\text{L}$ ) of the dansylated pooled plasma sample was added to each dansylated plasma sample (18  $\mu\text{L}$ ) and the mixture directly analyzed by Ultra High Pressure Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (UHPLC–ESI–MS/MS).

### 2.4. Analysis of dansylated polyphenols by tandem mass spectrometry

UHPLC–ESI–MS/MS was performed on an Agilent 1290 UHPLC system coupled to a 5500 QTRAP mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA). All dansylated plasma samples for a given batch were maintained at 10 °C in the autosampler until analysis. They were injected (10  $\mu\text{L}$ ) onto an Acquity CSH C18 column (Waters, 2.1  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) maintained at 50 °C. Eluents were 0.1% formic acid in methanol/water 10/90 (v/v) (eluent A) and acetonitrile (eluent B). The gradient profile was: 0% B from 0 to 1 min, 0 to 50% B from 1 to 7 min, 50 to 60% from 7 to 9.5 min, 60 to 90% from 9.5 to 11.5 min, 90 to 100% B from 11.5 to 14 min, 100% B from 14 to 16 min, 100 to 90% B from 16 to 16.5 min, 90% B from 16.5 to 20 min, 90 to 0% B from 20 to 20.5 min. Flow rate varied as follows: 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  from 0 to 14 min, 500 to 700  $\mu\text{L}/\text{min}$  from 14 to 16 min, 700 to 1300  $\mu\text{L}/\text{min}$  from 16 to 16.5 min, 1300  $\mu\text{L}/\text{min}$  from 16.5 to 20 min and 1300 to 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  from 20 to 20.5 min. Mass detection was carried out in scheduled MRM mode using a Turbo V-ion source operating in positive mode at 400 °C as described before [16]. The same transitions were used for each dansylated compound as described previously for urine analyses, apart from declustering potential (DP) and collision energy (CE) parameters which had been modified to voluntarily reduce sensitivity for the most highly concentrated compounds and avoid signal saturation [16]. The original DP and CE values, set as initially determined during optimization for urine analysis, have been used for these polyphenols to maximize sensitivity for analysis of plasma samples.

### 2.5. Quantification of dansylated polyphenols

Calibration curves were built using a mix of the 38 polyphenol standards at 11 concentration levels corresponding to expected concentrations for each compound in the plasma samples. Standards were dansylated with  $^{13}\text{C}$ -dansyl chloride and mixed with the pooled plasma sample dansylated with  $^{12}\text{C}$ -dansyl chloride. Quantification was carried out using the MultiQuant 3.1 software (AB Sciex, Foster City, CA). Calibration curves were established as previously reported [16]. The 1163 plasma samples from the EPIC colorectal cancer study were analyzed in 24 batches, with a calibration curve injected in single run along each batch. Three QC samples (two orphan citrate plasma samples from the EPIC study and one citrate plasma sample from Etablissement Français du Sang) were analyzed in duplicate within each batch, together with two blank samples [plasma is replaced by phosphate buffer saline solution (PBS)].

### 2.6. Method validation

The method was validated based on FDA guidelines [20]. Intra-batch precision was evaluated by repeated injection ( $n = 6$ ) of three orphan samples from the EPIC study and three samples from

Etablissement Francais du Sang, with different polyphenol concentrations, in a single batch. Inter-batch precision was evaluated on two orphan samples and one sample from Etablissement Francais du Sang analyzed in duplicate in each of the 24 batches over a 4-month period. Accuracy was evaluated by spiking four different plasma samples containing low polyphenol concentrations with standards at low and median concentrations along each calibration curve.

Matrix effect and recovery of extraction were determined through spiking polyphenol standards in a plasma sample before or after polyphenol extraction, with or without isotopic dilution with a reference sample of  $^{12}\text{C}$ -dansylated polyphenols.

The matrix effect (ME) is defined as the ratio of the concentrations of a plasma sample spiked with polyphenol standards after extraction to the concentrations measured in a pure solution:

$$\text{ME}(\%) = (c-a)/d \times 100$$

where  $c$  is the concentration of polyphenols of plasma samples spiked after extraction,  $a$  is the concentration of polyphenols in the unspiked plasma sample, and  $d$  is the concentration of polyphenol standards measured in pure solution. Concentrations  $a$ ,  $c$  and  $d$  were measured as peak intensities of the  $^{13}\text{C}$ -dansylated polyphenols, and no correction with  $^{12}\text{C}$ -labelled polyphenols is made.

The reduced matrix effect (RME) is defined as the same ratio with concentrations measured using the differential  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -isotope labelling method:

$$\text{RME}(\%) = (C-A)/D \times 100$$

where  $C$  is the concentration of polyphenols of plasma samples spiked after extraction,  $A$  is the concentration of polyphenols in the unspiked plasma samples, and  $D$  is the concentration of polyphenol standards in a pure solution.

Recovery of extraction (RE) is measured as the ratio of polyphenol concentrations of a plasma sample spiked before extraction and after extraction:

$$\text{RE}(\%) = (B-A)/(C-A) \times 100$$

where  $A$  and  $C$  are as defined above and  $B$  is the concentration of polyphenols in the plasma sample spiked before extraction.

Process efficiency (PE) [21] integrates recovery of extraction and matrix effects:

$$\text{PE}(\%) = \text{RME} \times \text{RE}/100 = (B-A)/D \times 100$$

Accuracy or dilution integrity was also evaluated by diluting four different plasma samples at  $\frac{1}{2}$  and  $\frac{1}{4}$  in acetate buffer at 2 h and 24 h for hydrolysis.

LOQ was defined as the lowest point of the calibration giving an accuracy varying from 80% to 120% of the theoretical value.

### 3. Results

Thirty eight dietary polyphenols were selected for their widespread occurrence in foods or in human biofluids and for being representative of the main polyphenol classes (Table 1). They include phenolic acids (Fig. 1; peaks 1–17), flavonoids (peaks 18–33), one stilbene (peak 34), tyrosols (peaks 35–36) and lignans (peaks 37–38).

#### 3.1. Polyphenol dansylation

The dansylation reaction was checked in full scan experiments (not shown) and found to be quantitative (all phenolic groups dansylated) as previously reported for the analysis of the same compounds in urine samples [16]. Most dansylated polyphenols were found to be stable for up to 13 h at  $10^\circ\text{C}$  in the conditions of the

reaction. However, quenching of the reaction was needed to limit their degradation beyond this period. As the analysis of a batch of 50 plasma samples together with calibration curve, QC and blank samples takes about 28 h, samples had to be quenched before injection. This was obtained by evaporation of the dansylated extracts under vacuum, followed by dissolving them in a water/acetonitrile mixture. Dansylated polyphenols were found to be stable over the 48 h following dansylation (see Supplementary data, Fig. S-1).

#### 3.2. Quantification of dansylated polyphenols by tandem mass spectrometry

Dansylated polyphenols were quantified by tandem mass spectrometry (Fig. 1). Limit of quantification (LOQ) varied from 0.11 nM for apigenin to 44.4 nM for quercetin (Table 2). Within each analytical batch, two blank samples were added to assess the presence of possible polyphenol contaminants in the glucuronidase preparation [22]. Most of the 38 polyphenols were either absent ( $n = 16$ ) in the blanks or present at concentrations lower than the lowest concentrations measured in any plasma samples ( $n = 17$ ). Five polyphenols (protocatechuic acid, caffeic acid, gallic acid, *p*-coumaric acid and apigenin) were present in blanks at concentrations close to the median concentrations measured in the EPIC subjects. However, plasma dilution experiments (Table 1) showed that the contribution of the blanks was more significant at the highest level of dilution, while it was negligible for these five compounds before dilution, suggesting that blanks reflected poorly the contribution of polyphenol contaminants from the glucuronidase enzyme in real plasma samples.

Conditions of enzymatic hydrolysis were optimized. The optimal duration of hydrolysis was found to vary among the different polyphenols, and 2 h of hydrolysis was found to provide the best compromise for deconjugation of the 38 polyphenols (Fig. 2). However, in these conditions, eight phenolic acids (4-hydroxybenzoic, 3-hydroxybenzoic, protocatechuic, vanillic, gallic, *p*-coumaric, caffeic and ferulic acids) and one stilbene (resveratrol) showed suboptimal hydrolysis. Incubation time could not be increased due to the degradation of polyphenols with catechol groups for longer time of reaction, despite the addition of  $10\ \mu\text{g}$  ascorbic acid (Fig. 2).

Calibration curves showed linear responses for all polyphenols within the range of concentrations found in free-living subjects from the EPIC cohort (Table 2). Precision and accuracy of the method were evaluated. Very good intra-batch precision was observed, with CVs varying between 2.3% and 9% (Table 1). Inter-batch CVs varied between 4.0% and 15% for 33 of the 38 polyphenols tested. It exceeded 15% for 5 compounds including gallic acid (16.9%), hydroxytyrosol (18.2%) and enterodiol (20.3%). Particularly large interbatch CVs were observed for the two flavonols (quercetin, 23.4%; isorhamnetin, 30%). This was explained by their partial degradation at the high pH of the dansylation reaction, particularly for the solutions of standards. Quercetin was found to be relatively more stable when measured in plasma and this resulted in some overestimation in plasma analyses.

The capacity of the differential  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -isotope labelling method to limit matrix effects was evaluated. Matrix effect (ME) measured without correction with isotopic dilution varied widely according to polyphenols, from slight ion suppression effect (78.1% for equol) to large enhancements of the signal (431% for gallic acid) (Fig. 3). Dilution with the dansylated pool plasma sample led to a reduction of the matrix effect as seen by the RME significantly reduced for most polyphenols when compared to ME (Fig. 3). Major reductions of matrix effects were observed in particular for all compounds that showed the highest matrix effects such as gallic acid (431–183%), quercetin (402–163%), (+)-gallocatechin (331–217%) or hydroxytyrosol (352–198%).



**Table 1**

Intra- and inter-batch precision, spike and dilution recovery for the measurement of 38 polyphenols in plasma.

ID	Polyphenol	Concentration (nM) <sup>a</sup>	Precision		Accuracy			
			Intra-batch CV (%)	Inter-batch CV (%)	Spike recovery <sup>b</sup> (%)		Dilution recovery (%)	
					Mean	SD	Mean	SD
1	4-Hydroxybenzoic acid	111–246	8.5	10.3	116.9	15.3	NA <sup>c</sup>	N/A
2	3-Hydroxybenzoic acid	6.9–75	9.0	12.2	96.4	7.3	109.2	9.6
3	Protocatechuic acid	87–128	8.6	13.1	98.0	20.2	NA <sup>c</sup>	N/A
4	Vanillic acid	88–275	7.6	12.5	108.1	14.4	86.9	11.3
5	3,5-Dihydroxybenzoic acid	8.3–72	3.0	6.0	85.2	5.6	104.0	6.6
6	Gallic acid	30–157	4.8	16.9	78.9	15.9	119.1	49.1
7	gallic acid ethyl ester	<LOQ–6.1	3.3	12.8	95.9	12.5	97.2	5.3
8	4-Hydroxyphenylacetic acid	156–645	4.3	6.1	76.1	13.2	99.6	10.8
9	3-Hydroxyphenylacetic acid	26–111	6.3	7.7	76.3	10.0	102.0	8.3
10	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	34–112	5.8	14.9	62.2	10.6	110.9	15.4
11	homovanillic acid	64–267	4.8	9.2	95.6	11.5	108.4	7.3
12	3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	91–221	6.2	12.6	84.4	13.4	95.5	35.1
13	3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	13.3–91	3.7	10.4	92.8	4.6	104.4	6.7
14	<i>p</i> -Coumaric acid	18.2–83	2.3	3.8	111.6	7.1	NA <sup>c</sup>	N/A
15	<i>m</i> -Coumaric acid	3.1–40	8.9	14.1	114.0	9.6	102.2	8.6
16	Caffeic acid	187–377	5.9	12.8	82.1	13.2	NA <sup>c</sup>	N/A
17	Ferulic acid	56–350	5.0	11.2	116.4	8.1	96.6	7.9
18	Kaempferol	52–123	4.5	12.6	100.6	8.7	77.5	22.4
19	Quercetin	148–778	6.5	23.4	155.6	45.4	115.4	25.5
20	Isorhamnetin	315–993	6.8	30	186.0	32.0	109.5	25.3
21	Apigenin	7.9–16.3	5.4	8.2	115.1	10.8	ND <sup>d</sup>	N/A
22	Naringenin	2.4–90	5.4	9.5	112.2	10.2	99.4	25.4
23	Hesperetin	1.3–71	5.9	13.2	123.3	17.8	100.1	8.8
24	Daidzein	2.2–158	6.3	8.8	107.2	7.3	96.0	3.5
25	Genistein	1.1–55	4.6	8.9	119.5	10.9	90.6	18.4
26	Equol	0.22–8.4	8.2	10.2	102.6	6.1	114.1	20.5
27	Phloretin	< LOQ–5.5	6.7	12.8	85.8	14.1	120.3	9.3
28	(+)-Catechin	<LOQ–135	2.9	10.5	145.8	12.9	122.1	13.9
29	(–)-Epicatechin	<LOQ–251	3.3	14.1	145.9	19.4	138.5	20.4
30	(–)-Gallocatechin	<LOQ–58	3.0	5.1	114.2	34.4	ND <sup>d</sup>	N/A
31	(–)-Epigallocatechin	<LOQ–435	4.4	14.4	93.3	34.4	176.8	23.5
32/33	Procyanidin dimer B1/B2 <sup>e</sup>	<LOQ	N/A	N/A	118.3	23.9	ND <sup>d</sup>	N/A
34	Resveratrol	<LOQ–27.9	5.4	12.3	120.8	9.9	132.0	19.4
35	Tyrosol	3–4.9	7.1	15.2	136.0	27.6	92.0	14.8
36	Hydroxytyrosol	12.0–36	6.0	18.2	151.3	32.6	110.2	12.8
37	Enterodiol	0.5–11.0	6.9	20.3	199.8	58.4	89.9	7.8
38	Enterolactone	2.4–79	2.8	4.7	105.0	5.5	96.3	5.0

<sup>a</sup> Range of concentrations in plasma samples used for validation.<sup>b</sup> Spike recovery = process efficiency (PE; see Experimental section for definition).<sup>c</sup> NA, dilution recovery not applicable because of incomplete hydrolysis at 2 h.<sup>d</sup> ND, not determined because of too low concentrations.<sup>e</sup> Procyanidin dimers B1 and B2 could not be separated in chromatograms.

Recovery (RE) was evaluated independently of matrix effect (see experimental section) and found to be good for 29 polyphenols (72%–122%) and satisfactory for 9 polyphenols (43%–62%) out of the 38 polyphenols tested. (–)-Epigallocatechin showed the lowest recovery (32%). Process efficiency, the product of RE and RME, was found to vary between 76% and 116% for most polyphenols tested, except for hesperetin, isorhamnetin, quercetin, (+)-catechin, (–)-epicatechin, tyrosol, hydroxytyrosol and enterodiol, which showed higher recovery values (123–199%) (Table 1, spike recovery). Recovery after 1/2–1/4 (v/v) dilution varied between 90 and 120% for most compounds with the exception of (+)-catechin, (–)-epicatechin, (–)-epigallocatechin and resveratrol which showed lower recovery (77%) (Table 1, dilution recovery).

Based on these different tests, isorhamnetin was finally excluded from further analyses out of the 38 polyphenols tested because of its high interbatch variability. Quercetin was maintained in the assay although an overestimation is anticipated.

### 3.3. Polyphenol concentrations in EPIC plasma samples

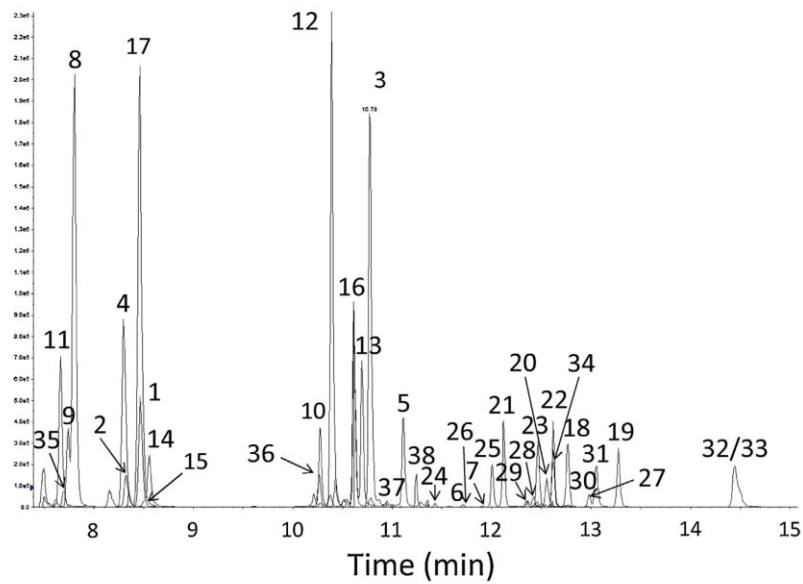
The method was then applied to plasma samples from 1163 subjects from the EPIC study (Table 2). Procyanidin dimers B1 and B2 could not be detected in any of the samples. (+)-Gallocatechin, (–)-epigallocatechin and gallic acid ethyl ester were detected in a limited fraction of the samples (8, 26 and 34% respectively). All other 32 compounds were detected and quantified in a large fraction (56–100%) of the samples. Median concentrations varied widely between compounds. Some were present at very low concentrations such as equol (median concentration, 0.5 nM), enterodiol (1.3 nM), tyrosol (3.1 nM), phloretin (3.2 nM), resveratrol (3.8 nM), gallic acid ethyl ester (4.1 nM), genistein (4.9 nM) and the two flavanones, hesperetin (2.5 nM) and naringenin (4.7 nM). The twelve phenolic compounds present at the highest concentrations (median concentration >50 nM) were all phenolic acids with the exception of quercetin (346 nM) known to be overestimated (see above) and kaempferol (94 nM). These phenolic acids are caffeic acid (415 nM), ferulic acid (89 nM) and several compounds of

**Table 2**  
Lowest, median, average and highest concentrations of polyphenols in plasma samples (n = 1163) from the EPIC study.

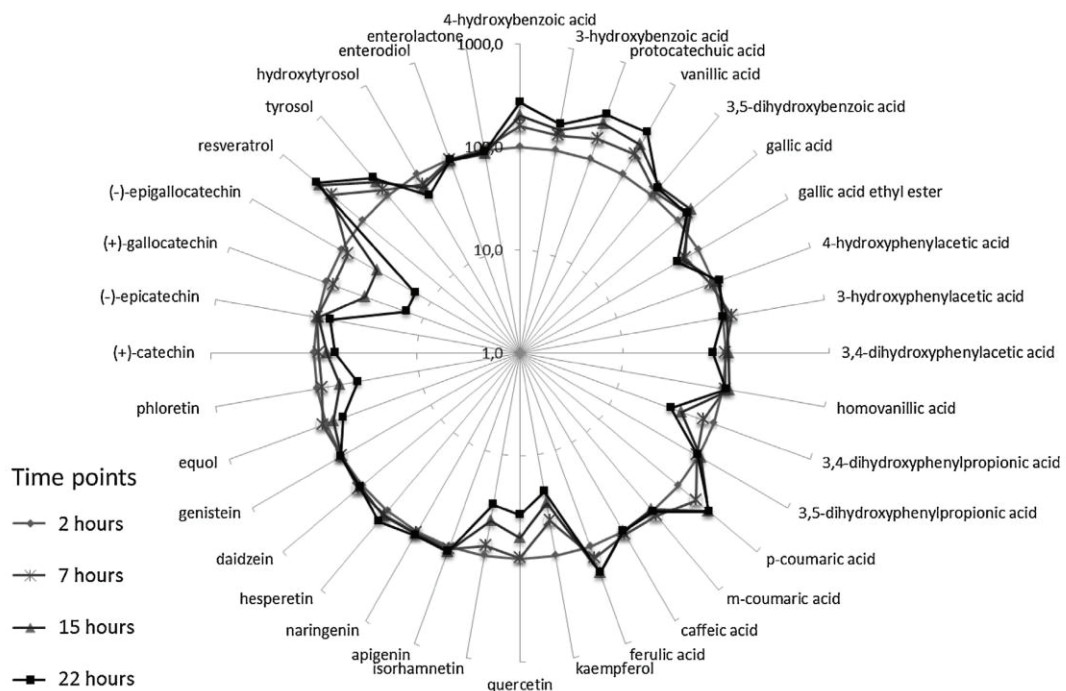
Polyphenol	Limit of quantification (nM)	Lowest concentration (nM)	Number of samples with concentrations <LLOQ (%)	Highest concentration (nM)	Number of samples with concentrations >ULOQ (%)	Median concentration (nM)	Average concentration (nM)	
							Mean	SD
4-Hydroxybenzoic acid	11.1	103	0	>888	0.1	192	207	67
3-Hydroxybenzoic acid	5.5	<LOQ	1.6	200	0	18.9	25	19
Protocatechuic acid	11.1	74	0	289	0	158	159	23
Vanillic acid	22.2	83	0	>1776	0.3	190	218	106
3,5-Dihydroxybenzoic acid	0.44	2.0	0	>355	0.1	19.0	37	45
Galic acid	11.1	16	0	>222	0.1	34	41	24
Galic acid ethyl ester	2.2	<LOQ	66	47	0	4.1	7.0	7.1
4-Hydroxyphenylacetic acid	4.4	95	0	>888	5.5	304	340	139
3-Hydroxyphenylacetic acid	4.4	<LOQ	8.1	>888	0.1	70	96	91
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	5.5	18	0	>222	0.2	42	46	20
Homovanillic acid	2.2	31	0	>444	0.3	88	100	47
3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	22.2	83	0	>444	2.2	182	196	59
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	1.11	2	0	>222	2.6	31	44	39
p-Coumaric acid	0.56	9.5	0	176.6	0	18.2	21	11.2
m-Coumaric acid	4.4	<LOQ	27	>88.8	2.2	13.0	18.7	16.1
Caffeic acid	44	251	0	>888	0.1	415	428	80
Ferulic acid	11.1	37	0	>888	0.2	89	142	121
Quercetin	22.2	49	0	341	0	94	99	29
Kaempferol	44	132	0	>888	0.4	346	371	122
Isorhamnetin	44	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
Apigenin	0.11	8	0	82.1	0	15.4	16	4.2
Naringenin	0.28	1	0	>222	1.4	4.7	15.4	29
Hesperetin	0.28	0.3	0	>222	2.3	2.5	20	38
Daidzein	0.56	1.2	0	>444	1.0	11.5	32	55
Genistein	0.22	0.8	0	>355	0.3	4.9	13.4	27
Equol	0.22	<LOQ	30	>44	0.5	0.5	1.0	2.4
Florletin	2.2	<LOQ	43	102	0	3.2	5.1	6.6
(+)-Catechin	11.1	<LOQ	15.2	194	0	23	31	23
(-)-Epicatechin	11.1	<LOQ	25	289	0	22	38	39
(+)-Gallic acid	22.2	<LOQ	92	82.7	0	28	31	9.2
(-)-Epigallocatechin	22.2	<LOQ	74	267	0	35	49	34
Procyanidin dimer B1/B2 <sup>a</sup>	22.2	<LOQ	100	<LOQ	0	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Resveratrol	2.2	<LOQ	32	>89	0.1	3.8	6.8	7.2
Tyrosol	1.1	<LOQ	0.1	>89	0.2	3.1	4.2	4.5
Hydroxytyrosol	11.1	13	0	>222	0.6	26	33	21
Enterodiol	0.44	<LOQ	30	77	0	1.3	2.8	5.5
Enterolactone	0.28	<LOQ	1.6	322	0	8.5	13.4	19.8

<sup>a</sup> Procyanidin dimers B1 and B2 could not be separated in the chromatograms.

<sup>b</sup> ND, not determined.



**Fig. 1.** LC-ESI-MS/MS chromatogram of a pool of 50 plasma samples from the EPIC study. The pooled sample was supplemented with low amounts of (–)-epigallocatechin, (+)-gallocatechin and procyanidin dimers B1 and B2, otherwise present at too low concentrations in plasma samples. Only the quantifier transition of the  $^{12}\text{C}$ -dansylated polyphenols is shown. Run time is 20 min. See Table 1 for peak identity.



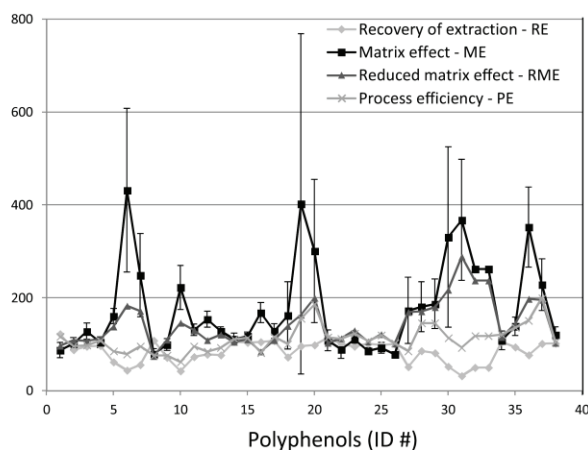
**Fig. 2.** Kinetics of enzymatic hydrolysis of conjugated polyphenols illustrated in the form of a radar chart. Radii show concentration of each free polyphenols measured as dansylated derivative at four different time points. Concentrations are expressed in relative intensities (%) and in log scale with time 2 h taken as reference. Lines connect concentration measurements for all polyphenols at a given time point.

microbial origin such as 4-hydroxyphenylacetic acid (304 nM) and 4-hydroxybenzoic acid (192 nM).

#### 4. Discussion

A method was developed to quantify 38 polyphenols from 13 different classes or sub-classes in blood samples. The method uses

differential  $^{12}\text{C}$ -/ $^{13}\text{C}$ -isotope labelling of polyphenols with labelled dansyl chloride and is derived from a method previously developed for the analysis of urine samples [16]. This method presents a number of advantages including an improved retention and separation of dansylated polyphenols on the reverse phase column, a higher molecular weight of the measured products thereby increasing the signal to background ratio. The use of labelled dansyl chloride and



**Fig. 3.** Recovery, matrix effects and process efficiency for the measurement of 38 polyphenols in plasma samples.

the formation of labelled dansylated polyphenols overcome the need for costly labelled standards.

#### 4.1. Optimization of the protocol for the analysis of plasma samples

When compared to our method for quantification of polyphenols in urine [16], several parameters were modified. Parameters of ionization and fragmentation were optimized (see experimental section), dilution factors in the protocol of extraction were reduced, and injection volume was increased. This resulted in a large gain of sensitivity evaluated by comparing LOQ values for the 37 polyphenols in plasma and in urine. This gain of sensitivity was in average 95× for the 37 polyphenols, and >600× for compounds like naringenin and hesperetin.

The conditions of enzymatic hydrolysis were optimized to achieve highest yields of unconjugated polyphenols in plasma samples. Few data on the efficiency with which the enzymes hydrolyse polyphenol glucuronides and ester sulfates are available [23]. We compared four incubation times and found that 2 h offered the best compromise with a majority of metabolites fully hydrolysed and a limited degradation of the most labile polyphenols, in particular those with oxidizable catechol groups, which could only be partially preserved by the addition of ascorbic acid [24].

#### 4.2. Reduction of the matrix effects by isotopic dilution

One of the main assets of the present method based on dansylation and differential isotope labelling is to reduce matrix effects (Fig. 3). Nitrogen in the dansyl group of dansylated polyphenols increases proton affinity and improves their ionization. Dansylation also improves chromatographic behaviour of polyphenols [25–27]. The use of  $^{13}\text{C}$ -dansyl chloride and isotopic dilution with the  $^{12}\text{C}$ -dansyl pool reference sample limits matrix interference. Indeed, the  $^{13}\text{C}$ - and  $^{12}\text{C}$ -dansyl-polyphenol ion pairs are coeluted and subjected to the same degree of matrix effect [17]. We observed that for ca 75% of polyphenols, matrix effect is drastically reduced, and partially reduced for the remaining 25% of polyphenols (RME, Fig. 3).

#### 4.3. Application to polyphenol measurement in the EPIC cohort

Thirty five out of the 37 polyphenols included in the method could be detected in plasma samples from the EPIC cohort (Table 2). Procyanidin dimer B2 and B1 could not be detected or were present

at concentrations lower than the LOQ. These two dimers have been previously reported in blood after consumption of dietary sources rich in procyanidins [28,29]. However, their bioavailability was 100 times lower than that of the structurally related monomers. Most other compounds were detected at a concentration higher than the LOQ in more than half of the plasma samples with the exception of the two gallocatechins expected to be present in tea consumers only [1].

Concentrations of the various polyphenols measured in plasma can be compared to those previously reported in the literature and curated in the Exposome-Explorer database [30]. For most polyphenols documented in the Exposome-Explorer database (kaempferol, apigenin, naringenin, hesperetin, equol, enterodiol and enterolactone), mean or median concentrations measured in the EPIC subjects are close to the ones previously measured using assays specific for one or a few polyphenols (see Supplementary data, Table S-1). For other compounds, concentration values vary between studies according to countries. Lower concentrations of 3,5-dihydroxybenzoic and 3,5-dihydroxyphenylpropionic acids, two metabolites of alkylresorcinols, were observed when compared to plasma levels previously reported in Finland, in agreement with a higher intake of wholegrain products in Northern Europe [31]. Levels of daidzein and genistein measured here are similar to those previously described in UK and USA and much lower than in Japan because of a higher consumption of soy products in this latter country. Measured levels of quercetin were higher than those previously reported in three other studies conducted in Germany or China. These differences are explained by technical issues leading to an overestimation of quercetin as discussed above.

Median concentrations measured here on plasma samples were in average over 30 times lower than those previously in urine for the same 37 polyphenols [16] with large variations between compounds. In general polyphenols showing highest concentrations in blood were also those showing highest concentrations in urine. These compounds were all phenolic acids (hydroxybenzoic, hydroxyphenylacetic, hydroxyphenylpropionic and hydroxycinnamic acids).

#### 4.4. Comparison with methods previously published

A number of methods have been proposed earlier to quantify a variety of polyphenols in plasma or serum by LC–MS [32–37]. Most of these methods were targeted at specific polyphenol classes and did not use derivatization. They were mainly applied to dietary intervention studies and used larger sample volume (100–800  $\mu\text{L}$ ) than the present method (50  $\mu\text{L}$ ). None of these methods have been applied to our best knowledge to epidemiological studies. The present method is therefore the first that allows the measurement of main representatives for most classes of dietary polyphenols in blood. It is also unique because of the low plasma volume needed, its high sensitivity and its validation on a large number of plasma samples.

## 5. Conclusions

The method proposed here is the first application of dansylation to the quantification of dietary polyphenols in plasma. Thirty seven polyphenols were quantified in small volume of plasma. Sensitivity and robustness of the method make it particularly suitable for the analysis of large series of samples in epidemiological study. The method has also some limitations, like the requirement for a costly labelled reagent, although the cost is much lower than creating a set of isotope analogy standards of polyphenols, and the partial degradation of flavonols during the dansylation reaction. Nevertheless when applied to large scale epidemiological studies, it should con-

tribute to improve our understanding of the role of polyphenols in health and disease prevention.

### Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

### Acknowledgments

This work was supported by the Institut National du Cancer, Paris (INCa grant #2011-105) and the Wereld Kanker Onderzoek Fonds (WCRF NL grant #2012/604).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.017>.

### References

- [1] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jimenez, Polyphenols – food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 727–747.
- [2] J. Perez-Jimenez, V. Neveu, F. Vos, A. Scalbert, Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the Phenol-Explorer database, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 4959–4969.
- [3] M. Quiñones, M. Miguel, A. Aleixandre, Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease, *Pharmacol. Res.* 68 (2013) 125–131.
- [4] L. Hooper, P.A. Kroon, E.B. Rimm, J.S. Cohn, I. Harvey, K.A. Le Cornu, J.J. Ryder, W.L. Hall, A. Cassidy, Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Am. J. Clin. Nutr.* 88 (2008) 38–50.
- [5] S.C. Thomasset, D.P. Berry, G. Garcea, T. Marczylo, W.P. Steward, A.J. Gescher, Dietary polyphenolic phytochemicals – promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties, *Int. J. Cancer* 120 (2007) 451–458.
- [6] P.C. Hollman, A. Cassidy, B. Comte, M. Heinonen, M. Richelle, E. Richling, M. Serafini, A. Scalbert, H. Sies, S. Vidry, The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established, *J. Nutr.* 141 (2011) 989S–1009S.
- [7] R.M. van Dam, N. Naidoo, R. Landberg, Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings, *Curr. Opin. Lipidol.* 24 (2013) 25–33.
- [8] R. Zamora-Ros, M. Touillard, J.A. Rothwell, I. Romieu, A. Scalbert, Measuring exposure to the polyphenol metabolome in epidemiological studies: current tools, applications and their limits, *Am. J. Clin. Nutr.* 100 (2014) 11–26.
- [9] H.D. Woo, J. Kim, Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer, *World J. Gastroenterol.* 19 (2013) 1011–1019.
- [10] M. Iwasaki, M. Inoue, S. Sasazuki, T. Miura, N. Sawada, T. Yamaji, T. Shimazu, W.C. Willett, S. Tsugane, Plasma tea polyphenol levels and subsequent risk of breast cancer among Japanese women: a nested case-control study, *Breast Cancer Res. Treat.* 124 (2010) 827–834.
- [11] R. Zamora-Ros, D.K. Barupal, J.A. Rothwell, M. Jenab, V. Fedirko, I. Romieu, K. Aleksandrova, K. Overvad, C. Kyro, A. Tjonneland, A. Affret, M. His, M.C. Boutron-Ruault, V. Katske, T. Kuhn, H. Boeing, A. Trichopoulou, A. Naska, M. Kritikou, C. Saieva, C. Agnoli, M. Santucci de Magistris, R. Tumino, F. Fasanelli, E. Weiderpass, G. Skeie, S. Merino, P. Jakszyn, M.J. Sanchez, M. Dorronsoro, C. Navarro, E. Ardanaz, E. Sonestedt, U. Ericson, L. Maria Nilsson, S. Boden, H. Bas Bueno-de-Mesquita, P.H. Peeters, A. Perez-Cornago, N.J. Wareham, K.T. Khaw, H. Freisling, A.J. Cross, E. Riboli, A. Scalbert, Dietary flavonoid intake and colorectal cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) cohort, *Int. J. Cancer* 140 (2017) 1836–1844.
- [12] M. Fantini, M. Benvenuto, L. Masuelli, G.V. Frajese, I. Tresoldi, A. Modesti, R. Bei, In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 9236–9282.
- [13] I. Drake, E. Sonestedt, B. Gullberg, A. Bjartell, H. Olsson, H. Adlercreutz, M.J. Tikkanen, E. Wirfalt, P. Wallstrom, Plasma alkylresorcinol metabolites as biomarkers for whole-grain intake and their association with prostate cancer: a Swedish nested case-control study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23 (2014) 73–83.
- [14] M.D. Knudsen, C. Kyro, A. Olsen, L.O. Dragsted, G. Skeie, E. Lund, P. Aman, L.M. Nilsson, H.B. Bueno-de-Mesquita, A. Tjonneland, R. Landberg, Self-reported whole-grain intake and plasma alkylresorcinol concentrations in combination in relation to the incidence of colorectal cancer, *Am. J. Epidemiol.* 179 (2014) 1188–1196.
- [15] L.M. Butler, J.Y. Huang, R. Wang, M.-J. Lee, C.S. Yang, Y.-T. Gao, J.-M. Yuan, Urinary biomarkers of catechins and risk of hepatocellular carcinoma in the shanghai cohort study, *Am. J. Epidemiol.* 181 (2015) 397–405.
- [16] D. Achaintre, A. Bulete, C. Cren-Olive, L. Li, S. Rinaldi, A. Scalbert, Differential isotope labeling of 38 dietary polyphenols and their quantification in urine by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 88 (2016) 2637–2644.
- [17] K. Guo, L. Li, Differential <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C-isotope dansylation labeling and fast liquid chromatography/mass spectrometry for absolute and relative quantification of the metabolome, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3919–3932.
- [18] E. Riboli, K.J. Hunt, N. Slimani, P. Ferrari, T. Norat, M. Fahey, U.R. Charrondiere, B. Hemon, C. Casagrande, J. Vignat, K. Overvad, A. Tjonneland, F. Clavel-Chapelon, A. Thiebaut, J. Wahrendorf, H. Boeing, D. Trichopoulos, A. Trichopoulou, P. Vineis, D. Palli, H.B. Bueno-de-Mesquita, P.H. Peeters, E. Lund, D. Engeset, C.A. Gonzalez, A. Barricarte, G. Berglund, G. Hallmans, N.E. Day, T.J. Key, R. Kaaks, R. Saracci, European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection, *Public Health Nutr.* 5 (2002) 1113–1124.
- [19] N. Murphy, D. Achaintre, R. Zamora-Ros, M. Jenab, M.C. Boutron Ruault, F. Carbonnel, I. Savoye, R. Kaaks, T. Kuhn, H. Boeing, K. Aleksandrova, A. Tjonneland, C. Kyro, K. Overvad, J.R. Quiros, M.J. Sanchez, J.M. Altzibar, J.M. Huerta, A. Barricarte, K.-T. Khaw, K.E. Bradbury, A. Perez-Cornago, A. Trichopoulou, A. Karakatsani, E. Peppas, D. Palli, S. Gionni, R. Tumino, C. Sacerdote, S. Panico, B. Bueno de Mesquita, P.H. Peeters, M. Rutegård, I. Johansson, H. Freisling, H. Noh, A.J. Cross, P. Vineis, K. Tsilidis, M. Gunter, A. Scalbert, A prospective evaluation of plasma polyphenol levels and colon cancer risk, *Int. J. Cancer* (2018) in press, doi:10.1002/ijc.31563.
- [20] Food and Drug Administration, Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, 2001, <https://www.fda.gov/ForIndustry/IndustryNoticesandGuidanceDocuments/default.htm>.
- [21] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [22] T. Nakamura, R. Tanaka, H. Ashida, Possible evidence of contamination by catechins in deconjugation enzymes from *Helix pomatia* and *Abalone* entrails, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (2011) 1506–1510.
- [23] R. Bartholome, G. Haenen, C.H. Hollman, A. Bast, P.C. Dagnelie, D. Roos, J. Keijer, P.A. Kroon, P.W. Needs, I.C. Arts, Deconjugation kinetics of glucuronidated phase II flavonoid metabolites by beta-glucuronidase from neutrophils, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 25 (2010) 379–387.
- [24] D.M. de Oliveira, C.B. Pinto, G.R. Sampaio, L. Yonekura, R.R. Catharino, D.H. Bastos, Development and validation of methods for the extraction of phenolic acids from plasma urine, and liver and analysis by UPLC–MS, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 6113–6121.
- [25] P. Panuwet, R.E. Hunter Jr., P.E. D’Souza, X. Chen, S.A. Radford, J.R. Cohen, M.E. Marder, K. Kartavenska, P.B. Ryan, D.B. Barr, Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: advancing biomonitoring, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 46 (2016) 93–105.
- [26] Y.-Q. Xia, M. Jemal, Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 2125–2138.
- [27] A. Van Eckhout, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte, Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: evaluation of matrix effects, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 877 (2009) 2198–2207.
- [28] A. Sano, J. Yamakoshi, S. Tokutake, K. Tobe, Y. Kubota, M. Kikuchi, Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (2003) 1140–1143.
- [29] R.R. Holt, S.A. Lazarus, M.C. Sullards, Q.Y. Zhu, D.D. Schramm, G.F. Hammerstone, C.G. Fraga, H.H. Schmitz, C.L. Keen, Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4β-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa, *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002) 798–804.
- [30] V. Neveu, A. Moussy, H. Rouaix, R. Wedekind, A. Pon, C. Knox, D.S. Wishart, A. Scalbert, Exposome-Explorer: a manually-curated database on biomarkers of exposure to dietary and environmental factors, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) D979–D984.
- [31] C. Kyro, A. Olsen, H.B. Bueno-de-Mesquita, G. Skeie, S. Loft, P. Aman, M. Leenders, V.K. Dik, P.D. Siersema, T. Pischon, J. Christensen, K. Overvad, M.-C. Boutron-Ruault, G. Fagherazzi, V. Cottet, T. Kuehn, J. Chang-Claude, H. Boeing, A. Trichopoulou, A. Naska, D. Oikonomidou, G. Masala, V. Pala, R. Tumino, P. Vineis, A. Mattiello, P.H. Peeters, T. Bakken, E. Weiderpass, L.A. Siasi, S. Sanchez, P. Jakszyn, M.-J. Sanchez, P. Amiano, J. Maria Huerta, A. Barricarte, I. Ljuslinder, R. Palmqvist, K.-T. Khaw, N. Wareham, T.J. Key, R.C. Travis, N. Slimani, H. Freisling, P. Ferrari, M.J. Gunter, N. Murphy, E. Riboli, A. Tjonneland, R. Landberg, Plasma alkylresorcinol concentrations biomarkers of whole-grain wheat and rye intake, in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort, *Br. J. Nutr.* 111 (2014) 1881–1890.
- [32] J.K. Prasain, A. Arabshahi, D.R. Moore 2nd, G.A. Greendale, J.M. Wyss, S. Barnes, Simultaneous determination of 11 phytoestrogens in human serum using a 2 min liquid chromatography/tandem mass spectrometry method, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 878 (2010) 994–1002.
- [33] C. Wynn, S. Bolca, D. De Keukeleire, A. Heyerick, Development of a high-throughput LC/APCI–MS method for the determination of thirteen phytoestrogens including gut microbial metabolites in human urine and serum, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 878 (2010) 949–956.
- [34] M.I. Orozco-Solano, C. Ferreira-Vera, F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, Automated method for determination of olive oil phenols and metabolites in

- human plasma and application in intervention studies, *J. Chromatogr. A* 1258 (2012) 108–116.
- [35] C. Marmet, L. Actis-Goretta, M. Renouf, F. Giuffrida, Quantification of phenolic acids and their methylates glucuronides, sulfates and lactones metabolites in human plasma by LC-MS/MS after oral ingestion of soluble coffee, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 617–625.
- [36] M. Gasperotti, D. Masuero, G. Guella, F. Mattivi, U. Vrhovsek, Development of a targeted method for twenty-three metabolites related to polyphenol gut microbial metabolism in biological samples, using SPE and UHPLC–ESI–MS/MS, *Talanta* 128 (2014) 221–230.
- [37] R.P. Feliciano, E. Mecha, M.R. Bronze, A. Rodriguez-Mateos, Development and validation of a high-throughput micro solid-phase extraction method coupled with ultra-high-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid identification and quantification of phenolic metabolites in human plasma and urine, *J. Chromatogr. A* 1464 (2016) 21–31.

Appendix A. Supplementary data

**Quantification of 38 dietary polyphenols in plasma by differential isotope labelling and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry**

David Achaintre <sup>a,\*</sup>, Audrey Gicquiau <sup>a</sup>, Liang Li <sup>b</sup>, Sabina Rinaldi <sup>a</sup>, Augustin Scalbert

<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup>Biomarkers Group, Nutrition and Metabolism Section, International Agency for Research on Cancer (IARC), 69372 Lyon Cedex 08, France

<sup>b</sup>Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2G2 Canada

**Content**

**Table S-1.** Polyphenol concentrations (nM) in plasma or serum samples collected from free-living subjects in various studies documented in the Exposome-Explorer database and comparison with data obtained in the present work.

**Fig. S-1.** Kinetics of degradation of dansylated polyphenols.

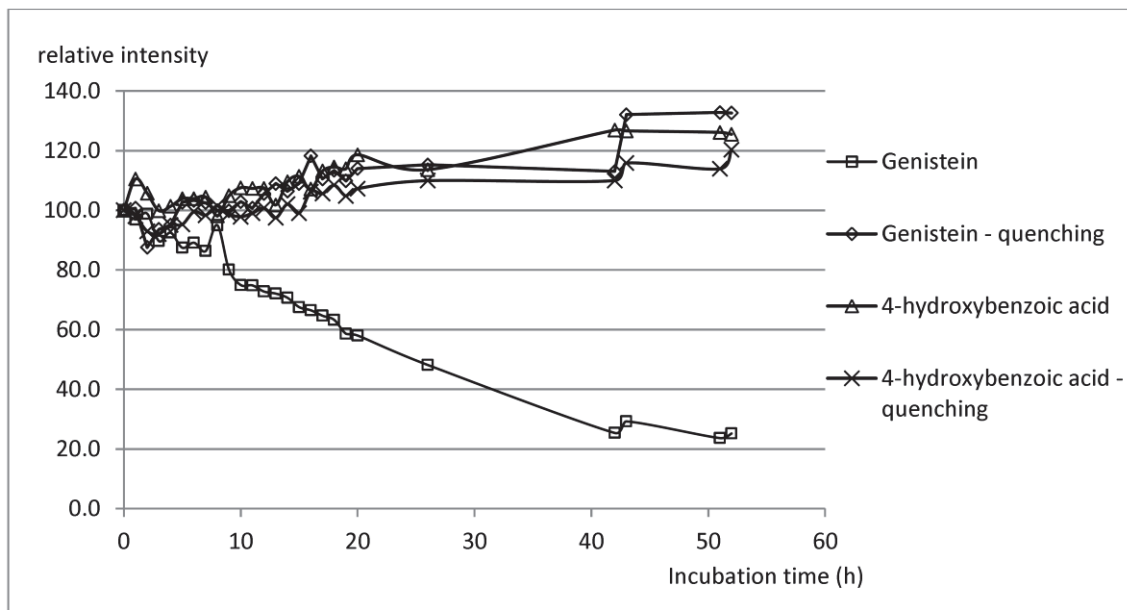
**References**

**Table S-1.** Polyphenol concentrations (nM) in plasma or serum samples collected from free-living subjects in various studies documented in the Exposome-Explorer database and comparison with data obtained in the present work.

Biomarker	Publication	Country	Subjects (n)	Mean (nM)	SD	Median (nM)	
3,5-Dihydroxybenzoic acid	(1)	Finland	56	94	82		
	This work	Western Europe	1163	37	45	19	
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	(1)	Finland	56	90	59		
	This work	Western Europe	1163	44	39	31	
Kaempferol	(2)	Germany	48	10.6	7.9	8.7	
	(3)	China	92	90	74		
	(4)	China	92	58	61	38	
	This work	Western Europe	1163	99	29	94	
Quercetin	(2)	Germany	48	23	16.6	20	
	(3)	China	92	72	81		
	(4)	China	92	80	82	54	
	This work	Western Europe	1163	371	122	346	
Apigenin	(3)	China	92	11.9	12.6		
	(4)	China	92	10.6	12.3	6.1	
	This work	Western Europe	1163	16	4.2	15.4	
Naringenin	(2)	Germany	45	8.1	15.4	0.0	
	This work	Western Europe	1163	15.4	28.9	4.7	
Hesperetin	(2)	Germany	47	22	45	5.7	
	This work	Western Europe	1163	20	38	2.5	
Daidzein	(5)	United Kingdom	198			18.0	
	(6)	United States	96			5.0	
	(7)	United Kingdom	58	7.8	11.0		
	(8)	United Kingdom	284			8.7	
	(9)	United States	40			4.0	
	(10)	United States	60			3.7	
	(11)	Japan	202	120	136	77	
	(12)	Japan	106	112	188	72	
	This work	Western Europe	1163	32	55	11.5	
	Genistein	(5)	United Kingdom	196			34
		(6)	United States	96			10.9
		(7)	United Kingdom	58	18.3	20.7	
(8)		United Kingdom	284			3.5	
(9)		United States	40			2.7	
(10)		United States	60			9.2	
(11)		Japan	202	475	510	334	
(12)		Japan	106	307	325	206	
This work		Western Europe	1163	13.4	27	4.9	



Equol	(5)	United Kingdom	198			0.0
	(8)	United Kingdom	284			0.41
	(9)	United States	40			0.6
	(10)	United States	60			0.56
	This work	Western Europe	1163	1.0	2.4	0.5
Enterodiol	(8)	United Kingdom	284			0.99
	(10)	United States	60			1.52
	This work	Western Europe	1163	2.8	5.5	1.3
Enterolactone	(7)	United Kingdom	58	13.7	18.8	
	(8)	United Kingdom	284			15.1
	(13)	Finland	926	17.8		
	(9)	United States	40			4.1
	(14)	Finland	19	9.1		
	(15)	Sweden	21			18.0
	(10)	United States	60			22.5
	This work	Western Europe	1163	13.4	19.8	8.5



**Fig. S-1.** Kinetics of degradation of dansylated polyphenols. Dansylated polyphenols were maintained at 10°C in the conditions of the reaction or after quenching performed by an evaporation under vacuum at 43°C and reconstitution with a mixture acetonitrile/H<sub>2</sub>O (1/1), and analyzed. Two out of the 38 polyphenols measured are shown as examples. Concentrations of dansylated polyphenols are expressed in relative intensity (%) as compared to initial time ( $t = 0$  h).

*References*

1. Aubertin-Leheudre M, Koskela A, Samaletdin A, Adlercreutz H. Plasma alkylresorcinol metabolites as potential biomarkers of whole-grain wheat and rye cereal fibre intakes in women. *Br J Nutr* 2010;103:339-43.
2. Radtke J, Linseisen J, Wolfram G. Fasting plasma concentrations of selected flavonoids as markers of their ordinary dietary intake. *Eur J Nutr* 2002;41:203-9.
3. Zhang Y, Cao J, Chen W, Yang J, Hao D, Zhang Y, Chang P, Zhao X. Reproducibility and relative validity of a food frequency questionnaire to assess intake of dietary flavonol and flavone in Chinese university campus population. *Nutr Res* 2010;30:520-6.
4. Cao J, Zhang Y, Chen W, Zhao X. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr* 2010;103:249-55.
5. Heald CL, Bolton-Smith C, Ritchie MR, Morton MS, Alexander FE. Phyto-oestrogen intake in Scottish men: use of serum to validate a self-administered food-frequency questionnaire in older men. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:129-35.
6. Frankenfeld CL, Patterson RE, Horner NK, Neuhouser ML, Skor HE, Kalhorn TF, Howald WN, Lampe JW. Validation of a soy food-frequency questionnaire and evaluation of correlates of plasma isoflavone concentrations in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2003;77:674-80.
7. Bhakta D, dos Santos Silva I, Higgins C, Sevak L, Kassam-Khamis T, Mangtani P, Adlercreutz H, McMichael A. A semiquantitative food frequency questionnaire is a valid indicator of the usual intake of phytoestrogens by south Asian women in the UK relative to multiple 24-h dietary recalls and multiple plasma samples. *J Nutr* 2005;135:116-23.
8. Grace PB, Taylor JI, Low YL, Luben RN, Mulligan AA, Botting NP, Dowsett M, Welch AA, Khaw KT, Wareham NJ, et al. Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Norfolk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2004;13:698-708.
9. Kotsopoulos J, Tworoger SS, Campos H, Chung F-L, Clevenger CV, Franke AA, Mantzoros CS, Ricchiuti V, Willett WC, Hankinson SE, et al. Reproducibility of Plasma and Urine Biomarkers among Premenopausal and Postmenopausal Women from the Nurses' Health Studies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2010;19:938-46.
10. Zeleniuch-Jacquotte A, Adlercreutz H, Akhmedkhanov A, Toniolo P. Reliability of serum measurements of lignans and isoflavonoid phytoestrogens over a two-year period. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:885-9.
11. Yamamoto S, Sobue T, Sasaki S, Kobayashi M, Arai Y, Uehara M, Adlercreutz H, Watanabe S, Takahashi T, Itoi Y, et al. Validity and reproducibility of a self-administered food-frequency questionnaire to assess isoflavone intake in a Japanese population in comparison with dietary records and blood and urine isoflavones. *J Nutr* 2001;131:2741-7.

12. Arai Y, Uehara M, Sato Y, Kimira M, Eboshida A, Adlercreutz H, Watanabe S. Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association* 2000;10:127-35.
13. Kilkinen A, Valsta LM, Virtamo J, Stumpf K, Adlercreutz H, Pietinen P. Intake of lignans is associated with serum enterolactone concentration in Finnish men and women. *J Nutr* 2003;133:1830-3.
14. Stumpf K, Adlercreutz H. Short-term variations in enterolactone in serum, 24-hour urine, and spot urine and relationship with enterolactone concentrations. *Clin Chem* 2003;49:178-81.
15. Sonestedt E, Ericson U, Gullberg B, Penalvo JL, Adlercreutz H, Wirfalt E. Variation in fasting and non-fasting serum enterolactone concentrations in women of the Malmö Diet and Cancer cohort. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:1005-9.

**CHAPITRE VI**  
**APPLICATION DE LA**  
**MÉTHODE DE DOSAGE DES**  
**POLYPHENOLS DANS LE**  
**PLASMA À UNE ÉTUDE CAS-**  
**TÉMOINS SUR LE CANCER**  
**COLORECTAL NICHÉE DANS**  
**LA COHORTE EPIC**

## Contexte

Le rôle des polyphénols dans la prévention du cancer colorectal est étayé par de nombreuses données *in vitro* et chez l'animal<sup>1, 355, 368</sup>. Cependant les données épidémiologiques réalisées à partir de questionnaires alimentaires sont souvent contradictoires<sup>6, 331</sup>. Ces analyses reposent d'une part sur une auto-évaluation précise par les participants de leurs consommations alimentaires à partir de questionnaires, et d'autre part sur les teneurs en polyphénols dans les aliments répertoriés dans les bases de données comme Phenol-Explorer<sup>45</sup>. Une approche objective et plus précise de l'exposition aux polyphénols consiste en la mesure de leurs concentrations dans les fluides biologiques. De telles études évaluant des biomarqueurs pour mesurer les associations entre exposition aux polyphénols et risque de cancer sont encore relativement peu nombreuses et focalisées sur un ou quelques polyphénols spécifiques comme les isoflavones ou les lignanes<sup>44</sup>. Des études souvent petites et un nombre peu important de polyphénols pourraient expliquer ces résultats. L'évaluation de l'association entre un nombre plus importants de polyphénols et le risque de cancer colorectal et portant sur 1618 sujets dans une étude nichée cas-témoins au sein de la cohorte EPIC peut permettre d'obtenir des preuves plus concluantes.

## Objectif :

Evaluer l'association entre les concentrations plasmatiques de 35 polyphénols et le risque de cancer colorectal dans une étude cas-témoins nichée dans la cohorte EPIC.

## Approche

La présente étude inclut des participants de 9 pays avec le Danemark, la France, l'Allemagne, la Grèce, l'Italie, Les Pays-Bas, l'Espagne, la Suède et le Royaume-Unis. Au sein de la cohorte entière, les personnes vivantes et exemptes de cancer au moment du diagnostic des cas, ont été sélectionnées comme contrôles et appariées avec l'âge, le sexe, le centre, le statut ménopausique et de jeûne. Les concentrations plasmatiques de 37 polyphénols ont été mesurées grâce à la méthode de dilution isotopique différentielle par spectrométrie de masse.

Pour évaluer l'association entre les concentrations en polyphénols et le risque de cancer du côlon, une régression logistique conditionnelle multi-variable stratifiée par cas-témoin, a été utilisée pour calculer les rapports de côté (odds ratios ; ORs) et les intervalles de confiance à 95% associés (95%CI). Un modèle simple est suivi par le modèle multi-variables ajusté pour l'IMC, la taille, l'activité physique, le statut tabagique, le diabète, le niveau d'éducation, la consommation d'alcool, l'utilisation de thérapie hormonale chez les femmes post-ménopausées, l'énergie totale issue de l'alimentation, la consommation de viandes rouges et transformées et de fibres alimentaires. La correction pour les tests multiples dite FDR a été appliquée en utilisant la méthode Benjamini-Hochberg permettant l'obtention des valeurs *q*. Des régressions logistiques conditionnelles sont réalisées sur les quintiles de concentrations en polyphénols, définis sur les contrôles.

## **Principaux résultats :**

Une association inverse entre l'equol et risque de cancer du côlon (OR=0.61, 95%CI=0.41 to 0.91,  $P_{\text{trend}}=0.003$ ), et une association positive entre l'acide homovanillique et le risque de cancer du côlon (OR=1.72, 95%CI=1.17 to 2.53,  $P_{\text{trend}}<0.0001$ ) ont été trouvées dans cette étude nichée cas-témoins portant sur 809 cas et 809 témoins. Aucune autre association n'a été trouvée.

## **Conclusion :**

L'equol pourrait réduire et l'acide homovanillique pourrait augmenter le risque de cancer du côlon. L'equol est un métabolite de la daidzéine produit par le microbiote. L'equol pourrait non pas avoir un rôle en soi, par une action sur les récepteurs ER $\beta$  notamment mais pourrait être un marqueur de la flore intestinale. De même l'acide homovanillique pourrait lui aussi être un indicateur de cette flore.

## **Article**

**Contribution :** 2<sup>nd</sup> auteur. J'ai analysé les polyphénols dans l'ensemble des échantillons inclus dans l'étude et participé aux discussions générales sur les analyses statistiques à mener et j'ai participé à la rédaction du manuscrit.

## A prospective evaluation of plasma polyphenol levels and colon cancer risk

Neil Murphy<sup>1</sup>, David Achaintre<sup>1</sup>, Raul Zamora-Ros<sup>2</sup>, Mazda Jenab<sup>1</sup>, Marie-Christine Boutron-Ruault<sup>3</sup>, Franck Carbonnel<sup>3,4</sup>, Isabelle Savoye<sup>3,5</sup>, Rudolf Kaaks<sup>6</sup>, Tilman Kühn<sup>6</sup>, Heiner Boeing<sup>7</sup>, Krasimira Aleksandrova<sup>8</sup>, Anne Tjønneland<sup>9</sup>, Cecilie Kyrø<sup>9</sup>, Kim Overvad<sup>10</sup>, J. Ramón Quirós<sup>11</sup>, María-Jose Sánchez<sup>12,13</sup>, Jone M. Altzibar<sup>13,14</sup>, José María Huerta<sup>13,15</sup>, Aurelio Barricarte<sup>13,16,17</sup>, Kay-Tee Khaw<sup>18</sup>, Kathryn E. Bradbury<sup>19</sup>, Aurora Perez-Cornago<sup>19</sup>, Antonia Trichopoulou<sup>20</sup>, Anna Karakatsani<sup>20,21</sup>, Eleni Peppas<sup>20</sup>, Domenico Palli<sup>22</sup>, Sara Grioni<sup>23</sup>, Rosario Tumino<sup>24</sup>, Carlotta Sacerdote<sup>25</sup>, Salvatore Panico<sup>26</sup>, H. B(as) Bueno-de-Mesquita<sup>27,28,29,30</sup>, Petra H. Peeters<sup>31,32</sup>, Martin Rutegård<sup>33</sup>, Ingegerd Johansson<sup>34</sup>, Heinz Freisling<sup>1</sup>, Hwayoung Noh<sup>1</sup>, Amanda J. Cross<sup>29</sup>, Paolo Vineis<sup>32</sup>, Kostas Tsilidis<sup>29,35</sup>, Marc J. Gunter<sup>1</sup> and Augustin Scalbert<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Section of Nutrition and Metabolism, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

<sup>2</sup> Unit of Nutrition and Cancer, Cancer Epidemiology Research Programme, Catalan Institute of Oncology, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain

<sup>3</sup> CESP, INSERM U1018, Univ. Paris-Sud, UVSQ, Université Paris-Saclay, Villejuif Cedex, France

<sup>4</sup> Université Paris Sud and Gastroenterology Unit, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, CHU de Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin Bicêtre, France

<sup>5</sup> Gustave Roussy, Espace Maurice Tubiana, Villejuif Cedex, France

<sup>6</sup> Division of Cancer Epidemiology, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

<sup>7</sup> Department of Epidemiology, German Institute of Human Nutrition, Potsdam-Rehbrücke, Germany

<sup>8</sup> Department of Epidemiology, Nutrition, Immunity and Metabolism Start-up Lab, Potsdam-Rehbrücke, Germany

<sup>9</sup> Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen, Denmark

<sup>10</sup> Department of Public Health, Aarhus University, Aarhus, Denmark

<sup>11</sup> Public Health Directorate, Asturias, Spain

<sup>12</sup> Escuela Andaluza de Salud Pública. Instituto de Investigación Biosanitaria IBS GRANADA. Hospitales Universitarios de Granada/Universidad de Granada, Granada, Spain

<sup>13</sup> CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

<sup>14</sup> Osakidetza/Basque Health Service, Breast Cancer Screening Program, Bilbao, Spain

<sup>15</sup> Department of Epidemiology, Murcia Regional Health Council, IMIB-Arixaca, Murcia, Spain

**Key words:** colon cancer, polyphenols, biomarkers, EPIC, nested case–control study

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest: The authors declare no potential conflicts of interest.

For information on how to submit an application for gaining access to EPIC data and/or biospecimens, please follow the instructions at <http://epic.iarc.fr/access/index.php>

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

**Grant sponsors:** European Commission (DG-SANCO), International Agency for Research on Cancer, Danish Cancer Society (Denmark), Ligue Contre le Cancer, Institut Gustave Roussy, Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) (France), German Cancer Aid, German Cancer Research Center (DKFZ), Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Deutsche Krebshilfe, Deutsches Krebsforschungszentrum, Federal Ministry of Education and Research (Germany), Hellenic Health Foundation (Greece), Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro-AIRC-Italy, National Research Council (Italy), Dutch Ministry of Public Health, Welfare and Sports (VWS), Netherlands Cancer Registry (NKR), LK Research Funds, Dutch Prevention Funds, Dutch ZON (Zorg Onderzoek Nederland), World Cancer Research Fund (WCRF), Statistics Netherlands (The Netherlands), ERC-2009-AdG 232997 and Nordforsk, Nordic Centre of Excellence programme on Food, Nutrition and Health; **Grant sponsor:** Health Research Fund (FIS); **Grant numbers:** PI13/00061, PI13/01162; **Grant sponsor:** Regional Governments of Andalucía, Asturias, Basque Country, Murcia and Navarra, ISCIII RETIC; **Grant number:** RD06/0020; **Grant sponsors:** Swedish Cancer Society, Swedish Research Council and County Councils of Skåne and Västerbotten; **Grant sponsor:** Cancer Research UK; **Grant numbers:** 14136, C570/A16491, C8221/A19170; **Grant sponsor:** Medical Research Council; **Grant numbers:** 1000143, MR/M012190/1; **Grant sponsor:** Institute of Health Carlos III and the European Social Fund (ESF); **Grant number:** CP15/00100

**DOI:** 10.1002/ijc.31563

**History:** Received 7 Dec 2017; Accepted 26 Mar 2018; Online 26 Apr 2018

**Correspondence to:** Neil Murphy, PhD, International Agency for Research on Cancer, 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon, Cedex 08, France, E-mail: [murphyn@iarc.fr](mailto:murphyn@iarc.fr) and Augustin Scalbert, PhD, International Agency for Research on Cancer, 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon, Cedex 08, France, E-mail: [scalberta@iarc.fr](mailto:scalberta@iarc.fr)



- <sup>16</sup> Navarra Public Health Institute, Pamplona, Spain
- <sup>17</sup> Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), Pamplona, Spain
- <sup>18</sup> Department of Public Health and Primary Care, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom
- <sup>19</sup> Cancer Epidemiology Unit, Nuffield Department of Population Health, University of Oxford, Oxford, United Kingdom
- <sup>20</sup> Hellenic Health Foundation, Athens, Greece
- <sup>21</sup> Pulmonary Medicine Department, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, "ATTIKON" University Hospital, Haidari, Greece
- <sup>22</sup> Cancer Risk Factors and Life-Style Epidemiology Unit, Cancer Research and Prevention Institute—ISPO, Florence, Italy
- <sup>23</sup> Epidemiology and Prevention Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy
- <sup>24</sup> Cancer Registry and Histopathology Department, Civic - M.P. Arezzo" Hospital, ASP Ragusa, Ragusa, Italy
- <sup>25</sup> Unit of Cancer Epidemiology, Città della Salute e della Scienza University-Hospital and Center for Cancer Prevention (CPO), Turin, Italy
- <sup>26</sup> Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Federico II University, Naples, Italy
- <sup>27</sup> Department for Determinants of Chronic Diseases (DCD), National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), PO Box 1, Bilthoven, BA 3720, The Netherlands
- <sup>28</sup> Department of Gastroenterology and Hepatology, University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands
- <sup>29</sup> Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Imperial College London, London, United Kingdom
- <sup>30</sup> Department of Social & Preventive Medicine, Faculty of Medicine, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia
- <sup>31</sup> Department of Epidemiology, Julius Center for Health Sciences and Primary Care, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands
- <sup>32</sup> MRC-PHE Centre for Environment and Health, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Imperial College London, London, United Kingdom
- <sup>33</sup> Department of Surgical and Perioperative Sciences, Umeå University, Umeå, Sweden
- <sup>34</sup> Department of Odontology, Umeå University, Umeå, Sweden
- <sup>35</sup> Department of Hygiene and Epidemiology, School of Medicine, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Polyphenols have been shown to exert biological activity in experimental models of colon cancer; however, human data linking specific polyphenols to colon cancer is limited. We assessed the relationship between pre-diagnostic plasma polyphenols and colon cancer risk in a case-control study nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. Using high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, we measured concentrations of 35 polyphenols in plasma from 809 incident colon cancer cases and 809 matched controls. We used multivariable adjusted conditional logistic regression models that included established colon cancer risk factors. The false discovery rate ( $q_{\text{value}}$ ) was computed to control for multiple comparisons. All statistical tests were two-sided. After false discovery rate correction and in continuous  $\log_2$ -transformed multivariable models, equol (odds ratio [OR] per  $\log_2$ -value, 0.86, 95% confidence interval [95% CI] = 0.79–0.93;  $q_{\text{value}} = 0.01$ ) and homovanillic acid (OR per  $\log_2$ -value, 1.46, 95% CI = 1.16–1.84;  $q_{\text{value}} = 0.02$ ) were associated with colon cancer risk. Comparing extreme fifths, equol concentrations were inversely associated with colon cancer risk (OR = 0.61, 95% CI = 0.41–0.91,  $p_{\text{trend}} = 0.003$ ), while homovanillic acid concentrations were positively associated with colon cancer development (OR = 1.72, 95% CI = 1.17–2.53,  $p_{\text{trend}} < 0.0001$ ). No heterogeneity for these associations was observed by sex and across other colon cancer risk factors. The remaining polyphenols were not associated with colon cancer risk. Higher equol concentrations were associated with lower risk, and higher homovanillic acid concentrations were associated with greater risk of colon cancer. These findings support a potential role for specific polyphenols in colon tumorigenesis.

#### What's new?

Polyphenols are antioxidants abundant in food, and some polyphenols have demonstrated an anti-cancer effect. Here, the authors looked for an association between polyphenols and colon cancer risk by conducting a nested case-control analysis within the EPIC cohort. Rather than employing questionnaires that rely on participant memories of their diet, this study directly measured 35 polyphenols in plasma samples and compared them with colon cancer risk. Only 2 chemicals showed any association. Concentrations of equol, which is metabolized from soy foods, were inversely associated with colon cancer risk. Higher levels of homovanillic acid, on the other hand, were associated with increased risk.

Polyphenols are plant-based bioactive compounds characterized by the presence of phenolic group(s) in their structure. Polyphenols are abundant in the human diet and dietary sources such as fruits, vegetables, nuts, legumes, whole-grain cereals, cocoa, soya beans, tea, coffee and wine.<sup>1,2</sup> Over 500 different polyphenols have been identified from dietary

sources and can be broadly divided into four common classes: phenolic acids, flavonoids, lignans and stilbenes.<sup>1</sup> Polyphenols are the most abundant antioxidants in the human diet,<sup>3</sup> and are postulated to confer anti-inflammatory and estrogenic effects (e.g., isoflavonoids).<sup>4,5</sup> Once ingested, they can be metabolized by the intestinal microbiota into low-

molecular weight phenolic acids and into various conjugated forms (e.g., glucuronides) in human tissues.<sup>1,6</sup>

Experimental evidence supports a chemo-preventive role for certain polyphenols against colon cancer development. Phenolic acids, such as caffeic acid and ferulic acid, have been shown to have anti-proliferative effects on colon cancer in *in vitro* and *in vivo* investigations.<sup>7–9</sup> Flavonoids have been demonstrated to induce apoptosis and inhibit colon cancer cell line growth.<sup>10–12</sup> Nevertheless, prospective epidemiological studies of colon cancer which measured polyphenol intakes *via* dietary questionnaires have reported largely null results. In the Nurses' Health Study, Health Professionals Follow-up Study, and the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study, dietary intakes of flavonoids and its sub-classes were unrelated to colon cancer risk.<sup>13–15</sup> Such analyses are reliant on participant's self-reporting previous dietary intakes accurately and the availability of reliable data from databases on the polyphenol content of foods. A more objective, and potentially more accurate approach to assess how polyphenols are associated with colon cancer risk, is to directly measure levels of polyphenols directly in bio-specimens. Previous studies, which have undertaken such analyses have been of relatively small size, focused on small selections of polyphenols, and have produced inconclusive results.<sup>16–18</sup>

To provide more conclusive evidence on the association of polyphenol levels and colon cancer we conducted a nested case-control analysis within the EPIC cohort, in which we measured 35 polyphenols in prospectively collected plasma samples using a recently developed method based on mass spectrometry and studied their associations with colon cancer risk.

## Methods

### Study population and collection of blood samples and data

EPIC is a multicenter prospective cohort of 521,330 participants, mostly aged  $\geq 35$ , who were recruited in 1992–2000, predominantly from the general population of 10 European countries.<sup>19,20</sup> Additional detail on the study population is provided in the Supporting Information Methods. Blood samples were collected at recruitment according to standardized procedures<sup>19,20</sup> and stored at the International Agency for Research on Cancer ( $-196^{\circ}\text{C}$ , liquid-nitrogen) for all countries except Denmark ( $-150^{\circ}\text{C}$ , nitrogen-vapor) and Sweden ( $-80^{\circ}\text{C}$ , freezers). Participants completed standardized lifestyle and personal history questionnaires at recruitment, and most participants also had anthropometric measurements and blood samples taken at recruitment before disease onset or diagnosis. Diet over the previous 12-months was assessed at recruitment using validated country/center-specific dietary questionnaires.<sup>19,20</sup> All participants provided written informed consent. Ethical approval for the EPIC study was obtained from the review boards of the International Agency for Research on Cancer (IARC) and local participating centers.

### Follow-up for cancer incidence

Cancer incidence was determined through record linkage with regional cancer registries (Denmark, Italy, the Netherlands, Spain, Sweden, United Kingdom) or *via* a combination of methods, including the use of health insurance records, contacts with cancer and pathology registries and active follow-up through participants and their next of kin (France, Germany, Greece). Colon cancer cases were defined using the tenth revision of the International Classification of Diseases (ICD-10) and the second revision of the International Classification of Diseases for Oncology (ICDO-2). Colon cancers include those within the proximal (C18.0–18.5), distal (C18.6–C18.7), overlapping (C18.8) and unspecified (C18.9) regions.

### Selection of cases and controls

Controls were selected from the all participants who were alive and free of cancer (except non-melanoma skin cancer) at the time of diagnosis of the cases, using incidence density sampling, and with controls matched to cases by age, sex, study center, follow-up time since blood collection, time of day at blood collection, fasting status, menopausal status and phase of menstrual cycle at blood collection. The current study included 809 incident colon cancer cases and 809 matched controls.

### Laboratory methods

Plasma polyphenol measurements were undertaken at IARC (France) using a differential isotope labeling method and mass spectrometry (Achainre *et al.* under review). The 35 polyphenols measured are listed in Table 2. Citrated plasma samples were first treated with a  $\beta$ -glucuronidase/sulfatase enzyme mixture containing ascorbic acid and the resulting polyphenol aglycones were extracted twice with ethyl acetate. Quenching was applied by evaporation under vacuum followed by reconstitution with water/acetonitrile. Quantitative dansylation of phenolic hydroxyl groups was carried out with either  $^{13}\text{C}$ -labeled dansyl chloride (samples) or non-labeled dansyl chloride (well-characterized reference pooled sample). Each  $^{13}\text{C}$ -dansylated sample was mixed with the  $^{12}\text{C}$ -dansylated reference sample, and the relative concentrations in samples over the reference sample were determined in batches of 50 samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry *via* an electrospray interface. Limits of quantification for the polyphenols varied between 0.11 nmol/L for apigenin and 44.4 nmol/L for quercetin. Intra-batch coefficients of variation varied between 2.3% and 9%. Inter-batch coefficients of variations were  $<20\%$  for all except four polyphenols (quercetin, gallic acid, hydroxytyrosol and enterodiol). Spiking experiments showed good accuracy for 29 polyphenols (72%–122% recovery) and satisfactory for the others (43%–62%). Dilution experiments also showed good recovery (90%–120%) for 30 of the 35 compounds tested.

### Statistical analysis

Spearman's rank correlation coefficients were calculated to assess the correlations between plasma concentrations of polyphenols and dietary variables among control participants. Multivariable conditional logistic regression, stratified by case-control set, was used to compute odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) for the associations between  $\log_2$ -transformed plasma polyphenol concentrations and colon cancer risk. The basic model was conditioned on the matching factors only, while the multivariable model included additional adjustment for body mass index (BMI), height, physical activity, smoking status, prevalent diabetes, education level, alcohol consumption, ever use of postmenopausal hormone therapy (HT) and dietary intakes of total energy, red and processed meats and fiber. False discovery rate (FDR;  $q_{\text{value}}$ ) correction was performed using the Benjamini-Hochberg method.<sup>21</sup> Additional analyses were then conducted for polyphenols which were associated with colon cancer after correction for multiple comparisons ( $q_{\text{value}} < 0.05$ ). For these analyses, participants were divided into fifths based on polyphenol concentrations in the control group, and multivariable conditional logistic regression models were undertaken. Statistical tests for trend ( $p_{\text{trend}}$ ) for a given analyte were calculated using the ordinal quartile entered into the models as a continuous variable. Possible nonlinear effects were modeled using restricted cubic spline models. Sub-group analyses were conducted by anatomical site (proximal colon and distal colon), sex, BMI, ever use of HT, age at recruitment and dairy product consumption (above and below median based on distribution of the control group), and formally tested for heterogeneity using  $\chi^2$  tests. To assess whether preclinical disease may have influenced the results, cases diagnosed within the first 4-years were excluded. Statistical tests used in the analysis were all two-sided.

## Results

### Descriptive data analysis

Compared with the control group participants, colon cancer cases had a higher BMI and homovanillic acid concentrations, and lower equol concentrations (Tables 1 and 2). Weak correlations were observed between concentrations of the 35 plasma polyphenols and dietary intakes, except for tea ((+)-epigallocatechin,  $r = 0.64$ ; gallic acid,  $r = 0.51$ ) and coffee (ferulic acid,  $r = 0.48$ ; caffeic acid,  $r = 0.46$ ) (Fig. 1). The strongest correlations (all  $p < 0.0001$ ) between polyphenol concentrations were found for 3,5-dihydroxybenzoic acid and 3,5-dihydroxyphenylpropionic acid ( $r = 0.90$ ); genistein and daidzein ( $r = 0.81$ ); hesperetin and naringenin ( $r = 0.76$ ) and quercetin and kaempferol ( $r = 0.71$ ). Median (5th–95th percentile) concentrations of polyphenols among controls by country are shown in Supporting Information Table S1.

Table 1. Baseline characteristics of colon cancer cases and controls

Baseline characteristic	Cases	Controls
Colon cancer cases ( <i>n</i> )	809	809
Men ( <i>n</i> )	323 (39.9)	323 (39.9)
Women ( <i>n</i> )	486 (60.1)	486 (60.1)
Age at blood collection (years) <sup>1</sup>	56.8 (7.5)	56.8 (7.4)
Years of follow-up <sup>1</sup>	6.6 (3.7)	-
Anthropometrics <sup>1</sup>		
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	26.9 (4.4)	26.3 (3.8)
Height (cm)	166.4 (9.4)	165.5 (9.5)
Smoking status <sup>2</sup>		
Never	378 (46.7)	404 (49.9)
Former	242 (29.9)	226 (27.9)
Current	180 (22.3)	175 (21.6)
Physical activity <sup>2</sup>		
Inactive	228 (28.2)	212 (26.2)
Moderately inactive	295 (36.5)	275 (34.0)
Moderately active	159 (19.7)	160 (19.8)
Active	125 (15.5)	159 (19.7)
Education level <sup>2</sup>		
None/primary school completed	371 (46.2)	384 (47.7)
Technical/professional/secondary school	304 (37.9)	292 (36.3)
Longer education (including university degree)	122 (15.2)	122 (15.2)
Ever menopausal hormone therapy use <sup>2</sup>		
No	330 (42.4)	346 (44.1)
Yes	126 (16.2)	115 (14.7)
Prevalent diabetes <sup>2</sup>		
No	739 (95.1)	740 (95.2)
Yes	32 (4.1)	32 (4.1)
Dietary intakes <sup>1</sup>		
Alcohol consumption (g/day)	13.8 (19.2)	12.9 (17.4)
Total energy (kcal/day)	2111.9 (751.0)	2101.5 (639.9)
Red and processed meat (g/day)	78.9 (69.1)	78.8 (48.4)
Fiber (g/day)	22.6 (7.9)	23.1 (8.0)

<sup>1</sup>Values are mean (standard deviation). <sup>2</sup>Values are *n* (%) with participants with any missing/unknown values for baseline characteristics excluded.

### Polyphenol concentrations and risk of colon cancer

Of the 35 polyphenols included in this analysis, in the multivariable models after FDR correction ( $q_{\text{value}} < 0.05$ ), equol and homovanillic acid were significantly associated with colon cancer risk. In continuous  $\log_2$ -transformed multivariable models, equol was inversely (OR per  $\log_2$ -value, 0.86, 95% CI = 0.79–0.93;  $q_{\text{value}} = 0.01$ ; OR[comparing extreme fifths] = 0.61, 95% CI = 0.41–0.91,  $p_{\text{trend}} = 0.003$ ; Table 4) and

Table 2. Median (5th–95th percentile) concentrations of plasma polyphenols (nmol/L) among colon cancer cases and controls

Polyphenol class/subclass	Cases			Controls			<i>p</i> for difference <sup>§</sup>
	Median	5th	95th	Median	5th	95th	
Phenolic acids/Hydroxybenzoic acids (nmol/L)							
4-Hydroxybenzoic acid	202.0	152.0	367.0	201.0	150.0	353.0	0.56
3-Hydroxybenzoic acid	19.1	7.1	59.4	19.5	7.1	61.0	0.49
Protocatechuic acid	155.0	121.0	194.0	155.0	120.0	195.0	0.44
Gallic acid	38.0	22.0	91.0	37.0	21.0	96.0	0.62
Vanillic acid	178.0	95.0	353.0	176.0	95.0	359.0	0.60
3,5-Dihydroxybenzoic acid	28.6	7.0	150.6	29.0	6.6	156.0	0.97
Gallic acid ethyl ester	1.1	1.1	11.1	1.1	1.1	8.6	0.41
Phenolic acids/Hydroxyphenylacetic acids (nmol/L)							
4-Hydroxyphenylacetic acid	324.0	185.0	888.0	315.0	194.0	888.0	0.18
3-Hydroxyphenylacetic acid	58.4	2.2	236.4	55.3	2.2	238.9	0.95
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	40.8	23.8	76.5	40.0	24.2	78.0	0.40
Homovanillic acid	88.0	51.0	182.0	84.0	51.0	172.0	0.007
Phenolic acids/Hydroxyphenylpropanoic acids (nmol/L)							
3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	193.5	133.0	375.0	195.0	133.0	426.0	0.51
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	41.2	10.8	161.0	39.7	10.8	162.8	0.78
Phenolic acids/Hydroxycinnamic acids (nmol/L)							
<i>p</i> -Coumaric acid	17.9	11.9	37.1	17.7	11.7	33.6	0.26
<i>m</i> -Coumaric acid	9.7	2.2	79.2	10.6	2.2	88.8	0.07
Caffeic acid	430.0	336.0	615.0	427.0	341.0	606.0	0.93
Ferulic acid	92.0	49.0	407.0	93.0	49.0	409.0	0.90
Flavonoids/Flavonols (nmol/L)							
Kaempferol	93.0	63.0	143.5	92.0	64.0	138.0	0.58
Quercetin	349.0	222.0	633.0	342.0	213.0	585.0	0.29
Flavonoids/Flavanols (nmol/L)							
(+)-Catechin	19.4	5.6	66.8	18.1	5.6	64.4	0.10
(–)-Epicatechin	17.7	5.6	116.5	17.0	5.6	102.0	0.30
(+)-Gallocatechin	11.1	11.1	26.5	11.1	11.1	27.3	0.89
(+)-Epigallocatechin	11.1	11.1	68.7	11.1	11.1	70.6	0.97
Flavonoids/Flavones (nmol/L)							
Apigenin	14.7	11.5	19.5	14.7	11.5	18.8	0.51
Flavonoids/Flavanones (nmol/L)							
Naringenin	3.8	1.7	69.6	4.0	1.7	78.3	0.23
Hesperetin	2.0	0.6	145.2	2.3	0.6	122.9	0.32
Flavonoids/Isoflavonoids (nmol/L)							
Daidzein	12.8	2.6	128.6	12.1	2.6	185.9	0.76
Genistein	4.9	1.4	47.2	4.9	1.3	66.1	0.36
Equol	0.37	0.1	2.3	0.42	0.1	2.9	0.002
Flavonoids/Dihydrochalcones (nmol/L)							
Phloretin	1.1	1.1	9.5	1.1	1.1	8.3	0.73
Stilbenes (nmol/L)							
Resveratrol	2.6	1.1	16.1	2.6	1.1	14.1	0.98
Tyrosols (nmol/L)							
Tyrosol	3.0	1.4	9.2	2.9	1.4	9.7	0.57
Hydroxytyrosol	28.1	17.2	63.7	27.3	18.1	61.0	0.47

Int. J. Cancer: 143, 1620–1631 (2018) © 2018 The Authors International Journal of Cancer published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of IJCC

Table 2. Median (5th–95th percentile) concentrations of plasma polyphenols (nmol/L) among colon cancer cases and controls (Continued)

Polyphenol class/subclass	Cases			Controls			<i>p</i> for differences <sup>§</sup>
	Median	5th	95th	Median	5th	95th	
Lignans (nmol/L)							
Enterodiol	1.1	0.2	10.8	1.0	0.2	11.5	0.88
Enterolactone	9.6	0.8	53.8	10.1	1.0	55.8	0.47

<sup>§</sup>Calculated using *t*-tests.

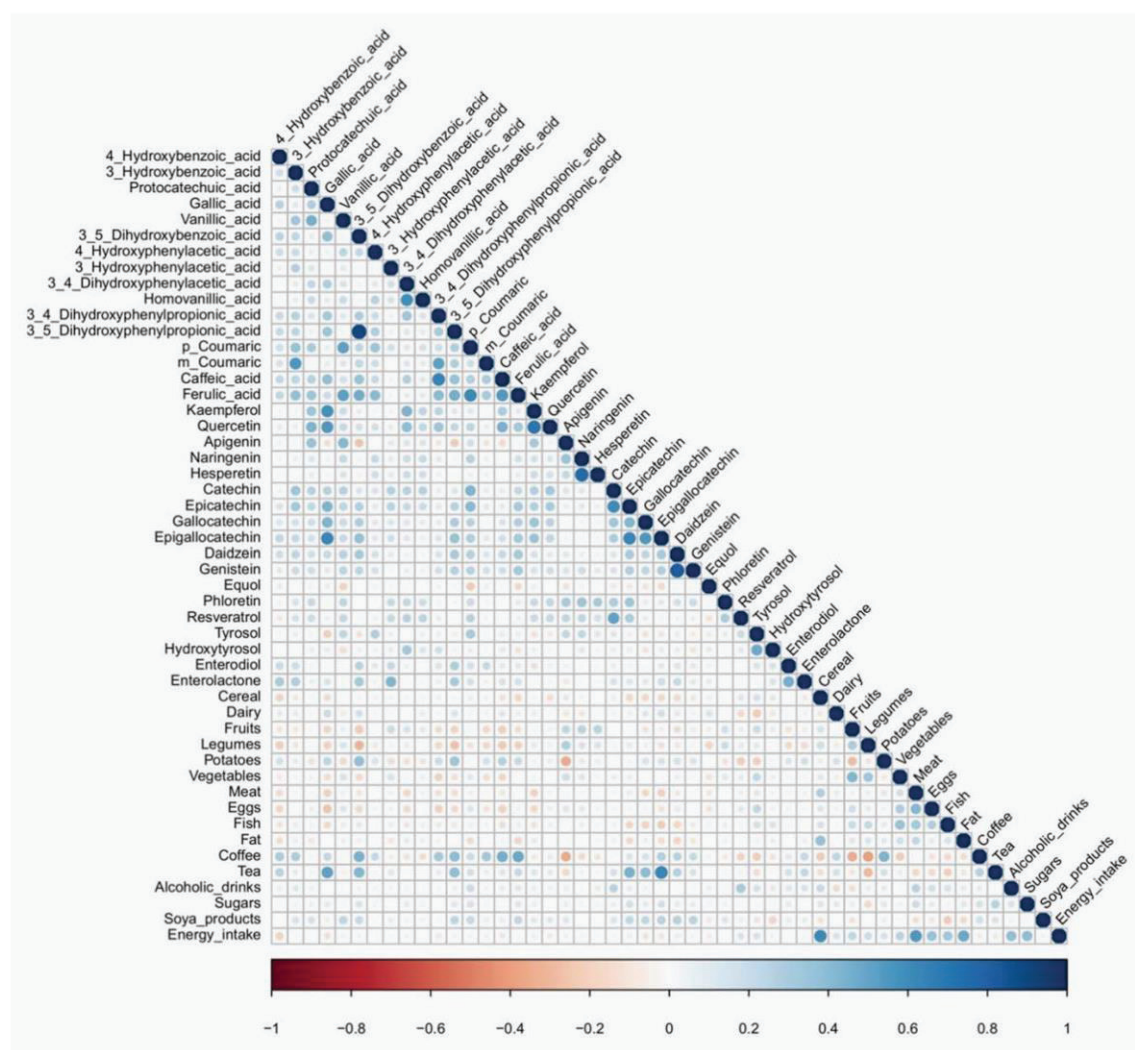


Figure 1. Spearman correlation heatmap among polyphenols and dietary intakes at recruitment among all controls (*n* = 809). Circle color reflects the strength and direction of the correlation. The size of the circle reflects the *p*<sub>value</sub> (the bigger the circle, the stronger the *p*-value). Where blank, this reflects statistically non-significant correlations (*p*<sub>value</sub> > 0.05). [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

homovanillic acid was positively (OR per log<sub>2</sub>-value, 1.46, 95% CI = 1.16–1.84; *q*<sub>value</sub> = 0.02; (OR[comparing extreme fifths]=1.72, 95% CI = 1.17–2.53, *p*<sub>trend</sub> < 0.0001)

associated with colon cancer risk (Table 3). The remaining 33 polyphenols were not associated with colon cancer risk (Table 3).

Table 3. Risk of colon cancer for log<sub>2</sub>-transformed polyphenol concentrations (sorted by multivariable model false discovery rate [FDR] *q*<sub>value</sub>s)

	Basic model				Multivariable model			
	OR per log <sub>2</sub> -value	95% CI	<i>p</i> <sub>value</sub>	FDR ( <i>q</i> <sub>value</sub> )	OR per log <sub>2</sub> -value	95% CI	<i>p</i> <sub>value</sub>	FDR ( <i>q</i> <sub>value</sub> )
Equol	0.88	0.82–0.95	0.0010	0.03	0.86	0.79–0.93	0.0003	0.01
Homovanillic acid	1.37	1.12–1.68	0.0020	0.03	1.46	1.16–1.84	0.0012	0.02
<i>m</i> -Coumaric acid	0.94	0.88–1.00	0.0684	0.53	0.94	0.88–1.01	0.0944	0.63
Quercetin	1.49	0.96–2.30	0.0751	0.53	1.49	0.91–2.43	0.1148	0.63
3,5-Dihydroxyphenylpropionic acid	1.02	0.92–1.13	0.7488	0.97	1.09	0.96–1.24	0.1604	0.63
<i>p</i> -Coumaric acid	1.17	0.93–1.47	0.1787	0.73	1.18	0.92–1.52	0.1830	0.63
Naringenin	0.96	0.90–1.02	0.1946	0.73	0.95	0.89–1.02	0.1876	0.63
Gallic acid	1.09	0.86–1.37	0.4750	0.73	1.20	0.91–1.57	0.1897	0.63
(+)-Catechin	1.10	0.99–1.22	0.0655	0.53	1.08	0.96–1.21	0.1944	0.63
4-Hydroxyphenylacetic acid	1.15	0.96–1.37	0.1190	0.69	1.14	0.94–1.38	0.1966	0.63
(-)-Epicatechin	1.06	0.97–1.17	0.1987	0.73	1.07	0.96–1.19	0.2011	0.63
3,5-Dihydroxybenzoic acid	1.00	0.92–1.10	0.9396	0.99	1.07	0.96–1.19	0.2467	0.63
Apigenin	1.22	0.77–1.94	0.4012	0.73	1.34	0.81–2.21	0.2545	0.63
Protocatechuic acid	1.46	0.76–2.81	0.2512	0.73	1.53	0.73–3.21	0.2604	0.63
Phloretin	1.02	0.92–1.13	0.6793	0.95	1.07	0.95–1.20	0.2714	0.63
Hesperetin	0.98	0.94–1.02	0.2639	0.73	0.97	0.93–1.02	0.2889	0.63
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	1.15	0.89–1.48	0.2752	0.73	1.16	0.87–1.55	0.3068	0.63
3-Hydroxyphenylacetic acid	1.00	0.95–1.06	0.9461	0.99	1.03	0.97–1.10	0.3432	0.67
Kaempferol	1.18	0.79–1.78	0.4215	0.73	1.24	0.77–2.01	0.3718	0.68
4-Hydroxybenzoic acid	1.12	0.83–1.51	0.4768	0.73	1.16	0.82–1.63	0.3984	0.70
Resveratrol	1.00	0.91–1.10	0.9795	0.99	0.96	0.86–1.07	0.4173	0.70
Vanillic acid	1.11	0.87–1.42	0.3897	0.73	1.11	0.85–1.45	0.4555	0.72
Genistein	0.97	0.91–1.03	0.3203	0.73	0.98	0.91–1.05	0.5092	0.76
Caffeic acid	0.97	0.61–1.52	0.8854	0.99	1.19	0.70–2.00	0.5218	0.76
Daidzein	0.99	0.93–1.06	0.7577	0.97	0.98	0.91–1.05	0.5729	0.76
Hydroxytyrosol	1.09	0.88–1.34	0.4393	0.73	1.07	0.85–1.35	0.5759	0.76
Gallic acid ethyl ester	1.06	0.95–1.18	0.3226	0.73	1.04	0.91–1.18	0.5831	0.76
Enterolactone	0.98	0.92–1.04	0.4450	0.73	0.99	0.93–1.06	0.7286	0.90
3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	0.89	0.68–1.16	0.3749	0.73	0.95	0.70–1.29	0.7481	0.90
(+)-Epigallocatechin	1.00	0.84–1.19	0.9845	0.99	1.03	0.84–1.26	0.8023	0.92
Tyrosol	1.05	0.92–1.19	0.4714	0.73	1.02	0.88–1.17	0.8133	0.92
3-Hydroxybenzoic acid	0.97	0.87–1.08	0.5863	0.85	0.99	0.88–1.12	0.9111	0.97
Ferulic acid	0.98	0.84–1.14	0.7794	0.97	1.01	0.85–1.19	0.9211	0.97
(+)-Gallocatechin	0.97	0.69–1.37	0.8685	0.99	1.01	0.66–1.54	0.9557	0.97
Enterodiol	1.00	0.94–1.07	0.9856	0.99	1.00	0.93–1.07	0.9711	0.97

Sorted by false discovery rate (FDR) *q*<sub>value</sub>s- OR per log<sub>2</sub> value (95% CI)—therefore the ORs correspond to a doubling in polyphenol level. Basic model was conditioned on matching factors only. Multivariable model was conditioned on matching factors, with additional adjustment for body mass index, height, physical activity, smoking status, education level, alcohol consumption, prevalent diabetes, ever use of menopausal hormone therapy, and dietary intakes of total energy, red and processed meats and fiber.

Since equol is produced by intestinal bacteria by metabolic transformation of daidzein, an isoflavone present within soya food products, the models were adjusted for daidzein and soya; the risk estimates remained unchanged after these additional adjustments (OR per log<sub>2</sub>-value with adjustment for

daidzein, 0.84, 95% CI = 0.76–0.92; OR per log<sub>2</sub>-value with adjustment for soya, 0.86, 95% CI = 0.79–0.93) (Table 4). The inverse relationship was also insensitive to additional adjustment for dietary intakes of dairy products and milk, which are known dietary sources of pre-formed equol<sup>22</sup>

Table 4. Risk of colon cancer for fifths of equol and homovanillic acid after further adjustment for other dietary exposures and polyphenol concentrations

	1	2	3	4	5	$P_{\text{trend}}$	OR per log <sub>2</sub> -value
Equol (nmol/L)	<0.22	0.22 to <0.35	0.35 to <0.54	0.54 to <1.01	≥1.01		
Basic	1.00	0.77 (0.55–1.07)	0.75 (0.54–1.05)	0.62 (0.44–0.87)	0.70 (0.49–1.00)	0.017	0.88 (0.82–0.95)
Multivariable	1.00	0.69 (0.47–1.00)	0.66 (0.45–0.95)	0.50 (0.34–0.74)	0.61 (0.41–0.91)	0.003	0.86 (0.79–0.93)
Plus dairy consumption	1.00	0.71 (0.48–1.03)	0.67 (0.46–0.98)	0.51 (0.35–0.76)	0.62 (0.42–0.93)	0.005	0.86 (0.79–0.93)
Plus milk consumption	1.00	0.69 (0.47–1.02)	0.68 (0.47–0.99)	0.53 (0.36–0.78)	0.63 (0.42–0.95)	0.007	0.86 (0.79–0.94)
Plus dietary calcium intake	1.00	0.71 (0.49–1.04)	0.69 (0.47–1.00)	0.52 (0.35–0.77)	0.64 (0.42–0.96)	0.007	0.86 (0.79–0.94)
Plus soya product consumption	1.00	0.68 (0.46–0.99)	0.64 (0.44–0.93)	0.50 (0.34–0.74)	0.61 (0.41–0.91)	0.003	0.86 (0.79–0.93)
Plus daidzein concentration	1.00	0.61 (0.42–0.91)	0.62 (0.42–0.92)	0.48 (0.32–0.72)	0.54 (0.35–0.84)	0.002	0.84 (0.76–0.92)
Plus genistein concentration	1.00	0.68 (0.46–0.99)	0.66 (0.45–0.95)	0.51 (0.35–0.76)	0.60 (0.40–0.91)	0.004	0.86 (0.79–0.94)
Plus daidzein and genistein concentration	1.00	0.61 (0.41–0.91)	0.62 (0.42–0.92)	0.49 (0.32–0.74)	0.54 (0.35–0.84)	0.002	0.84 (0.76–0.92)
Homovanillic acid (nmol/L)	<65	65 to <78	78 to <91	91 to <118	≥118		
Basic	1.00	0.97 (0.70–1.36)	1.05 (0.76–1.45)	1.57 (1.14–2.16)	1.54 (1.09–2.16)	<0.0001	1.37 (1.12–1.68)
Multivariable	1.00	0.97 (0.67–1.42)	1.06 (0.73–1.52)	1.77 (1.23–2.53)	1.72 (1.17–2.53)	<0.0001	1.46 (1.16–1.84)
Plus 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid concentration	1.00	0.93 (0.63–1.38)	1.06 (0.72–1.56)	1.71 (1.16–2.51)	1.59 (1.02–2.47)	0.002	1.50 (1.12–1.99)

Values are ORs for fifths of equol and homovanillic acid, and OR per log<sub>2</sub> value (95% CI). Multivariable model was conditioned on matching factors, with additional adjustment for body mass index, height, physical activity, smoking status, education level, alcohol consumption, prevalent diabetes, ever use of menopausal hormone therapy and dietary intakes of total energy, red and processed meats and fiber.

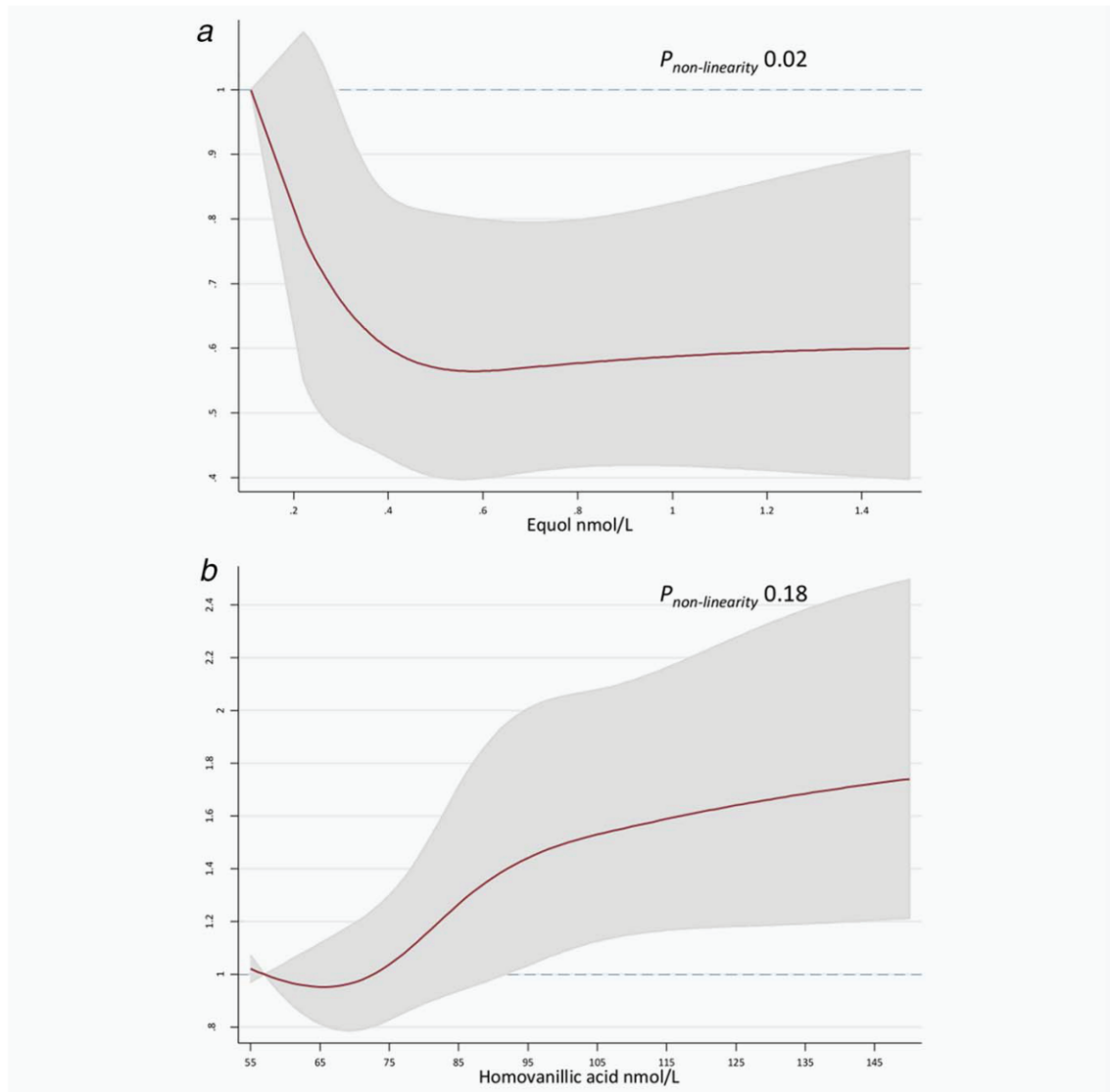


Figure 2. Association between circulating (a) equol, (b) homovanillic acid with colon cancer allowing for nonlinear effects (restricted cubic spline). Solid lines indicate the odds ratio, and shaded gray areas indicate the 95% confidence intervals. Multivariable model was conditioned on matching factors, with additional adjustment for body mass index, height, physical activity, smoking status, education level, alcohol consumption, prevalent diabetes, ever use of menopausal hormone therapy and dietary intakes of total energy, red and processed meats and fiber. The references for these restricted cubic spline plots (with five knots placed at the 10th, 25th, 50th, 75th and 95th percentiles) were 57 nmol/L for homovanillic acid and 0.11 nmol/L for equol. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

(Table 4). A non-linear relationship was observed between equol concentrations and colon cancer risk ( $p_{\text{non-linear}} = 0.02$ ), with the risk plateauing at an OR of 0.60 at plasma concentrations of 0.6 nmol/L and above (Fig. 2a). Similar strength inverse associations between equol and colon cancer were observed for women and men ( $p_{\text{heterogeneity}} = 0.54$ ) (Supporting Information Table S2), and for tumors located in the proximal

and distal colon ( $p_{\text{heterogeneity}} = 0.17$ ) (Supporting Information Table S3). A similar association was observed for equol when colon cancer cases which occurred within the first 4-years of follow-up were excluded (OR per  $\log_2$ -value, 0.89, 95% CI = 0.81–0.97). Heterogeneity for the equol and colon cancer risk relationship was found by BMI ( $p_{\text{heterogeneity}} = 0.003$ ), with an inverse association only apparent for the BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>



group (OR per  $\log_2$ -value, 0.81, 95% CI = 0.63–1.04), and not for the BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> group (OR per  $\log_2$ -value, 0.97, 95% CI = 0.85–1.10) (data not shown). No heterogeneity was observed for the relationships between equol and colon cancer risk across strata of ever HT use ( $p_{\text{heterogeneity}} = 0.28$ ), age at recruitment ( $p_{\text{heterogeneity}} = 0.84$ ) and dairy consumption ( $p_{\text{heterogeneity}} = 0.97$ ) (data not shown).

The magnitude of this positive homovanillic acid relationship was unchanged after additional statistical adjustment for concentrations of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, from which homovanillic acid is predominantly formed (*via* O-methylation) (Table 4). In the restricted cubic spline model, no evidence of non-linearity for the relationship between homovanillic acid and colon cancer was observed ( $p_{\text{non-linear}} = 0.18$ ) (Fig. 2*b*). The positive relationship for homovanillic acid was similar for women and men ( $p_{\text{heterogeneity}} = 0.87$ ) (Supporting Information Table S2), and for tumors located in the proximal and distal colon ( $p_{\text{heterogeneity}} = 0.66$ ) (Supporting Information Table S3). A similar positive relationship was observed for homovanillic acid when colon cancer cases which occurred within the first 4-years of follow-up were excluded (OR per  $\log_2$ -value, 1.39, 95% CI = 1.06–1.82). No heterogeneity was observed for the relationships between homovanillic acid and colon cancer risk strata of BMI ( $p_{\text{heterogeneity}} = 0.34$ ) and age at recruitment ( $p_{\text{heterogeneity}} = 0.25$ ) (data not shown).

## Discussion

In this large-scale study that assessed polyphenols in pre-diagnostic plasma samples, circulating concentrations of equol were inversely, and homovanillic acid were positively, associated with colon cancer risk, even after control for established colon cancer risk factors and statistical correction for multiple comparisons. We did not observe any relationships between the other measured polyphenols and colon cancer risk.

To our knowledge, this study is the first to report an inverse relationship between equol concentrations and colon cancer risk. Equol is produced by intestinal bacteria through the metabolic conversion of daidzein, an isoflavone present within soya food products.<sup>23</sup> In Western populations, circulating equol levels are relatively low due to minimal consumption of soya food products, and only ~25%–30% of the adult population are classified as “equol producers,”<sup>23</sup> *i.e.*, harboring the colonic bacteria required for the conversion of daidzein into equol. Dairy products can also be a direct source of pre-formed equol as cows fed soybean products in their feed are capable of producing equol, which is then secreted into milk,<sup>22</sup> in agreement with weak correlations ( $r = 0.33$ ) observed between urinary equol concentrations and the consumption of dairy products reported in dietary 24-hr recalls in a subset of EPIC participants.<sup>24</sup> The lower risk of colon cancer we observed with high equol concentrations is consistent with an analysis of dietary equol intake and colorectal cancer in the EPIC-Norfolk cohort, but inconsistent with an analysis of circulating equol levels and colorectal

cancer (221 cases) in the same study (OR per  $\log_2$  equol levels, 1.04, 95% CI = 0.99–1.09).<sup>16,25</sup> This discrepancy may have been a consequence of the lower equol concentrations in the EPIC-Norfolk population (median = 0.04 nmol/L)<sup>16</sup> compared to concentrations across all EPIC countries (median = 0.42 nmol/L). Nonetheless, compared to Asian populations, where soya consumption is much greater and ~50%–60% of the adult population are classified as “equol producers,”<sup>23</sup> equol levels in our study were low. In a Japanese study, which reported an inverse relationship between equol concentrations and prostate cancer risk, a median equol level of 19.4 nmol/L was recorded.<sup>26</sup> However, despite lower concentrations of equol in our European study, we nevertheless observed an inverse association with colon cancer risk.

Equol is a phytoestrogen, and in some studies higher concentrations in blood or urine have been associated with lower risks of certain reproductive system cancers such as prostate cancer<sup>26</sup> and breast cancer.<sup>27</sup> Equol shares structural similarity with mammalian estrogens and can similarly bind to estrogen receptors, in particular estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ).<sup>28</sup> Several lines of evidence support the role of estrogens potentially being beneficial against the development of colon cancer. First, experimental data have shown that expression of ER $\beta$  results in the inhibition of proliferation and G1 phase cell-cycle arrest in colon cancer cells,<sup>29</sup> and in xenograft mouse studies ER $\beta$  inhibits *cMyc* expression and tumor growth.<sup>29</sup> Second, expression of ER $\beta$  is low in human colon cancer cells<sup>30</sup> and is inversely associated with stage of colon cancer,<sup>31</sup> suggesting a possible role in disease progression. Third, lower incidence of colorectal cancer has been observed among postmenopausal HT users when compared with non-users.<sup>32–34</sup> Finally, endogenous circulating estrogens have recently been associated with reduced risk of colon cancer in a case-control study nested within the Women’s Health Initiative study.<sup>35</sup>

It is also possible that our observed inverse relationship between equol and colon cancer, rather than being a consequence of any phytoestrogenic effects of equol, is instead a marker of a particular community of intestinal microbiota which may be protective against the development of colon cancer.<sup>36</sup> Evidence suggests that a consortium of intestinal bacteria produce equol from the metabolism of daidzein. Strains of intestinal bacteria which have been shown to convert daidzein into equol in experimental models include, amongst others, *Enterococcus faecium* EPI1, *Fingoldia magna* EPI3, *Lactobacillus mucosae* EPI2 and an unknown strain of *Veillonella* sp.<sup>37–39</sup> Evidence also suggests that being an “equol producer” may also be associated with a lowering of circulating insulin-like growth factor-I levels,<sup>40</sup> which have been positively associated with colorectal cancer risk.<sup>41</sup> Overall, the inverse relationship between equol and colon cancer observed in the current study while supported by plausible biological mechanisms requires validation by additional prospective studies.

To our knowledge, this was the first study to observe that higher homovanillic acid levels were associated with greater colon cancer risk. This relationship was consistent by sex, follow-up time and across strata of other colon cancer risk factors. Homovanillic acid is formed from the O-methylation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, which is sourced from colonic microbiota metabolism of other polyphenols, such as quercetin, or from dopamine metabolism.<sup>42</sup> In our study, homovanillic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid were moderately correlated ( $r = 0.59$ ), and adjustment of the multivariable model for 3,4-dihydroxyphenylacetic acid levels did not alter the homovanillic acid–colon cancer association. Experimental data on the effects of homovanillic acid on colon cancer development are lacking but it is possible that homovanillic acid is a marker of dopamine-related metabolism. Dopamine receptors have been identified throughout the gastrointestinal tract, and human colon cancer tissue has been shown to have 3- to 10-fold lower concentrations of dopamine than normal tissue.<sup>43</sup> In addition, experimental evidence suggests that dopamine regulates tumor angiogenesis and inhibits the growth of colon cancer cell lines in pre-clinical models.<sup>44</sup> Epidemiological investigations of pre-diagnostic dopamine levels and colon cancer risk have not been undertaken. Further, it is not known how plasma concentrations of homovanillic acid and dopamine are correlated in healthy individuals and colon cancer patients. Additional prospective studies are required to corroborate the positive relationship we observed between homovanillic acid and colon cancer. Such investigations should also measure circulating dopamine levels to better understand how the degradation of dopamine and its by-products relate to colon cancer development.

Strengths of this study include the application of a newly developed analytical method able to simultaneously quantify pre-diagnostic concentrations of 35 polyphenols spanning all major classes found in the diet. The direct measurement of plasma concentrations of polyphenols captures all their possible sources or precursors and circumvents potential biases inherent to questionnaire-based data acquisition. Additional strengths of our study include the large sample size, the diverse lifestyles of participants from nine European countries which have been well characterized and allowed us to control for other risk factors which may confound the polyphenols and colon cancer relationships.<sup>45</sup> Nevertheless, as is the case in all observational epidemiological studies, we cannot rule out the possibility that residual confounding influenced the relationships we observed. A limitation is that most polyphenols show a relatively short half-life in plasma, resulting in moderate-to-high intra-individual variability depending on the compounds, unless their sources are regularly consumed.<sup>1,46</sup> Single plasma samples from baseline were used to assess the observed relationships, meaning that intra-individual variation in circulating polyphenol levels were unaccounted for, which could have caused attenuation of the observed risk estimates.<sup>46</sup>

In conclusion, in this prospective analysis which measured circulating concentrations of 35 polyphenols, levels of equol were inversely, and those of homovanillic acid positively, associated with colon cancer development. Further studies of the relationships between equol and homovanillic acid and colon cancer are now warranted, but these novel findings suggest that circulating levels of these polyphenols may be indicative of direct effects of polyphenols on colon cancer development or could represent specific pathways or phenotypes that are relevant for colon tumorigenesis.

## References

- Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727–47.
- Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, et al. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J Agric Food Chem* 2010;58:4959–69. [published Online First: 2010/03/23]
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 2005;81:215S–217S.
- Gonzalez R, Ballester I, Lopez-Posadas R, et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011;51:331–62. [published Online First: 2011/03/25]
- Barnes S. Soy isoflavones—phytoestrogens and what else? *J Nutr* 2004;134:1225S–1228S.
- Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordoñez M, et al. Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database. *Mol Nutr Food Res* 2016;60:203–11.
- Janicke B, Hegardt C, Krogh M, et al. The anti-proliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and *p*-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutr Cancer* 2011;63:611–22. [published Online First: 2011/04/19]
- Kang NJ, Lee KW, Shin BJ, et al. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis* 2008;30:321–30.
- Kang NJ, Lee KW, Kim BH, et al. Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. *Carcinogenesis* 2011;32:921–8. [published Online First: 2011/02/15]
- Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 2006;20:187–210. [published Online First: 2005/11/18]
- Pan MH, Lai CS, Wu JC, et al. Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:32–45. [published Online First: 2011/01/06]
- Matsunaga K, Katayama M, Sakata K, et al. Inhibitory effects of chlorogenic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Asian Pac J Cancer Prev* 2002;3:163–6. [published Online First: 2003/04/30]
- Lin J, Zhang SM, Wu K, et al. Flavonoid intake and colorectal cancer risk in men and women. *Am J Epidemiol* 2006;164:644–51. [published Online First: 2006/08/23]
- Nimptsch K, Zhang X, Cassidy A, et al. Habitual intake of flavonoid subclasses and risk of colorectal cancer in 2 large prospective cohorts. *Am J Clin Nutr* 2016;103:184–91. [published Online First: 2015/11/06 06:00]
- Zamora-Ros R, Barupal DK, Rothwell JA, et al. Dietary flavonoid intake and colorectal cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) cohort. *Int J Cancer* 2017;140:1836–44.
- Ward H, Chapelais G, Kuhnle GGC, et al. Lack of prospective associations between plasma and urinary phytoestrogens and risk of prostate or colorectal cancer in the European Prospective into Cancer-Norfolk Study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2008;17:2891–4.
- Zamora-Ros R, Toullaud M, Rothwell JA, et al. Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: current tools and applications and their limits. *Am J Clin Nutr* 2014;100:11–26.
- Yuan J-M, Gao Y-T, Yang CS, et al. Urinary biomarkers of tea polyphenols and risk of colorectal cancer in the Shanghai Cohort Study. *Int J Cancer* 2007;120:1344–50.
- Riboli E, Kaaks R. The EPIC Project: rationale and study design. *European Prospective*

- Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Epidemiol* 1997;26:6S–14S.
20. Riboli E, Hunt KJ, Slimani N, et al. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr* 2002;5:1113–24.
  21. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B: Methodol* 1995;57:289–300.
  22. Kuhnle GGC, Dell'acqua C, Aspinall SM, et al. Phytoestrogen content of foods of animal origin: dairy products, eggs, meat, fish, and seafood. *J Agric Food Chem* 2008;56:10099–104 [published Online First: 2008/10/17]
  23. Setchell KD, Clerici C. Equol: history, chemistry, and formation. *J Nutr* 2010;140:1355s–1362s. [published Online First: 2010/06/04]
  24. Zamora-Ros R, Achaintre D, Rothwell JA, et al. Urinary excretions of 34 dietary polyphenols and their associations with lifestyle factors in the EPIC cohort study. *Sci Rep* 2016;6:26905.
  25. Ward HA, Kuhnle GG, Mulligan AA, et al. Breast, colorectal, and prostate cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition–Norfolk in relation to phytoestrogen intake derived from an improved database. *Am J Clin Nutr* 2010;91:440–8.
  26. Kurahashi N, Iwasaki M, Inoue M, et al. Plasma isoflavones and subsequent risk of prostate cancer in a nested case–control study: the Japan Public Health Center. *JCO* 2008;26:5923–9. [published Online First: 2008/11/20]
  27. Ingram D, Sanders K, Kolybaba M, et al. Case–control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet* 1997;350:990–4. [published Online First: 1997/11/05]
  28. Setchell KD, Clerici C, Lephart ED, et al. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1072–9. [published Online First: 2005/05/11]
  29. Hartman J, Edvardsson K, Lindberg K, et al. Tumor repressive functions of estrogen receptor  $\beta$  in SW480 colon cancer cells. *Cancer Res* 2009;69:6100–6.
  30. Waliszewski P, Blaszczyk M, Wolinska-Witort E, et al. Molecular study of sex steroid receptor gene expression in human colon and in colorectal carcinomas. *J Surg Oncol* 1997;64:3–11.
  31. Castiglione F, Taddei A, Rossi Degl'Innocenti D, et al. Expression of estrogen receptor beta in colon cancer progression. *Diagn Mol Pathol* 2008;17:231–6. [published Online First: 2008/11/27]
  32. Nanda KF, Bastian LAFAU, Hasselblad VF, et al. Hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1999;93(5 Pt 2):880–88.
  33. Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med* 1999;106:574–82.
  34. Green J, Czanner G, Reeves G, et al. Menopausal hormone therapy and risk of gastrointestinal cancer: nested case–control study within a prospective cohort, and meta-analysis. *Int J Cancer* 2012;130:2387–96.
  35. Murphy N, Strickler HD, Stanczyk FZ, et al. A prospective evaluation of endogenous sex hormone levels and colorectal cancer risk in postmenopausal women. *JNCIJ* 2015;107:djv210.
  36. Lampe JW. Emerging research on equol and cancer. *J Nutr* 2010;140:1369S–1372S.
  37. Hullar MA, Burnett-Hartman AN, Lampe JW. Gut microbes, diet, and cancer. *Cancer Treat Res* 2014;159:377–99. [published Online First: 2013/10/12]
  38. Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, et al. Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol* 2005;183:45–55. [published Online First: 2004/12/04]
  39. Rafii F. The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol. *Metabolites* 2015;5:56–73. [published Online First: 2015/01/17]
  40. Vrieling A, Rookus MA, Kampman E, et al. Isolated isoflavones do not affect the circulating insulin-like growth factor system in men at increased colorectal cancer risk. *J Nutr* 2007;137:379–83. [published Online First: 2007/01/24]
  41. Rinaldi S, Cleveland R, Norat T, et al. Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer* 2010;126:1702NA–15.
  42. Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:800–11. [published Online First: 2003/03/22]
  43. Gemignani F, Landi S, Moreno V, et al. Polymorphisms of the dopamine receptor gene DRD2 and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2005;14:1633–8.
  44. Sarkar C, Chakroborty D, Chowdhury UR, et al. Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models. *Clin Cancer Res* 2008;14:2502–10.
  45. Bingham S, Riboli E. Diet and cancer—the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Nat Rev Cancer* 2004;4:206–15.
  46. Scalbert A, Rothwell JA, Keski-Rahkonen P, et al. The food metabolome and dietary biomarkers In: Schoeller D, Westerterp-Plantenga M, eds. *Advances in the assessment of dietary intake*. Boca Raton: CRC Press, 2017. 259–282.

# CHAPITRE VII

## DISCUSSION GÉNÉRALE

## Contexte

Le but de ce projet de thèse était de développer une méthode de quantification dans l'urine et le plasma pour un grand nombre de polyphénols représentatifs des principales classes et sous-classes trouvées dans l'alimentation ou formées par le microbiote ou par les tissus, et d'appliquer cette méthode dans une étude transversale et une étude cas-témoins sur le cancer colorectal. Une première analyse de 475 échantillons urinaires a permis de déterminer les niveaux d'excrétion urinaire de ces polyphénols dans quatre pays européens au sein de l'étude EPIC, et de caractériser les liens entre consommation des principaux aliments source de polyphénols et l'excrétion urinaire des différents polyphénols dosés. Une seconde analyse de 1659 échantillons plasmatiques dans une étude cas-témoins sur le cancer colorectal nichée au sein de l'étude EPIC a permis d'évaluer l'association entre ces polyphénols et le risque de cancer colorectal.

## Principaux résultats

Les résultats principaux des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse sont résumés dans le tableau 1. La méthode de dansylation isotopique différentielle a été développée avec succès dans deux matrices biologiques différentes. Ces méthodes ont permis pour la première fois de quantifier dans l'urine et dans le plasma une grande diversité de composés phénoliques représentatifs des classes et sous-classes de polyphénols auxquelles nous sommes les plus communément exposés. Nous avons pu mener à bien l'analyse en une seule injection de composés présents à des concentrations très variables. Nous avons pu obtenir pour la première fois des données sur les expositions à ces divers polyphénols dans une large population européenne à partir de deux matrices différentes.

Les principaux résultats du tableau 1 montrent dans le cadre de l'étude de calibration une forte variation d'excrétion urinaire en polyphénols selon les pays européens et une large gamme de concentrations entre polyphénols. Les acides phénoliques issus du métabolisme microbien sont majoritaires alors que l'equol produit également par le microbiote à partir de la daidzéine est en concentrations très faible. Les pays européens sont peu consommateurs de produits à base de soja et seulement 25 à 30% de la population peut produire de l'equol<sup>165</sup>. Enfin plusieurs polyphénols sont susceptibles d'être utilisés comme biomarqueur de l'alimentation (Tableau 1) et devraient permettre une évaluation plus précise de l'exposition aux polyphénols dans le cadre d'études épidémiologiques. Les résultats de l'étude cas-témoins sont aussi très encourageants puisque des associations avec le risque de cancer du côlon ont été trouvées pour deux métabolites des polyphénols, l'equol et l'acide homovanillique.

**Tableau 1** : Résumé des études et des résultats décrits dans cette thèse

Chapitre	Objectifs	Etude	Résultats / Conclusions
III	Développement d'une méthode analytique pour la quantification de 38 polyphénols dans l'urine	Une méthode de dilution isotopique différentielle par spectrométrie de masse a été développée. Une hydrolyse par la $\beta$ -glucuronidase d'H. pomatia a été suivi d'une extraction par l'acétate d'éthyle. Une dérivation différentielle à l'aide du Chlorure de dansyl non marqué ( $^{12}\text{C}$ ) ou marqué ( $^{13}\text{C}$ ) est réalisé et l'analyse des polyphénols dansylés est effectué par spectrométrie de masse.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Validation de 37 polyphénols (PPs) sur 38</li> <li>• Coefficients de variations <ul style="list-style-type: none"> <li>- intra-batch : 3.9% à 9.6%.</li> <li>- inter-batch &lt; 15% pour 31 composés. Et &lt; 29% pour les 6 autres.</li> </ul> </li> <li>• Rendements d'extraction : 72% à 107% pour 30 PPs, et 25% à 63% pour 7 PPs</li> <li>• Rendements dilution : 84% à 120% pour 33 PPs et 124% à 149% pour 4 PPs</li> <li>• LOQ : 0.01 <math>\mu\text{M}</math> à 1.1 <math>\mu\text{M}</math></li> <li>• Effet de matrice réduit</li> <li>• 475 échantillons urinaires de la cohorte EPIC ont été analysés avec succès.</li> </ul>
IV	Evaluation de l'excrétion urinaire de 34 polyphénols et leurs associations avec les facteurs alimentaires dans une étude de cohorte	L'excrétion urinaire des polyphénols de 475 sujets issus de 4 pays Européens a été étudiée, et l'influence des facteurs alimentaires et du style de vie sur ces excréments urinaires a été évalué. Des corrélations Pearson et Spearman ont été calculées pour évaluer ces associations.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Forte variation d'excrétions urinaires des polyphénols selon les pays européens. Reflet de la variabilité de consommation d'aliments riches en polyphénols</li> <li>• Large gamme de concentrations selon les métabolites médianes &lt; 0.1 <math>\mu\text{mol}/24\text{h}</math> pour equol à 157 <math>\mu\text{mol}/24\text{h}</math> pour l'acide 4-hydroxyphénylacétique</li> <li>• Certains polyphénols peuvent être utilisées comme biomarqueurs d'aliments riches en polyphénols comme les flavanones pour les agrumes, les acides caféique, protocatéchique et férulique pour le café, la phlorétine pour les pommes ou l'ester de l'acide gallique et le resvératrol pour le vin.</li> <li>• La mesure des polyphénols dans l'urine permet une évaluation plus précise de l'exposition aux polyphénols et donne la possibilité d'étudier de nouvelles associations avec le risque de maladies dans des études épidémiologiques.</li> </ul>

**Tableau 1** : Suite

V	Développement d'une méthode analytique pour la quantification de 38 polyphénols dans le plasma	La méthode développée sur la matrice urinaire a été adaptée et optimisée pour la matrice plasmaticque	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Validation de 37 polyphénols (PPs) sur 38</li> <li>• Coefficients de variations             <ul style="list-style-type: none"> <li>- intra-batch : 2.3% à 9%.</li> <li>- inter-batch : 2.8% à 20.3%</li> </ul> </li> <li>• Rendements d'extraction : 76% à 123% pour 29 PPs, 62% pour 1 PP et 136% à 200% pour 7 PPs</li> <li>• Rendements dilution : 77% à 122% pour 27 PPs et 132% à 176% pour 4 PPs</li> <li>• Effet de matrice réduit pour la majorité des PPs</li> <li>• Hydrolyse non total pour plusieurs PPs</li> <li>• LOQ : 0.11 nM à 44.4nM</li> <li>• 1163 échantillons plasmaticques de la cohorte EPIC ont été analysés avec succès.</li> </ul>
VI	Evaluation des concentrations plasmaticque en polyphénols et le risque de cancer du côlon dans une étude nichée cas-témoins.	Une régression logistique conditionnelle multi-variable stratifiée par cas-control, a été utilisé pour calculer les odds ratio (ORs) et les intervalles de confiance à 95% (95%CI).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• association inverse non linéaire entre equol et risque de cancer du côlon. OR=0.61, 95%CI=0.41 to 0.91, <math>P_{trend}=0.003</math></li> <li>• association positive linéaire entre l'acide homovanillique et le risque de cancer du côlon. OR=1.72, 95%CI=1.17 to 2.53, <math>P_{trend}&lt;0.0001</math></li> </ul>

## Considérations méthodologiques et interprétations des résultats

Les principaux avantages et inconvénients de la méthode de dansylation isotopique différentielle sont présentés dans le tableau 2.

Lors d'un développement méthodologique, la justesse et la précision sont deux paramètres fondamentaux. Ces deux critères de validité d'une méthode sont fortement corrélés à la présence ou non de standards internes, notamment isotopiques, spécialement dans le cas d'une méthode par spectrométrie de masse. Lorsque peu de métabolites sont mesurés, l'utilisation de plusieurs standards internes, isotopiques ou non, est préférable et possible. Les standards isotopiques, deutérés et surtout marqués par le  $^{13}\text{C}$  ou  $^{14}\text{N}$ , sont les standards internes de choix en spectrométrie de masse. Cependant beaucoup de méthodes trouvées dans la littérature utilisent souvent un standard non isotopique comme le 4-hydroxybenzophénone<sup>402</sup>, le gallate d'éthyle<sup>440</sup>, la taxifoline<sup>441</sup> ou la chrysine<sup>405</sup> pour l'ensemble des polyphénols mesurés. Parfois, aucun standard interne n'est utilisé<sup>442</sup>. Lorsque le nombre de composés d'intérêt augmentent, il est difficile et coûteux d'obtenir un nombre de standards internes conséquent. Seulement 3 standards internes isotopiques ont été utilisés par Marmet pour la mesure de 56 composés<sup>404</sup> et seulement 2 pour la mesure de 23 métabolites microbiens des polyphénols<sup>443</sup>. Ces choix s'expliquent parfois par l'absence de standards isotopiques correspondant aux métabolites mesurés, par la nécessité de réduire les coûts et souvent par souci de simplification de la méthode. Ce choix volontaire ou non n'est pas recommandable et pose un problème de validité malgré les critères de justesse et de précision attribués.

La formation de standards marqués par dansylation avec le chlorure de dansyl doublement marqué au  $^{13}\text{C}$  permet de s'affranchir de l'utilisation de standards marqués souvent non disponibles sur le marché.

La dérivation est un procédé habituellement utilisée en chromatographie gazeuse afin de rendre les métabolites plus volatiles et thermostables<sup>424</sup>. Certains auteurs ont proposé une analyse des polyphénols par GC/MS<sup>394, 444-445</sup>. Des dérivation sont aussi utilisées en chromatographie liquide (HPLC et UPLC) afin d'améliorer la sensibilité. Le chlorure de dansyl est un des réactifs le plus largement utilisé pour la dérivation des alcools, phénols et amines. L'affinité protonique du groupe amino du chlorure de dansyl favorise son ionisation en mode positif, et sa structure aromatique hydrophobe accroît son ionisation par son placement à l'interface air-solvant des gouttelettes générées lors de la phase de nébulisation-évaporation. Ces éléments augmentent grandement la sensibilité. Le comportement chromatographique des polyphénols se trouve également grandement amélioré par l'addition d'un ou plusieurs groupes dansylés.



**Tableau 2 : Avantages et inconvénients de la dansylation isotopique différentielle**

<b>Dansylation isotopique différentielle par spectrométrie de masse</b>	
<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Standards marqués non requis</li> <li>- Multichargés : Spécificité</li> <li>- Comportement chromatographique</li> <li>- Effets de matrices réduits</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Polyphénols multidansylés et multichargés               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Non applicable vs Instruments basses résolutions</li> <li>- Sensibilité réduite</li> </ul> </li> <li>- Métabolites exogènes à faible concentration : rapport <math>^{12}\text{C}/^{13}\text{C}</math></li> <li>- Hydrolyse incomplète</li> <li>- Extraction sans acidification</li> <li>- Protection groupement catéchol difficile</li> </ul>

Le chlorure de dansyle a pu être utilisé comme agent de dérivation pour la mesure de composés phénoliques autre que les polyphénols issus de l'alimentation mais sans dilution différentielle avec un chlorure de dansyle marqué en  $^{12}\text{C}$  et en  $^{13}\text{C}$  <sup>13</sup> ainsi que pour la détermination de stéroïdes <sup>22, 25</sup>. Les avantages de la dérivation sont mis à profit pour la synthèse d'agents de dérivation similaires marqués isotopiquement. C'est grâce à ces réactifs non marqués et marqués que la dilution isotopique différentielle peut être réalisée.

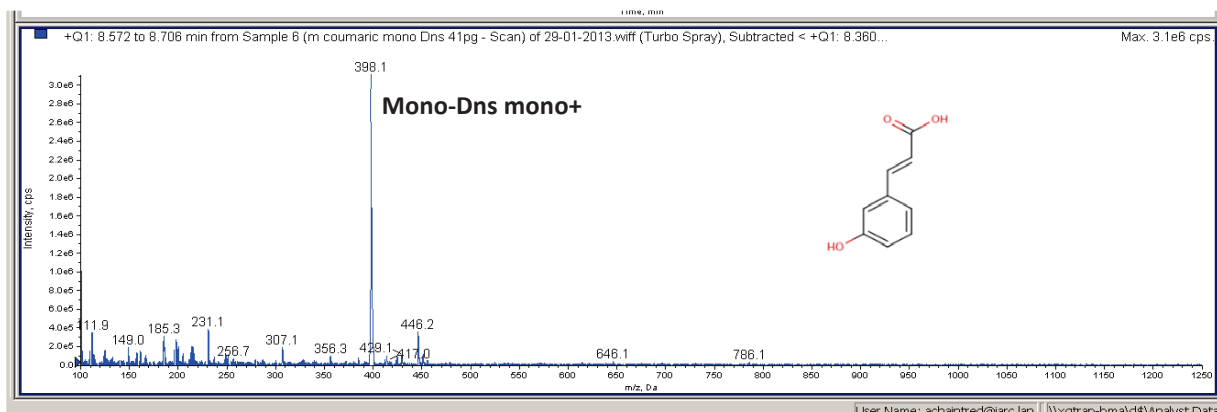
La dérivation par le chlorure de dansyl, non marqué ou marqué, apporte des avantages certains mais également quelques difficultés lorsque les molécules d'intérêt comme les polyphénols possèdent plusieurs groupes fonctionnels. Dans le cas des polyphénols, la présence de plusieurs groupes fonctionnels permet par cette dérivation d'augmenter de manière conséquente la masse globale des polyphénols. Dans le cas de composés monochargés comme l'acide *m*-coumarique, le rapport *m/z* est augmenté de 234 uma, et donne un rapport *m/z* de 398 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) au lieu de 165 pour l'acide non dérivé en mode positif et 163 en mode négatif. La spécificité et surtout la diminution du bruit améliorent de ce fait la sensibilité par une augmentation du rapport S/N.

Dans le cas de composés présentant plusieurs groupements phénoliques, l'effet observé sera dépendant du métabolite concerné. Pour un composé présentant plusieurs groupements dansyle mais avec une charge unique, comme pour la daidzéine di-Dns, les deux transitions obtenues générées par le chlorure de dansyle en  $^{12}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$  sont respectivement, 721.1 /170.1 et 721.1/171.2 et 725.1 /172.1 et 721.1/173.2. L'acide 3-5-dihydroxyphénylpropionique qui est également di-dansylé présentent 2 charges et les transitions obtenus sont 325.1 /171.1 et 325.1/170.1 et 327.1.1 /173.1 et 327.1/172.1 pour une dansylation avec le chlorure de dansyle en  $^{12}\text{C}$  ou marqué en  $^{13}\text{C}$ , respectivement (Chapitre III article - Table 1). On peut constater à partir de ces deux exemples une spécificité différente selon le nombre de charge pour un même nombre de groupements dansyle.

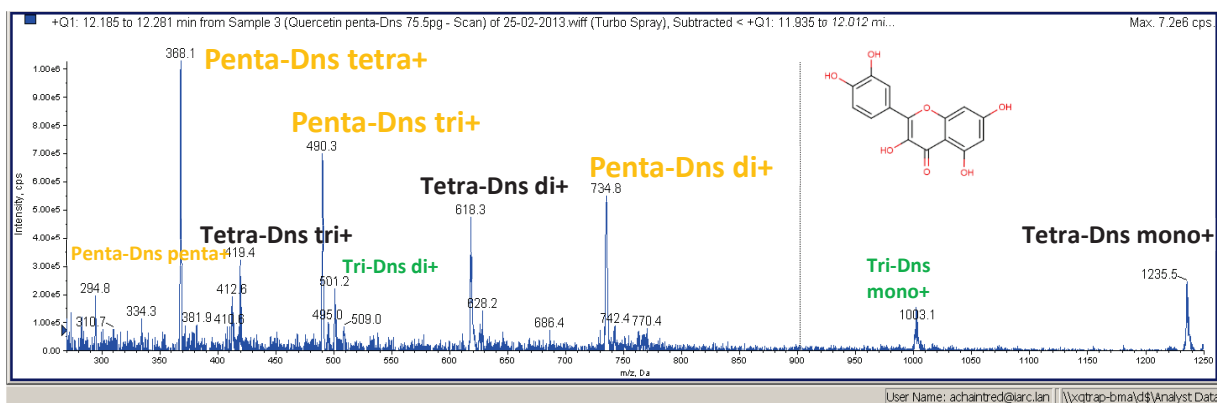
Treize polyphénols sur les 38 mesurés présentent au moins un fragment (de quantification ou de qualification) différent du fragment 170 ou 171 commun provenant du groupe dansyl <sup>23</sup> L'acide gallique et l'ester de l'acide gallique sont les 2 composés parmi ces 13 à ne posséder aucun fragment provenant du groupe dansyle (Chapitre III article - Table 1). Généralement ce fragment 170 ou 171 est présent lors de la détermination des paramètres de masse en mode automatique, mais il a été parfois possible de faire un choix plus judicieux en termes de spécificité en travaillant en mode semi-manuel pour la recherche des fragments, et en faisant le choix d'éviter ce fragment commun. Même si les ions 170 ou 171 facilitent l'annotation des composés dans une approche non ciblée, ils sont moins spécifiques dans une approche quantitative. En effet, il est admis que deux fragments et le rapport de ces deux fragments seraient spécifiques d'une molécule donnée. La mesure systématique de fragments communs limitent la spécificité attendue.

La spécificité peut être parfois grandement améliorée puisque 8 polyphénols parmi les 13 précédemment cités possèdent un fragment ayant un rapport *m/z* supérieur au rapport *m/z* de l'ion parent multichargé (Chapitre III article - Table 1). Néanmoins les polyphénols multichargés présentent deux inconvénients majeurs. La formation de nombreuses espèces réduit indirectement la limite de quantification potentielle. Les deux exemples proposés ci-

dessous soulignent cet aspect, dans le cas de l'acide *m*-coumarique et de la quercétine (Figure 20)



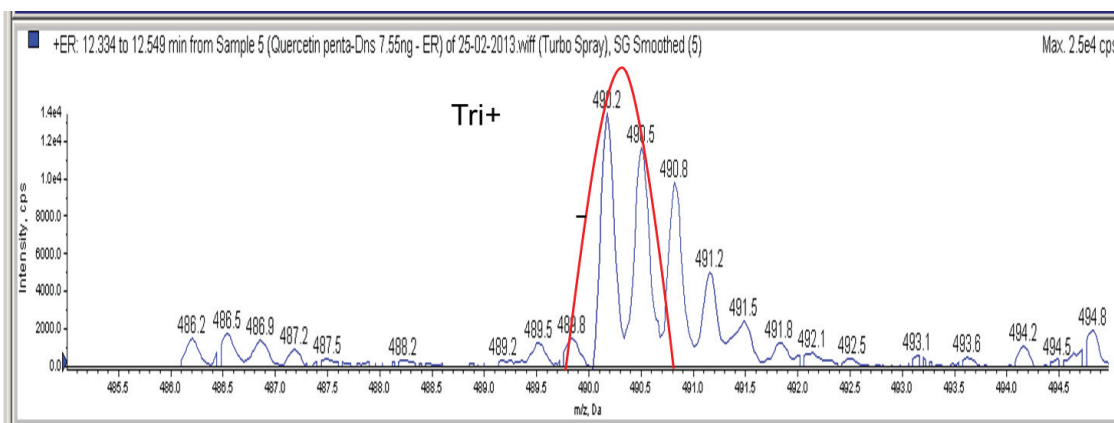
A



B

**Figure 20** : Spectre de masse de l'acide *m*-coumarique-Dns (A) et de la quercétine-Dns

Même si l'ionisation est composé-dépendante, on peut observer que la formation de nombreux fragments (mode scan) dans le cas de la quercétine (Figure B), par opposition à l'acide *m*-coumarique (Figure A) réduit la sensibilité potentielle puisque un seul de ces fragments sera utilisé pour l'élaboration des transitions MRM. Un 2<sup>nd</sup> inconvénient provient de la non-applicabilité théorique de la mesure de composés multichargés par un instrument basse résolution. Comme le montre la figure 21, une résolution unitaire ne peut différencier la masse exacte du pic ( $M+H^+$ ) des pics satellites du massif isotopique d'un composé multichargé. Cependant, l'imprécision n'est que relative puisque les composés d'intérêts dans la matrice urinaire (ou plasmatique) dansylés par le chlorure de dansyle en  $^{13}C$  est pondérée par une imprécision similaire donnée par le pool référence dansylé par le  $^{12}C$ .



**Figure 21** : Profil isotopique de la quercétine penta-Dns tri+ et représentation schématique de la résolution unitaire d'un spectromètre de masse basse résolution.

Il est à noter que la méthode originale proposée par Guo était une approche non ciblée en très haute résolution FTICR <sup>27</sup>.

Un inconvénient supplémentaire lié à la dérivation différentielle ne provient ni du réactif utilisé, ni de la nature des molécules à dériver mais de leurs concentrations attendues. La préparation de l'échantillon de référence (pool) nécessite de mélanger tous les échantillons afin d'obtenir une matrice commune servant de référence. Les polyphénols sont des molécules exogènes présentes pour certaines dans des concentrations très faibles. Certains polyphénols, comme les procyanidines dimères B1 et B2 ou bien les gallocatéchines, sont présents dans le pool à des concentrations très faibles et sont même parfois absentes. Un signal faible pour ces composés dans le pool rend le calcul du rapport plus aléatoire et moins précis, voire impossible en cas d'absence de signal.

Dans le cas du développement sur l'urine (**Chapitre III**), les concentrations rencontrées ont permis d'obtenir les rapports nécessaires au calcul des concentrations dans chaque échantillon, exceptés pour les procyanidines dimères B1 et B2. Dans ce dernier cas, ce fut problématique puisque pour tous les sujets, ces composés n'étaient pas présents.

Lors du développement de la méthode sur le plasma (**Chapitre V**) ce problème a été anticipé et le pool de chaque batch a été surchargé par une quantité optimale de procyanidine dimer B1 et B2, d'(-)-épigallocatechine et de (+)-gallocatéchine. Néanmoins il eut peut-être été nécessaire de surcharger également ces pools par la phlorétine et l'ester de l'acide gallique. Un signal trop bas généré par le pool abaisse la précision et la justesse des mesures.

Un point important concerne la variabilité attendue des concentrations entre polyphénols. La gamme dynamique des instruments ne permet pas toujours la quantification de composés généralement présents en très faibles concentrations et d'autres en très fortes. Ainsi pour la méthode développée dans l'urine il a été nécessaire de modifier les paramètres (Declustering potential, DP et Collision energy, CE) qui avaient été optimisés pour un signal maximal, afin de réduire artificiellement la sensibilité de certains acides phénoliques (**Chapitre III**). Ces paramètres ont été remodifiés pour la méthode sur le plasma en raison de bien plus faibles concentrations de ces composés (**Chapitre V**).

La dérivation différentielle est donc une technique qui s'applique à des molécules endogènes et exogènes, pour autant que les concentrations de ces dernières soient suffisantes. Une surcharge du pool peut être nécessaire.

La dansylation fonctionne dans de nombreuses conditions de pH, de température et de temps d'incubation. Un pH basique supérieur à 9 est néanmoins nécessaire, mais une basicité trop importante entrave la réaction<sup>27, 446-447</sup>. Les concentrations en chlorure de dansyle généralement utilisées varient de 1 à 20mg/mL<sup>13,27</sup> dans l'acétonitrile<sup>26</sup> ou l'acétone<sup>13</sup> avec une concentration en tampon carbonate variant de 0.05 à 2M et un pH variant de 9 à 11<sup>24,26</sup>. Sous certaines conditions plus drastiques de réaction, les fonctions carboxylique<sup>448</sup> ou alcool<sup>35, 449</sup> peuvent aussi être dansylées. Nous avons pu évaluer l'effet de ces concentrations et de ces solvants. L'acétone reste le solvant de choix en termes d'efficacité de dérivation. Une concentration de 1mg/mL est optimale dans les conditions utilisées avec un tampon carbonate 0.1M à pH=9. Nous avons pu montrer qu'une concentration de chlorure de dansyle de 5 mg/mL et surtout de 20mg/mL génère une chute drastique du signal du essentiellement à une hydrolyse inverse par excès de chlorure de dansyle<sup>447</sup>.

Nous avons pu observer également que la majorité des polyphénols dansylés étaient stables jusqu'à 13h après le début de la réaction à 10°C. Il n'a pas été jugé utile de quencher l'excès de chlorure de dansyle responsable de cette instabilité pour les analyses d'urine (**Chapitre III**). Cependant certains auteurs le préconisent afin notamment d'éviter des problèmes analytiques ultérieurs liés à l'injection de chlorure de dansyle dans le spectromètre de masse<sup>27</sup>. En revanche, ce quenching a été indispensable lors du développement de la méthode pour le plasma (**Chapitre V**) suite à une augmentation du temps nécessaire à l'analyse de chaque échantillon (de 12min à 20min). Pour ce faire, un changement de solvant a été utilisé en remplaçant l'acétone, après évaporation par de l'acétonitrile. Même s'il ne s'agit pas d'un réel quenching, la vitesse d'hydrolyse dans ce nouveau solvant s'est trouvée fortement réduite, augmentant de ce fait la stabilité jusqu'à 48h.

Un point fondamental concerne la préparation de l'échantillon en amont de la dansylation et de la détection et quantification des métabolites d'intérêt. En effet, le développement d'instruments analytiques hautement spécifiques ne peut compenser une procédure d'extraction inefficace. Certains auteurs réduisent ces étapes cruciales<sup>404</sup>.

Les polyphénols sont de manière extensive glucuronidés et sulfatés et une hydrolyse permettant de libérer l'aglycone s'avère donc nécessaire et permettre la dansylation des groupes phénoliques. Différentes  $\beta$ -glucuronidase issues de différentes sources comme des mollusques, les bovins ou les bactéries présentent des avantages et des inconvénients. Les deux premiers ont l'avantage de posséder une activité sulfatase secondaire, ce qui augmente leur intérêt. La  $\beta$ -glucuronidase d'*E. coli* ne possède pas d'activité sulfatase. L'inconvénient majeur des 2 premières sources provient des interférents potentiels présents dans la préparation enzymatique<sup>450</sup> sachant que le régime alimentaire de ces animaux contient potentiellement des polyphénols.

L'hydrolyse des glucuronides pour un grand nombre de molécules exogènes et endogènes est utilisée en routine. Néanmoins, les rendements sont très variables en fonction du protocole utilisé. Hormis les variations de pH, des quantités d'enzymes de 1 à 20 unités par  $\mu\text{L}$  d'urine ou de sérum sont en général utilisées<sup>402, 413</sup>. De même, le temps d'incubation peut varier d'1h, voire moins, à 24h selon le métabolite d'intérêt<sup>410, 413, 451</sup>. Ces données montrent l'absence de protocole standard. Malgré un spectre large de molécules sensibles à l'hydrolyse des glucuronides et sulfates, les constantes catalytiques sont probablement molécule-dépendantes et nécessitent une optimisation pour chacune d'entre elles. Cependant une analyse d'un grand nombre de molécules dans une même analyse rend cette optimisation plus difficile à mettre en place et un compromis est alors nécessaire. L'étude de l'efficacité d'hydrolyse a essentiellement été réalisée sur le plasma (**Chapitre V**). Comme anticipé, un compromis a dû être trouvé pour l'analyse de ces 38 polyphénols.

Un autre point important relatif à l'hydrolyse des polyphénols conjugués concerne l'évaluation de la présence des polyphénols dans la préparation enzymatique. La plupart des polyphénols étaient absents ( $n=16$ ) dans les blancs ou présent à des concentrations plus basses que la plus basse des concentrations mesurées dans les échantillons ( $n=17$ ). Cinq polyphénols (acide protocatéchique, caféique, gallique, *p*-coumarique et apigénine) étaient présents dans le blanc à des concentrations proches de la médiane des concentrations mesurées dans les échantillons EPIC. Cependant sur la base des tests de dilution, il a été observé que les blancs reflétaient assez peu les échantillons biologiques.

Comme précisé au chapitre II-5, deux modes d'extraction des polyphénols aglycone ont été examinés, la LLE et la SPE. Des phases stationnaires, permettant d'éliminer les phospholipides, sont aussi proposées en SPE ou SLE (Simplified Liquid Extraction). Les SPE et SLE n'ont pas été retenues. Dans le cas de SLE, 30% des polyphénols étaient retenus sur la colonne. Différents solvants et mélanges ont été testés avec l'acétate d'éthyle, le méthanol, l'acétonitrile ou l'acétone pour la LLE. L'acétate d'éthyle a montré les meilleurs rendements d'extraction des polyphénols aux propriétés physicochimiques variables. L'acidification du milieu permet d'augmenter théoriquement le rendement d'extraction mais l'acidité résiduelle suite à l'évaporation du solvant entrave la phase de dansylation réalisée ensuite en milieu basique. Des lavages de l'extrait sont nécessaires afin d'éliminer cette acidité résiduelle<sup>13</sup>. Pour la méthode développée dans l'urine et le plasma, l'utilisation d'acide n'a donc pas été retenue.

Depuis plus de 30 ans, l'utilisation d'antioxydants comme la *tert*-butylhydroquinone, le butylhydroxytoluène (BHT), l'acide ascorbique ou des sulfites est une procédure fréquente afin de prévenir l'oxydation des polyphénols lors de la détermination et de la quantification des polyphénols dans les aliments<sup>452</sup> mais également dans les matrices biologiques<sup>400, 404, 413, 418, 453</sup>. Néanmoins d'autres auteurs se sont affranchis de tels ajouts.<sup>410, 414, 419, 443, 451, 454-455</sup>. Lors du développement de la méthode dans l'urine (**Chapitre III**), il n'a pas été jugé utile d'utiliser un antioxydant. Cependant lors de la méthode développée pour le plasma (**Chapitre V**), une quantité de 10  $\mu\text{g}$  a été jugée optimale pour limiter les pertes en certains polyphénols lors de l'hydrolyse ou de la réaction de dansylation. Nous avons aussi noté qu'en l'absence

d'acide ascorbique, certains catéchols étaient fortement dégradés mais qu'un excès d'acide ascorbique est aussi fort préjudiciable pour la réaction de dansylation.

Comme indiqué précédemment, la spécificité généralement obtenue grâce à la spectrométrie de masse invite bon nombre d'analystes à limiter ces étapes d'extraction et de purification. Or, une des difficultés majeures en spectrométrie de masse réside dans la maîtrise d'un facteur limitant connu sous le nom de suppression de signal <sup>21</sup> ou plus rarement d'augmentation. Cet effet doit être, pour autant que faire se peut, éliminé voir réduit, et en tout état de cause évalué <sup>456</sup>. La présence de molécules interférentes lors de l'ionisation dans la source est à la base de cet effet. L'élimination de ces interférents par des étapes d'extraction et de purification est donc cruciale.

Dans le cas d'une matrice urinaire, ces effets n'ont pas été étudiés car les effets de matrices les plus importants sont ceux générés par les phospholipides, les protéines et diverses molécules présents dans les matrices sériques ou plasmatiques. Ces effets ont été évalués dans le plasma (**Chapitre V**).

Les effets de matrice sont potentiellement réduits grâce à l'utilisation d'un pool constitué de l'ensemble des échantillons biologiques analysés et utilisé comme référence. De cette évaluation, il ressort que dans les conditions analytiques proposées, l'effet de matrice est fortement réduit pour la majorité des polyphénols mais seulement partiellement pour quelques composés comme la quercétine, l'entérodol ou l'acide gallique.

Les méthodes développées pour la mesure de 38 polyphénols par quantification isotopique différentielle sont uniques. Jusqu'à présent, la majorité des développements méthodologiques ont été focalisés sur certaines classes ou sous classes de polyphénols quantifiés dans des études d'intervention <sup>457</sup> dans différentes matrices biologiques <sup>413, 454, 458</sup> chez l'homme ou l'animal <sup>410, 459</sup>. Les limites de quantification pour ces études d'intervention ne nécessitent pas toujours d'être basses sachant que ces méthodes sont développées afin d'étudier la pharmacocinétique de ces composés après absorption d'une quantité importante d'un aliment source ou d'un polyphénol isolé. D'autres méthodes ont été développées pour des études épidémiologiques mais avec un nombre restreint de composés <sup>420, 422, 435, 460</sup>. Des méthodes ont été proposées avec un nombre important de métabolites mais avec un nombre limité de standards internes pour leur dosage <sup>404, 418</sup>. Des volumes d'urines ou de plasma de 100 à 2000 µL sont fréquemment utilisés. Les 2 méthodes proposées dans cette thèse utilisent 50µL d'urine ou de plasma.

Dans le **Chapitre IV**, nous avons pu évaluer les concentrations urinaires de 38 polyphénols dans 4 pays Européens (France, Allemagne, Grèce et Italie). Il a été trouvé qu'un pourcentage important de sujets avaient des concentrations urinaires inférieures à la LOQ pour plusieurs métabolites dont l'isorhamnetine (55%), la phlorétine (52%), l'ester de l'acide gallique (52%), la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine (27%), l'hespérétine (26%) et l'apigénine (25%). Au-delà des LOQs toujours discutables, ces pourcentages sont le reflet des différences interindividuelles de consommation en polyphénols et de métabolisme. Avec 98% à 100% de valeurs inférieures à la LOQ, les procyanidines dimères B1 et B2 et la (+)-gallocatéchine, ont été exclues des analyses. Ces composés n'ont pas été non plus détectés, au moins pour les 2

premiers, dans le plasma (**Chapitre VI**). La biodisponibilité des procyanidines a été étudiée et un fort métabolisme est généralement montré, avec la présence de nombreux métabolites issus du microbiote comme les acides hydroxyphénylpropioniques, hydroxyphénylacétiques et hydroxybenzoïques<sup>126, 154</sup>. Néanmoins d'autres auteurs ont pu détecter la présence de dimer (et de trimer) chez le rat<sup>417, 461-464</sup>. Les LOQ de la méthode développée sont par ailleurs peut être insuffisantes pour rendre compte des valeurs attendues certainement très basses des procyanidines dimère B1 et B2.

On peut noter également des différences de concentrations très importantes entre polyphénols (**Chapitre IV**). Les acides phénoliques issus du métabolisme microbien sont de loin les plus représentés avec des niveaux d'excrétion urinaire variant de 5 à 157  $\mu\text{mol}$  par 24h. D'autres composés habituellement peu consommés dans l'alimentation comme la phlorétine, le resvératrol, les isoflavones ou les catéchines ont des niveaux d'excrétion urinaires inférieurs à 1  $\mu\text{mol}$  par 24h

La corrélation entre les différents polyphénols est le résultat de leur présence simultanée dans un même aliment avec la naringénine et l'hespérétine dans les agrumes ou encore la daidzéine et la génistéine dans le soja ou encore le tyrosol et l'hydroxytyrosol pour ce citer que ceux-ci. Une forte corrélation entre les métabolites microbiens et leurs précurseurs est également observée. Hormis ce qui est déjà discuté dans la publication, il est intéressant de noter que la corrélation entre la daidzéine et l'equol est faible. Celle-ci s'explique par le fait que seulement 25% à 30% de la population est capable de convertir la daidzéine en equol<sup>165</sup>. Au-delà des différences d'excrétion urinaire très variables selon les pays, et dépendant essentiellement des habitudes alimentaires, on peut également noter les bonnes corrélations observées entre l'excrétion des polyphénols et l'apport de leurs principales sources alimentaires qui soulignent la cohérence des résultats analytiques et indiquent l'utilité potentielle de ces composés phénoliques comme biomarqueurs de l'alimentation. En effet certains composés très caractéristiques de certains aliments donnent les corrélations les plus fortes, supérieures à 0.5, comme pour l'ester de l'acide gallique et le resvératrol et l'apport de vin rouge, l'acide caféique et le café ou encore la naringénine et hespérétine et les agrumes.

Des corrélations plus faibles de 0.3 à 0.45 sont observées pour l'acide gallique et le thé ou la phlorétine et les pommes. Des corrélations assez faibles sont obtenues pour les isoflavones et le soja ( $r=0.17$ ). Dans une récente revue, 162 études d'interventions ont été évaluées afin d'identifier de potentiels biomarqueurs de l'apport de nombreux polyphénols communément consommés<sup>465</sup>. La sensibilité d'un biomarqueur dépend de sa concentration urinaire et de la sensibilité de la méthode pour le mesurer. Un pourcentage d'excrétion urinaire faible limite la sensibilité d'un biomarqueur et accroît l'erreur de mesure, Dans cette étude, le pourcentage d'excrétion urinaire varie de 0.2% à 37%. Des corrélations supérieures à 0.7 ont été obtenues pour la daidzéine, la génistéine, l'acide isoférulique, le tyrosol, l'hydroxytyrosol, les lignanes, et les anthocyanes. Pour ces derniers, malgré une excrétion très faible (<0.2%) une excellente corrélation est obtenue et ces anthocyanes seraient de bons biomarqueurs pour peu que des méthodes de quantification sensible soient développées. Des corrélations plus faibles allant de 0.2 à 0.5 ont été obtenues pour des flavanones, flavan-3-ols et flavonols. Ces données montrent une certaine cohérence avec les résultats obtenus dans notre étude. Les corrélations basses obtenues pour les isoflavones et le soja s'expliquent certainement par une consommation faible de ces aliments. Malgré une excrétion importante de 30 à 40%



communément retrouvée, les concentrations urinaires plus faibles que dans des études d'intervention augmentent l'erreur de mesure<sup>465</sup>.

Enfin, dans le **chapitre VI** nous avons pu évaluer dans une étude cas-témoins nichée, les niveaux de polyphénols dans le plasma et leurs associations avec le risque de cancer du côlon. Au niveau descriptif, il est intéressant de noter que les corrélations entre polyphénols sont pour certaines d'entre elles similaires à celles trouvées dans l'étude transversale sur l'urine (Chapitre IV). Les corrélations les plus fortes ont été trouvées pour les acides 3,5-dihydroxybenzoïque et 3,5-dihydroxyphénylacétique ( $r=0,9$ ), la génistéine et la daidzéine ( $r=0,81$ ), l'hespéretine et la naringénine ( $r=0,76$ ) et la quercétine et le kaempférol ( $r=0,71$ ). Les corrélations entre les concentrations plasmatiques en polyphénols et les apports des aliments source sont faibles sauf pour le thé et la (+)-épigallocatechine ( $r=0,64$ ) et l'acide gallique ( $r=0,51$ ) et pour le café et les acides férulique et caféique ( $r=0,48$  et  $0,46$  respectivement).

Les analyses entre les concentrations plasmatiques en polyphénols et le risque de cancer du côlon ont montré que parmi les 35 polyphénols mesurés, 2 polyphénols étaient associés au risque. L'equol a été associé à une réduction de risque de cancer du côlon de 39% (OR [comparaison avec le 5<sup>ème</sup> quintile] =0.61, 95%CI=0.41 to 0.91,  $P_{\text{trend}}=0.003$ ) et l'acide homovanillique a été associé à une augmentation du risque de 72% (OR [comparaison avec le 5<sup>ème</sup> quintile] =1.72, 95%CI=1.17 to 2.53,  $P_{\text{trend}}<0.0001$ )).

L'association trouvée entre les concentrations plasmatiques d'equol et le risque de cancer du côlon soulève quelques questions. En complément de ce qui est discuté dans la publication, peu de données existent sur les isoflavones et le risque de cancer colorectal. Deux études d'Akhter et coll. ont montré certaines contradictions. Dans une étude prospective sur une population japonaise, aucune association n'a été trouvée entre l'apport en soja et isoflavones et le risque de cancer colorectal<sup>466</sup> alors que dans une étude cas-témoins, une association inverse non-linéaire a été trouvée entre l'apport en isoflavones et le risque de cancer colorectal<sup>322</sup>. Il a été également suggéré qu'un apport inférieur serait à même d'augmenter le risque. Cette donnée est peut-être à rapprocher de l'effet protecteur de l'equol observé dans notre étude vis-à-vis de l'absence d'association observée dans l'étude de Ward<sup>48</sup>. Nous avons émis l'hypothèse que les concentrations en equol obtenues dans notre étude (médiane de 0.4nM), bien qu'inférieures à celles trouvées dans les populations japonaises, étaient 10 fois plus importantes que l'étude de Ward (médiane 0.04nM). Un seuil protecteur est peut-être possible et cette hypothèse nécessite d'être vérifiée dans d'autres populations.

En complément de ce qui est discuté dans la publication sur l'expression des récepteurs aux œstrogènes  $\beta$  (ER- $\beta$ ) au niveau intestinal, il est montré que la génistéine qui a une affinité similaire à l'equol pour ces récepteurs, inhibe la prolifération et induit l'apoptose au niveau intestinal<sup>467</sup>. Cependant l'equol induit une transcription bien plus importante que n'importe quelles autres isoflavones<sup>164, 468</sup>.

Cependant, comme discuté également, l'equol pourrait également être un marqueur du microbiote, et les espèces bactériennes associées à ce métabolite pourrait avoir un effet protecteur sur la cancérogénèse colorectal. Les études sur le microbiote sont très nombreuses depuis 10 ans<sup>469-470</sup> et même si certaines données indiquent que le cancer colorectal se développerait suite à la perturbation de la composition de la flore microbienne colique,

induite par les composés associés à l'alimentation, il est encore difficile de définir le rôle d'une flore bactérienne particulière comme celles impliquées dans la conversion de la daidzéine en equol.

Concernant l'acide homovanillique, peu de données existent sur les effets biologiques de ce métabolite. Au-delà de ce qui a été décrit dans la publication (Chapitre VI), il est assez surprenant de voir ce métabolite associé positivement avec le risque de cancer du côlon. Initialement, les métabolites constituant le lot des polyphénols mesurés par notre méthode avaient été sélectionnés pour certains d'entre eux, sur la base de leur formation par le microbiote à partir des polyphénols non absorbés au niveau duodénal et d'un rôle suppose protecteur contre diverses pathologies. Cependant les acides phénylpropioniques et phénylacétiques ne proviennent pas uniquement des polyphénols<sup>471-472</sup>. L'acide homovanillique est également un produit du catabolisme de la dopamine et d'autres métabolites endogènes. Une étude très intéressante évoque un rôle ambiguë de l'acide homovanillique et lui attribue des faux positifs lors des screening de tumeurs sécrétrice de catécholamines<sup>473</sup>. La recommandation serait d'éviter une alimentation riche en flavonols afin d'éviter des résultats faussement positifs. Il est néanmoins important de noter que ces tests sont urinaires et dans un but de dépistage de certaines tumeurs. Pour les études épidémiologiques de cohortes, les sujets sont théoriquement sains et dépourvus de tumeurs au moment du recrutement. Néanmoins, ces nouvelles données ouvrent des perspectives intéressantes avec notamment celle de définir le rôle de tous ces métabolites microbiens dans la carcinogénèse colorectale.

## Conclusion et perspectives

Une sélection de 38 polyphénols représentatifs de la plupart des classes et sous classes trouvées dans l'alimentation a été proposée pour ces développements méthodologiques. Au-delà des nombreuses études *in vitro* et *in vivo* qui soulignent pour certains polyphénols, un possible rôle dans la prévention de diverses maladies chroniques comme le cancer, la méthode nouvellement développée pourra être appliquée dans de futures études épidémiologiques pour étudier les associations en divers polyphénols et le risque de pathologies. Comme déjà évoqué, ces nouveaux outils devraient permettre la découverte de nouvelles associations comme celles décrites dans le chapitre VI.

Cependant, vu la diversité des polyphénols issus de l'alimentation et en considérant les observations faites dans cette thèse, plusieurs éléments méritent d'être soulignés. Certains des polyphénols mesurés montrent de fortes corrélations entre eux. Même si des effets synergiques sont toujours possibles, le nombre des polyphénols mesurés pourrait être en partie réduit. D'autres polyphénols pourraient par contre être ajoutés à l'éventail des composés mesurés. Nous n'avons pu par exemple mesurer l'exposition aux anthocyanes, qui sont par leur structure chimique et instabilité plus difficiles à quantifier, surtout dans un contexte multi-résidus. L'acide syringique, métabolite microbien de la malvidine, l'une des principales anthocyanes consommées, pourrait être intéressant à mesurer. Ce composé devrait

être facilement quantifiable de par sa structure et a été proposé comme potentiellement responsable de l'effet bénéfique des anthocyanines sur l'inhibition de formation des ACF.

Les résultats obtenus sur le cancer du côlon devront être répliqués dans d'autres études. Un projet est en préparation dans une cohorte japonaise ou de plus fortes concentrations en equol sont attendues. Par ailleurs, une étude sur les polyphénols et le cancer de la thyroïde dans la cohorte EPIC est également programmée. Il sera également important pour l'interprétation des données obtenues de connaître la variabilité intra-individuelle des teneurs plasmatiques des polyphénols mesurés. Ceci pourrait expliquer peut être certains résultats négatifs observés dans la présente étude prospective sur le cancer colorectal.

Par ailleurs, les matrices biologiques utilisées classiquement dans les grandes études de cohortes restent le plasma ou sérum et dans une moindre mesure l'urine. Vu l'intérêt grandissant pour le microbiote, l'analyse de selles se focalise essentiellement par une analyse de flore bactérienne et éventuellement des métabolites associées. Cependant il est assez délicat de prétendre que les métabolites retrouvés sont représentatifs de ceux générés par la flore microbienne sur toute la longueur du côlon. Néanmoins, Il semble assez pertinent, il me semble, de changer de matrice biologique. En effet, les métabolites, quels qu'ils soient, circulent au niveau des capillaires, veines ou artères en présence des différents lymphocytes et surtout des hématies. Même si le plasma ou le sérum, après élimination des lignées cellulaires sanguines, restent pour des raisons analytiques et biologiques une solution préférentielle, il n'est pas certain que ces matrices soient représentatives des métabolites circulants, au moins pour certaines classes de molécules. Les interactions des polyphénols avec les membranes cellulaires, et protéines ont été bien étudiées, comme discuté dans le chapitre II-4. La liaison du resveratrol et de la quercétine a été évaluée et il a été montré que 50% et 75% de la quercétine et du resveratrol, respectivement, étaient liés aux hématies <sup>474</sup>. Fiorani et coll., ont également montré que la quercétine était fortement concentrée au niveau des hématies <sup>475-476</sup> mais également dans d'autres types cellulaires au niveau mitochondrial <sup>477</sup>. Au-delà de l'activité local induite par ces polyphénols, il est également montré que ceux-ci pouvaient dans certaines situations être libérés et avoir une action extracellulaire. En effet, Il a été suggéré que des phases de déconjugaison local au niveau tissulaire (pour le glucuronide mais pas le sulfate) <sup>478</sup> et au niveau cellulaire <sup>479</sup> seraient la clef de l'activité biologique des flavonoïdes et constitueraient le paradoxe des flavonoïdes. Les métabolites retrouvés au niveau plasmatique ne sont au final qu'une image partielle de ce qui coexistent aux niveaux cellulaires (hématies) et qui est vraisemblablement en équilibre. Le sang total, et non pas une fraction de celui-ci représenté par le plasma, irrigue les tissus et cellules. Dans ce contexte et même si depuis des décennies, la matrice majeure utilisée était sérique ou plasmatique, et pouvait à elle seule rendre compte d'un état de santé il semble judicieux aujourd'hui, en recherche, de se focaliser sur une image plus complète de ce tissu.

La méthode de marquage isotopique différentiel développée dans la cadre de cette thèse a été appliquée pour la première fois dans une étude épidémiologique. Nous nous sommes focalisés sur les polyphénols alimentaires pour leur rôle présumé dans la prévention du cancer. La dérivatisation par le chlorure de dansyle a été sélectionnée pour marquer ces

composés phénoliques. Des méthodes similaires avec d'autres agents de dérivatisation pourront également être utilisées à l'avenir pour le dosage d'autres composés d'intérêt comme les acides carboxyliques ou les cétones. Les composés devront être sélectionnés en fonction de leur pertinence biologique. Dans le cas du cancer colorectal, les acides biliaires et les acides à chaîne courte comme l'acide butyrique seraient potentiellement de bons candidats en raison de leur implication possible dans ce cancer. De futures études épidémiologiques similaires à celle effectuée dans le cadre de cette thèse pourront alors être conduites pour étudier les associations entre ces autres composés et le risque de cancer colorectal.

## Références Bibliographiques

1. Zhang, Z. M.; Yang, X. Y.; Yuan, J. H.; Sun, Z. Y.; Li, Y. Q., Modulation of NRF2 and UGT1A expression by epigallocatechin-3-gallate in colon cancer cells and BALB/c mice. *Chin. Med. J.* **2009**, *122* (14), 1660-1665.
2. Aires, V.; Limagne, E.; Cotte, A. K.; Latruffe, N.; Ghiringhelli, F.; Delmas, D., Resveratrol metabolites inhibit human metastatic colon cancer cells progression and synergize with chemotherapeutic drugs to induce cell death. *Mol Nutr Food Res* **2013**, *57* (7), 1170-81.
3. Luo, Y.; Wang, S.-x.; Zhou, Z.-q.; Wang, Z.; Zhang, Y.-g.; Zhang, Y.; Zhao, P., Apoptotic effect of genistein on human colon cancer cells via inhibiting the nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway. *Tumor Biology* **2014**, *35* (11), 11483-11488.
4. Zamora-Ros, R.; Barupal, D. K.; Rothwell, J. A.; Jenab, M.; Fedirko, V.; Romieu, I.; Aleksandrova, K.; Overvad, K.; Kyro, C.; Tjonneland, A.; Affret, A.; His, M.; Boutron-Ruault, M. C.; Katzke, V.; Kuhn, T.; Boeing, H.; Trichopoulou, A.; Naska, A.; Kritikou, M.; Saieva, C.; Agnoli, C.; Santucci de Magistris, M.; Tumino, R.; Fasanelli, F.; Weiderpass, E.; Skeie, G.; Merino, S.; Jakszyn, P.; Sanchez, M. J.; Dorronsoro, M.; Navarro, C.; Ardanaz, E.; Sonestedt, E.; Ericson, U.; Maria Nilsson, L.; Boden, S.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Peeters, P. H.; Perez-Cornago, A.; Wareham, N. J.; Khaw, K. T.; Freisling, H.; Cross, A. J.; Riboli, E.; Scalbert, A., Dietary flavonoid intake and colorectal cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) cohort. *Int J Cancer* **2017**, *140* (8), 1836-1844.
5. Zamora-Ros, R.; Not, C.; Guino, E.; Lujan-Barroso, L.; Garcia, R. M.; Biondo, S.; Salazar, R.; Moreno, V., Association between habitual dietary flavonoid and lignan intake and colorectal cancer in a Spanish case-control study (the Bellvitge Colorectal Cancer Study). *Cancer Causes Control* **2013**, *24* (3), 549-57.
6. Nimptsch, K.; Zhang, X.; Cassidy, A.; Song, M.; O'Reilly, E. J.; Lin, J. H.; Pischon, T.; Rimm, E. B.; Willett, W. C.; Fuchs, C. S.; Ogino, S.; Chan, A. T.; Giovannucci, E. L.; Wu, K., Habitual intake of flavonoid subclasses and risk of colorectal cancer in 2 large prospective cohorts. *Am J Clin Nutr* **2016**, *103* (1), 184-91.
7. Fraga, C. G.; Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I., Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* **2010**, *31* (6), 435-45.
8. Mamy, L.; Patureau, D.; Barriuso, E.; Bedos, C.; Bessac, F.; Louchart, X.; Martin-Laurent, F.; Miege, C.; Benoit, P., Prediction of the Fate of Organic Compounds in the Environment From Their Molecular Properties: A Review. *Crit Rev Environ Sci Technol* **2015**, *45* (12), 1277-1377.
9. Wild, C. P., Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2005**, *14* (8), 1847-50.
10. Zhang, K.; Civan, J.; Mukherjee, S.; Patel, F.; Yang, H., Genetic variations in colorectal cancer risk and clinical outcome. *World J Gastroenterol* **2014**, *20* (15), 4167-77.
11. Simonds, N. I.; Ghazarian, A. A.; Pimentel, C. B.; Schully, S. D.; Ellison, G. L.; Gillanders, E. M.; Mechanic, L. E., Review of the Gene-Environment Interaction Literature in Cancer: What Do We Know? *Genet Epidemiol* **2016**, *40* (5), 356-65.
12. Dehghan, A., Mass spectrometry in epidemiological studies: What are the key considerations? *Eur J Epidemiol* **2016**, *31* (8), 715-6.
13. Chang, H.; Wan, Y.; Naile, J.; Zhang, X.; Wiseman, S.; Hecker, M.; Lam, M. H.; Giesy, J. P.; Jones, P. D., Simultaneous quantification of multiple classes of phenolic compounds in blood plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2010**, *1217* (4), 506-13.
14. Tai, S. S. C.; Welch, M. J., Development and Evaluation of a Reference Measurement Procedure for the Determination of Estradiol-17 $\beta$  in Human Serum Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem. *Anal Chem* **2005**, *77*, 6359-6363.

15. Luzardo, O. P.; Almeida-Gonzalez, M.; Ruiz-Suarez, N.; Zumbado, M.; Henriquez-Hernandez, L. A.; Meilan, M. J.; Camacho, M.; Boada, L. D., Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC-MS/MS and LC-ESI/MS/MS and its application in two poisoning cases. *Sci Justice* **2015**, *55* (5), 307-15.
16. FDA *Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry* - Downloaded from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>; 2001; p 22.
17. FDA, *Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry* - Downloaded from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm368107.pdf>. **2013**.
18. FDA, *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics - Guidance for Industry* -Downloaded from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm368366.pdf>. **2015**.
19. Bansal, S.; DeStefano, A., Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. *AAPS J.* **2007**, *9* (1), E109-14.
20. Hajšlová, J.; Zrostlíková, J., Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000* (1), 181-197.
21. Panuwet, P.; Hunter, R. E., Jr.; D'Souza, P. E.; Chen, X.; Radford, S. A.; Cohen, J. R.; Marder, M. E.; Kartavenka, K.; Ryan, P. B.; Barr, D. B., Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Crit Rev Anal Chem* **2016**, *46* (2), 93-105.
22. Scarth, J.; Clarke, A.; Hands, J.; Teale, P.; Macarthur, R.; Kay, J., Validation of a Quantitative Multi-Residue Urinary Assay for the Detection of Androgen, Oestrogen and Progestagen Abuse in the Bovine. *Chromatographia* **2009**, *71* (3-4), 241-252.
23. Santa, T., Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* **2011**, *25* (1-2), 1-10.
24. Cai, H. L.; Zhu, R. H.; Li, H. D., Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **2010**, *396* (1), 103-111.
25. Xu, X.; Roman, J. M.; Issaq, H. J.; Keefer, L. K.; Veenstra, T. D.; Ziegler, R. G., Quantitative Measurement of Endogenous Estrogens and Estrogen Metabolites in Human Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2007**, *79*, 7813-7821.
26. You, J.; Ding, C.; Zhu, F.; Sun, X.; Li, Y.; Suo, Y., Mass Spectrometric Identification of Multihydroxy Phenolic Compounds in Tibetan Herbal Medicines. *Chromatographia* **2007**, *65* (9-10), 545-553.
27. Guo, K.; Li, L., Differential <sup>12</sup>C-<sup>13</sup>C-Isotope Dansylation Labeling and Fast Liquid ChromatographyMass Spectrometry for Absolute and Relative Quantification of the Metabolome. *Anal Chem* **2009**, *81*, 3919–3932.
28. Guo, K.; Ji, C.; Li, L., Stable-Isotope Dimethylation Labeling Combined with LC-ESI MS for Quantification of Amine-Containing Metabolites in Biological Samples. *Anal Chem* **2007**, *79*, 8631-8638.
29. Leitner, A.; Lindner, W., Chemistry meets proteomics: the use of chemical tagging reactions for MS-based proteomics. *Proteomics* **2006**, *6* (20), 5418-34.
30. Calderon-Celis, F.; Encinar, J. R.; Sanz-Medel, A., Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **2017**.
31. Guo, K.; Li, L., High-Performance Isotope Labeling for Profiling Carboxylic Acid-Containing Metabolites in Biofluids by Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2010**, *82*, 8789-8793.
32. Fukusaki, E.; Harada, K.; Bamba, T.; Kobayashi, A., An isotope effect on the comparative quantification of flavonoids by means of methylation-based stable isotope dilution coupled with capillary liquid chromatography/mass spectrometry. *J Biosci Bioeng* **2005**, *99* (1), 75-7.
33. Santa, T.; Al-Dirbashi, O. Y.; Fukushima, T., Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for biomedical analysis. *Drug Discov Ther* **2007**, *1* (2), 108-118.

34. Chen, D.; Han, W.; Su, X.; Li, L.; Li, L., Overcoming Sample Matrix Effect in Quantitative Blood Metabolomics Using Chemical Isotope Labeling Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2017**, *89* (17), 9424-9431.
35. Zhao, S.; Luo, X.; Li, L., Chemical Isotope Labeling LC-MS for High Coverage and Quantitative Profiling of the Hydroxyl Submetabolome in Metabolomics. *Anal Chem* **2016**, *88* (21), 10617-10623.
36. Zhao, S.; Dawe, M.; Guo, K.; Li, L., Development of High-Performance Chemical Isotope Labeling LC-MS for Profiling the Carbonyl Submetabolome. *Anal Chem* **2017**, *89* (12), 6758-6765.
37. Dai, W.; Huang, Q.; Yin, P.; Li, J.; Zhou, J.; Kong, H.; Zhao, C.; Lu, X.; Xu, G., Comprehensive and highly sensitive urinary steroid hormone profiling method based on stable isotope-labeling liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* **2012**, *84* (23), 10245-51.
38. Goszcz, K.; Duthie, G. G.; Stewart, D.; Leslie, S. J.; Megson, I. L., Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response? *Br J Pharmacol* **2017**, *174* (11), 1209-1225.
39. Umeno, A.; Horie, M.; Murotomi, K.; Nakajima, Y.; Yoshida, Y., Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones. *Molecules* **2016**, *21* (6).
40. Kang, N. J.; Shin, S. H.; Lee, H. J.; Lee, K. W., Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol Ther* **2011**, *130* (3), 310-24.
41. Maru, G. B.; Hudlikar, R. R.; Kumar, G.; Gandhi, K.; Mahimkar, M. B., Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: From experimental models to clinical trials. *World J Biol Chem* **2016**, *7* (1), 88-99.
42. Romagnolo, D. F.; Selmin, O. I., Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *J Nutr Gerontol Geriatr* **2012**, *31* (3), 206-38.
43. Woo, H. D.; Kim, J., Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **2013**, *19* (7), 1011-9.
44. Zamora-Ros, R.; Touillaud, M.; Rothwell, J. A.; Romieu, I.; Scalbert, A., Measuring exposure to the polyphenol metabolome in observational epidemiologic studies: current tools and applications and their limits. *Am J Clin Nutr* **2014**, *100* (1), 11-26.
45. Neveu, V.; Perez-Jimenez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D.; Scalbert, A., Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)* **2010**, *2010*, bap024.
46. Bhagwat, S.; Haytowitz, D. B., USDA's Flavonoid Database for the assessment of Dietary Intakes. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/flav>. **2014**.
47. Williamson, G.; Clifford, M. N., Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochem Pharmacol* **2017**.
48. Ward, H.; Chapelais, G.; Kuhnle, G. G.; Luben, R.; Khaw, K. T.; Bingham, S., Lack of prospective associations between plasma and urinary phytoestrogens and risk of prostate or colorectal cancer in the European Prospective into Cancer-Norfolk study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2008**, *17* (10), 2891-4.
49. Kuijsten, A.; Hollman, P. C.; Boshuizen, H. C.; Buijsman, M. N.; van 't Veer, P.; Kok, F. J.; Arts, I. C.; Bueno-de-Mesquita, H. B., Plasma enterolignan concentrations and colorectal cancer risk in a nested case-control study. *Am J Epidemiol* **2008**, *167* (6), 734-42.
50. Doll, R.; Peto, R., The causes of Cancer - Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the united states today. *J. Natl. Cancer Inst.* **1981**, *66* (6), 1191-&.
51. Lee, D. H.; Keum, N.; Giovannucci, E. L., Colorectal Cancer Epidemiology in the Nurses' Health Study. *Am J Public Health* **2016**, *106* (9), 1599-607.
52. Samanta, A.; Das, G.; Das, S. K., roles of flavonoids in plants. *Int J Pharm Sci Tech* **2011**, *6*, 12-35.
53. Hassan, S.; Mathesius, U., The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J Exp Bot* **2012**, *63* (9), 3429-44.

54. Lattanzio, V.; Lattanzio, V. M. T.; Cardinali, A., Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research* **2006**, 23-67.
55. Batra, P.; Sharma, A. K., Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech* **2013**, 3 (6), 439-459.
56. Tsao, R., Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2010**, 2 (12), 1231-46.
57. Vogt, T., Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* **2010**, 3 (1), 2-20.
58. Hermann, K.; Weaver, L. M., The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **1999**, 50, 472-503.
59. Petrusa, E.; Braidot, E.; Zancani, M.; Peresson, C.; Bertolini, A.; Patui, S.; Vianello, A., Plant flavonoids--biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *Int J Mol Sci* **2013**, 14 (7), 14950-73.
60. Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N., Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* **2009**, 26 (8), 1001-43.
61. Falcone Ferreyra, M. L.; Rius, S. P.; Casati, P., Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* **2012**, 3, 222.
62. Li, C.; Leverage, R.; Trombley, J. D.; Xu, S.; Yang, J.; Tian, Y.; Reed, J. D.; Hagerman, A. E., High Molecular Weight Persimmon (*Diospyros kaki* L.) Proanthocyanidin: A Highly Galloylated, A-Linked Tannin with an Unusual Flavonol Terminal Unit, Myricetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58 (16), 9033-9042.
63. Proestos, C.; Komaitis, M., Analysis of Naturally Occurring Phenolic Compounds in Aromatic Plants by RP-HPLC Coupled to Diode Array Detector (DAD) and GC-MS after Silylation. *Foods* **2013**, 2 (1), 90-99.
64. Pietro Buzzini; Panagiotis Arapitsas; Marta Goretti; Eva Branda; Benedetta Turchetti; Patrizia Pinelli; F Ieri; Annalisa Romani, Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2008**, 8, 1179-1187.
65. Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N., Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **2009**, 26 (8), 1001-1043.
66. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J. P. E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A., Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* **2013**, 18 (14), 1818-1892.
67. Perez-Jimenez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A., Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: An application of the Phenol-Explorer database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58 (8), 4959-4969.
68. Perez-Jimenez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Cruz, J.; Eisner, R.; Knox, C.; Wishart, D.; Touvier, M.; Feuzeu, L.; Galan, P.; Scalbert, A. In *A systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages - An application of the Phenol-Explorer database*, 25th International Conference on Polyphenols, Montpellier, August 23-27; Montpellier, 2010.
69. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **2004**, 79 (5), 727-47.
70. Bolca, S., Bioavailability of Soy-Derived Isoflavones and Human Breast Cancer - Chapter 93. In *Polyphenols in Human Health and Disease*, Academic Press: San Diego, 2014; pp 1241-1256.
71. Genovese, M. I.; Barbosa, A. C.; Pinto Mda, S.; Lajolo, F. M., Commercial soy protein ingredients as isoflavone sources for functional foods. *Plant Foods Hum Nutr* **2007**, 62 (2), 53-8.
72. Milder, I. E. J.; Arts, I. C. W.; Putte, B. v. d.; Venema, D. P.; Hollman, P. C. H., Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition* **2007**, 93 (03), 393.
73. de la Torre-Robles, A.; Rivas, A.; Lorenzo-Tovar, M. L.; Monteagudo, C.; Mariscal-Arcas, M.; Olea-Serrano, F., Estimation of the intake of phenol compounds from virgin olive oil of a population



- from southern Spain. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2014**, *31* (9), 1460-9.
74. Ivey, K. L.; Croft, K.; Prince, R. L.; Hodgson, J. M., Comparison of flavonoid intake assessment methods. *Food Funct* **2016**, *7* (9), 3748-59.
75. Santos-Buelga, C.; Williamson, G., *Methods in Polyphenol Analysis Royal Society of Chemistry, Cambridge* **2003**.
76. Ajila, C. M.; Brar, S. K.; Verma, M.; Tyagi, R. D.; Godbout, S.; Valero, J. R., Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology* **2011**, *31* (3), 227-249.
77. Perez-Jimenez, J.; Diaz-Rubio, M. E.; Saura-Calixto, F., Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutr Res Rev* **2013**, *26* (2), 118-29.
78. Anna Vallverdu-Queralt; Emmanuelle Meudec; Nicolas Sommerer; Cheynier, V., The Hidden Face of Wine Polyphenol Polymerization Highlighted by High-Resolution Mass Spectrometry. *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 336-339.
79. Pinto, P.; Santos, C. N., Worldwide (poly)phenol intake: assessment methods and identified gaps. *Eur J Nutr* **2017**, *56* (4), 1393-1408.
80. Ock Kyong Chun; Sang Jin Chung; Song, W. O., Estimated Dietary Flavonoid Intake and Major Food Sources of U.S. Adults. *The Journal of Nutrition* **2007**, *137*, 1244-1252.
81. Johannot, L.; Somerset, S. M., Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutrition* **2006**, *9* (8), 1045-1054.
82. Ovaskainen, M.-L.; Torronen, R.; Koponen, J. M.; Sinkko, H.; Hellstrom, J.; Reinivuo, H.; Mattila, P., Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults. *J. Nutr.* **2008**, *138* (3), 562-566.
83. Perez-Jimenez, J.; Fezeu, L.; Touvier, M.; Arnault, N.; Manach, C.; Hercberg, S.; Galan, P.; Scalbert, A., Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *American Journal of Clinical Nutrition* **2011**, *93*, 1220-1228.
84. Tarascou, I.; Souquet, J. M.; Mazauric, J. P.; Carrillo, S.; Coq, S.; Canon, F.; Fulcrand, H.; Cheynier, V., The hidden face of food phenolic composition. *Arch Biochem Biophys* **2010**, *501* (1), 16-22.
85. Liwei Gu, M. A. K., John F. Hammerstone, Gary Beecher, Joanne Holden, David Haytowitz, S. G., and Ronald L. Prior, Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *the Journal of Nutrition* **2004**.
86. Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Goni, I., Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry* **2007**, *101* (2), 492-501.
87. Messina, M., A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. *J Nutr* **2010**, *140* (7), 1350S-4S.
88. Fukushima, Y.; Ohie, T.; Yonekawa, Y.; Yonemoto, K.; Aizawa, H.; Mori, Y.; Watanabe, M.; Takeuchi, M.; Hasegawa, M.; Taguchi, C.; Kondo, K., Coffee and Green Tea As a Large Source of Antioxidant Polyphenols in the Japanese Population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (4), 1253-1259.
89. Fukushima, Y.; Tashiro, T.; Kumagai, A.; Ohyanagi, H.; Horiuchi, T.; Takizawa, K.; Sugihara, N.; Kishimoto, Y.; Taguchi, C.; Tani, M.; Kondo, K., Coffee and beverages are the major contributors to polyphenol consumption from food and beverages in Japanese middle-aged women. *J Nutr Sci* **2014**, *3*, e48.
90. Taguchi, C.; Fukushima, Y.; Kishimoto, Y.; Suzuki-Sugihara, N.; Saita, E.; Takahashi, Y.; Kondo, K., Estimated Dietary Polyphenol Intake and Major Food and Beverage Sources among Elderly Japanese. *Nutrients* **2015**, *7* (12), 10269-81.
91. Zamora-Ros, R.; Knaze, V.; Rothwell, J.; Hémon, B.; Moskal, A.; Overvad, K.; Tjønneland, A.; Kyrø, C.; Fagherazzi, G.; Boutron-Ruault, M.-C.; Touillaud, M.; Katzke, V.; Kühn, T.; Boeing, H.; Förster, J.; Trichopoulou, A.; Valanou, E.; Peppas, E.; Palli, D.; Agnoli, C.; Ricceri, F.; Tumino, R.; de Magistris, M.; Peeters, P. M.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Engeset, D.; Skeie, G.; Hjartåker, A.; Menéndez, V.; Agudo, A.; Molina-Montes, E.; Huerta, J.; Barricarte, A.; Amiano, P.; Sonestedt, E.;

- Nilsson, L.; Landberg, R.; Key, T.; Khaw, K.-T.; Wareham, N.; Lu, Y.; Slimani, N.; Romieu, I.; Riboli, E.; Scalbert, A., Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European Journal of Nutrition* **2015**, Epub ahead of print.
92. Scalbert, A.; Morand, C.; Manach, C.; Rémésy, C., Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* **2002**, *56*, 276-282.
93. Actis-Goretta, L.; Leveques, A.; Rein, M.; Teml, A.; Schafer, C.; Hofmann, U.; Li, H.; Schwab, M.; Eichelbaum, M.; Williamson, G., Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (-)-epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique. *Am J Clin Nutr* **2013**, *98* (4), 924-33.
94. Farrell, T. L.; Poquet, L.; Dew, T. P.; Barber, S.; Williamson, G., Predicting phenolic acid absorption in Caco-2 cells: a theoretical permeability model and mechanistic study. *Drug Metab Dispos* **2012**, *40* (2), 397-406.
95. Wu, B.; Kulkarni, K.; Basu, S.; Zhang, S.; Hu, M., First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci* **2011**, *100* (9), 3655-81.
96. Mullen, W.; Edwards, C. A.; Crozier, A., Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *British Journal of Nutrition* **2007**, *96* (01), 107.
97. Kanaze, F. I.; Bounartzi, M. I.; Georgarakis, M.; Niopas, I., Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur J Clin Nutr* **2007**, *61* (4), 472-7.
98. Gardana, C.; Guarnieri, S.; Riso, P.; Simonetti, P.; Porrini, M., Flavanone plasma pharmacokinetics from blood orange juice in human subjects. *Br J Nutr* **2007**, *98* (1), 165-72.
99. Wen, X.; Walle, T., Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metab Dispos* **2006**, *34* (10), 1786-92.
100. Silberberg, M.; Morand, C.; Mathevon, T.; Besson, C.; Manach, C.; Scalbert, A.; Remesy, C., The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *European Journal of Nutrition* **2006**, *45* (2), 88-96.
101. Yang, C. S.; Lee, M. J.; Chen, L., Human Salivary Tea Catechin Levels and Catechin Esterase Activities. *cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **1999**, *8*, 83-89.
102. Ludwig, I. A.; Mena, P.; Calani, L.; Borges, G.; Pereira-Caro, G.; Bresciani, L.; Del Rio, D.; Lean, M. E.; Crozier, A., New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins. *Free Radic Biol Med* **2015**, *89*, 758-69.
103. Woodward, G.; Kroon, P.; Cassidy, A.; Kay, C., Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. *J Agric Food Chem* **2009**, *57* (12), 5271-8.
104. Hollman, P. C.; Bijlsman, M. N.; Van Gameren, Y.; Cnossen, E. P.; de Vries, J. H.; Katan, M. B., The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Rad. Res.* **1999**, *31*, 569-573.
105. Prasain, J. K.; Barnes, S., Metabolism and Bioavailability of Flavonoids in Chemoprevention: Current Analytical Strategies and Future Prospectus. *MOLECULAR PHARMACEUTICS* **2007**, *4*, 846-864.
106. Walle, T., Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* **2004**, *36* (7), 829-37.
107. Day, A. J.; Canada, J. R.; Diaz, J. C.; Kroon, P. A.; Mclauchlan, R.; Faulds, C. B.; Plumb, G. W.; Morgan, M. R. A.; Williamson, G., Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* **2000**, *468*, 166-170.
108. Day, A. J.; Gee, J. M.; DuPont, M. S.; Johnson, I. T.; Williamson, G., Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology* **2003**, *65* (7), 1199-1206.

109. Nemeth, K.; Plumb, G. W.; Berrin, J. G.; Juge, N.; Jacob, R.; Naim, H. Y.; Williamson, G.; Swallow, D. M.; Kroon, P. A., Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* **2003**, *42* (1), 29-42.
110. Walgren, R. A.; Lin, J. T.; Kinne, R. K.; Walle, T., Cellular Uptake of Dietary Flavonoid Quercetin 4'-beta-Glucoside by Sodium-Dependent Glucose Transporter SGLT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **2000**, *294*, 837-843.
111. Gee, J. M.; Dupont, M. S.; Day, A. J.; Plumb, G. W.; Williamson, G.; Johnson, I. T., Intestinal Transport of Quercetin Glycosides in Rats Involves Both Deglycosylation and Interaction with the Hexose Transport Pathway. *J Nutr* **2000**, *130*, 2765-71.
112. Day, A. J.; Dupont, M. S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes, M. J. C.; Morgan, M. R. A.; Williamson, G., Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. *FEBS Lett* **1998**, *436*, 71-75.
113. Ioku, K.; Pongpiriyadacha, Y.; Konishi, Y.; Takei, Y.; Nakatani, N.; Terao, J.,  $\beta$ -Glucosidase Activity in the Rat Small Intestine toward Quercetin Monoglucosides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1998**, *62* (7), 1428-1431.
114. Wu, B.; Basu, S.; Meng, S.; Wang, X.; Hu, M., Regioselective sulfation and glucuronidation of phenolics: insights into the structural basis. *Curr Drug Metab* **2011**, *12* (9), 900-016.
115. Zhang, L.; Zuo, Z.; Lin, G., Intestinal and Hepatic Glucuronidation of Flavonoids. *Molecular Pharmaceutics* **2007**, *4* (6), 833-845.
116. Ohno, S.; Nakajin, S., Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos* **2009**, *37* (1), 32-40.
117. Liu, X.; Tam, V. H.; Hu, M., Disposition of Flavonoids via Enteric Recycling Determination of the UDP-Glucuronosyltransferase Isoforms Responsible for the Metabolism of Flavonoids in Intact Caco-2 TC7 Cells Using siRNA. *Molecular Pharmaceutics* **2007**, *4* (6), 873-882.
118. Barrington, R.; Williamson, G.; Bennett, R. N.; Davis, B. D.; Brodbelt, J. S.; Kroon, P. A., Absorption, Conjugation and Efflux of the Flavonoids, Kaempferol and Galangin, Using the Intestinal CACO-2/TC7 Cell Model. *J Funct Foods* **2009**, *1* (1), 74-87.
119. Teubner, W.; Meinel, W.; Florian, S.; Kretzschmar, M.; Glatt, H., Identification and localization of soluble sulfotransferases in the human gastrointestinal tract. *Biochem J* **2007**, *404* (2), 207-15.
120. Riches, Z.; Stanley, E. L.; Bloomer, J. C.; Coughtrie, M. W., Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT "pie". *Drug Metab Dispos* **2009**, *37* (11), 2255-61.
121. Kuhnle, G.; Spencer, J. P.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Debnam, E. S.; Srai, S. K.; Rice-Evans, C.; Hahn, U., Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *277* (2), 507-12.
122. Brand, W.; Boersma, M. G.; Bik, H.; Hoek-van den Hil, E. F.; Vervoort, J.; Barron, D.; Meinel, W.; Glatt, H.; Williamson, G.; van Bladeren, P. J.; Rietjens, I. M., Phase II metabolism of hesperetin by individual UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases and rat and human tissue samples. *Drug Metab Dispos* **2010**, *38* (4), 617-25.
123. Shelby, M. K.; Cherrington, N. J.; Vansell, N. R.; Klaassen, C. D., Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Drug Metab Dispos* **2003**, *31*, 326-333.
124. Nakano, H.; Ogura, K.; Takahashi, E.; Harada, T.; Nishiyama, T.; Muro, K.; Hiratsuka, A.; Kadota, S.; Watabe, T., Regioselective Monosulfation and Disulfation of the Phytoestrogens Daidzein and Genistein by Human Liver Sulfotransferases. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2004**, *19* (3), 216-226.
125. O'Leary, K. A.; Day, A. J.; Needs, P. W.; Mellon, F. A.; O'Brien, N. M.; Williamson, G., Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model the role of human betaglucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein-2 (MRP2) in flavonoids metabolism. *Biochemical Pharmacology* **2003**, *65*, 479-491.

126. Monagas, M.; Urpi-Sarda, M.; Sanchez-Patan, F.; Llorach, R.; Garrido, I.; Gomez-Cordoves, C.; Andres-Lacueva, C.; Bartolome, B., Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct* **2010**, *1* (3), 233-53.
127. Xia, B.; Zhou, Q.; Zheng, Z.; Ye, L.; Hu, M.; Liu, Z., A novel local recycling mechanism that enhances enteric bioavailability of flavonoids and prolongs their residence time in the gut. *Mol Pharm* **2012**, *9* (11), 3246-58.
128. Liu, Z.; Hu, M., Natural polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2007**, *3* (3), 389-406.
129. Alvarez, A. I.; Real, R.; Perez, M.; Mendoza, G.; Prieto, J. G.; Merino, G., Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J Pharm Sci* **2010**, *99* (2), 598-617.
130. Brand, W.; van der Wel, P. A.; Rein, M. J.; Barron, D.; Williamson, G.; van Bladeren, P. J.; Rietjens, I. M., Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metab Dispos* **2008**, *36* (9), 1794-802.
131. Jaganath, I. B.; Mullen, W.; Edwards, C. A.; Crozier, A., The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radic Res* **2006**, *40* (10), 1035-46.
132. Kamiloglu, S.; Capanoglu, E.; Grootaert, C.; Van Camp, J., Anthocyanin Absorption and Metabolism by Human Intestinal Caco-2 Cells--A Review. *Int J Mol Sci* **2015**, *16* (9), 21555-74.
133. Czank, C.; Cassidy, A.; Zhang, Q.; Morrison, D. J.; Preston, T.; Kroon, P. A.; Botting, N. P.; Kay, C. D., Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a (13)C-tracer study. *Am J Clin Nutr* **2013**, *97* (5), 995-1003.
134. McGhie, T. K.; Ainge, G. D.; Barnett, L. E.; Cooney, J. M.; Jensen, D., Anthocyanin Glycosides from Berry Fruit Are Absorbed and Excreted Unmetabolized by Both Humans and Rats. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4539-4548.
135. Pascual-Teresa, S.; Hallund, J.; Talbot, D.; Schroot, J.; Williams, C. M.; Bugel, S.; Cassidy, A., Absorption of isoflavones in humans: effects of food matrix and processing. *J Nutr Biochem* **2006**, *17* (4), 257-64.
136. Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* **2005**, *81* (1), 230S-42S.
137. Clifford, M., Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica* **2004**, *70*, 1103-1114.
138. Marin, L.; Miguez, E. M.; Villar, C. J.; Lombo, F., Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 905215.
139. Bredsdorff, L.; Nielsen, I. L.; Rasmussen, S. E.; Cornett, C.; Barron, D.; Bouisset, F.; Offord, E.; Williamson, G., Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from alpha-rhamnosidase-treated orange juice in human subjects. *Br J Nutr* **2010**, *103* (11), 1602-9.
140. Gonthier, M.-P.; Cheynier, V.; Donovan, J. L.; Manach, C.; Morand, C.; Mila, I.; Lapiere, C.; Remesy, C.; Scalbert, A., Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 461-467.
141. Gonthier, M. P.; Remesy, C.; Scalbert, A.; Cheynier, V.; Souquet, J.-M.; Poutanen, K.; Aura, A.-M., Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro. *Biomed. Pharmacother.* **2006**, 536-540.
142. Bang, S. H.; Hyun, Y. J.; Shim, J.; Hong, S. W.; Kim, D. H., Metabolism of rutin and poncirin by human intestinal microbiota and cloning of their metabolizing alpha-L-rhamnosidase from *Bifidobacterium dentium*. *J Microbiol Biotechnol* **2015**, *25* (1), 18-25.
143. Deprez, S.; Brezillon, C.; Rabot, S.; Philippe, C.; Mila, I.; Lapiere, C.; Scalbert, A., Polymeric Proanthocyanidins Are Catabolized by Human Colonic Microflora into Low-Molecular-Weight Phenolic Acids. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2733-2738.

144. Jandhyala, S. M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Nageshwar Reddy, D., Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **2015**, *21* (29), 8787-803.
145. Vippera, K.; O'Keefe, S. J., The microbiota and its metabolites in colonic mucosal health and cancer risk. *Nutr Clin Pract* **2012**, *27* (5), 624-35.
146. Clavel, T.; Mapesa, J. O., Phenolics in Human Nutrition: Importance of the Intestinal Microbiome for Isoflavone and Lignan Bioavailability. 2012.
147. Matthies, A.; Loh, G.; Blaut, M.; Braune, A., Daidzein and genistein are converted to equol and 5-hydroxy-equol by human intestinal *Slackia isoflavoniconvertens* in gnotobiotic rats. *J Nutr* **2012**, *142* (1), 40-6.
148. Schneider, H.; Simmering, R.; Hartmann, L.; Pforte, H.; Blaut, M., Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **2000**, *89*, 1027-1037.
149. Hanske, L.; Loh, G.; Sczesny, S.; Blaut, M.; Braune, A., The bioavailability of apigenin-7-glucoside is influenced by human intestinal microbiota in rats. *J Nutr* **2009**, *139* (6), 1095-102.
150. Braune, A.; Blaut, M., Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes* **2016**, *7* (3), 216-34.
151. Couteau, D.; McCartney, A. L.; Gibson, G. R.; Williamson, G.; Faulds, C. B., Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of Applied Microbiology* **2001** *90*, 873-881.
152. Beekwilder, J.; Marcozzi, D.; Vecchi, S.; de Vos, R.; Janssen, P.; Francke, C.; van Hylckama Vlieg, J.; Hall, R. D., Characterization of Rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* **2009**, *75* (11), 3447-54.
153. Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Jauregui, O.; Monagas, M.; Andres-lacueva, C., An LC-MS-Based Metabolomics Approach for Exploring Urinary Metabolome Modifications after Cocoa Consumption. *J Proteome Res* **2009**, *8*, 5060-5068.
154. Appeldoorn, M. M.; Vincken, J.-P.; Aura, A.-M.; Hollman, P. C. H.; Gruppen, H., Procyanidin Dimers Are Metabolized by Human Microbiota with 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)acetic Acid and 5-(3,4-Dihydroxyphenyl)-g-valerolactone as the Major Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (3), 1084-1092.
155. Meselhy, M. R.; Nakamura, N.; Hattori, M., Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1997**, *45* (5), 888-893.
156. Roowi, S.; Stalmach, A.; Mullen, W.; Lean, M. E. J.; Edwards, C. A.; Crozier, A., Green Tea Flavan-3-ols Colonic Degradation and Urinary Excretion of Catabolites by Humans. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1296-1304.
157. Stoupi, S.; Williamson, G.; Viton, F.; Barron, D.; King, L. J.; Brown, J. E.; Clifford, M. N., In vivo bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of [14C]procyanidin B2 in male rats. *Drug Metab Dispos* **2010**, *38* (2), 287-91.
158. Stoupi, S.; Williamson, G.; Drynan, J. W.; Barron, D.; Clifford, M. N., A comparison of the in vitro biotransformation of (-)-epicatechin and procyanidin B2 by human faecal microbiota. *Mol Nutr Food Res* **2010**, *54* (6), 747-59.
159. Stoupi, S.; Williamson, G.; Drynan, J. W.; Barron, D.; Clifford, M. N., Procyanidin B2 catabolism by human fecal microflora: partial characterization of 'dimeric' intermediates. *Arch Biochem Biophys* **2010**, *501* (1), 73-8.
160. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J. P.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A., Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* **2013**, *18* (14), 1818-92.
161. Jansen, G. H.; Arts, I. C.; Nielen, M. W.; Muller, M.; Hollman, P. C.; Keijer, J., Uptake and metabolism of enterolactone and enterodiols by human colon epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* **2005**, *435* (1), 74-82.
162. Xie, L.; Akao, T.; Hamaki, K.; Deyama, T.; Hattori, M., Biotransformation of Pinoresinol Diglucoside to Mammalian Lignans by Human Intestinal Microflora, and Isolation of Enterococcus

- faecalis Strain PDG-1 Responsible for the Transformation of (•)-Pinoresinol to (•)-Lariciresinol. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51* (5), 508-15.
163. McKeown, N. M.; Marklund, M.; Ma, J.; Ross, A. B.; Lichtenstein, A. H.; Livingston, K. A.; Jacques, P. F.; Rasmussen, H. M.; Blumberg, J. B.; Chen, C. Y., Comparison of plasma alkylresorcinols (AR) and urinary AR metabolites as biomarkers of compliance in a short-term, whole-grain intervention study. *Eur J Nutr* **2016**, *55* (3), 1235-44.
164. Rafii, F., The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol. *Metabolites* **2015**, *5* (1), 56-73.
165. Setchell, K. D.; Clerici, C., Equol: history, chemistry, and formation. *J Nutr* **2010**, *140* (7), 1355S-62S.
166. Travis, R. C.; Spencer, E. A.; Allen, N. E.; Appleby, P. N.; Roddam, A. W.; Overvad, K.; Johnsen, N. F.; Olsen, A.; Kaaks, R.; Linseisen, J.; Boeing, H.; Nothlings, U.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Ros, M. M.; Sacerdote, C.; Palli, D.; Tumino, R.; Berrino, F.; Trichopoulou, A.; Dilis, V.; Trichopoulos, D.; Chirlaque, M. D.; Ardanaz, E.; Larranaga, N.; Gonzalez, C.; Suarez, L. R.; Sanchez, M. J.; Bingham, S.; Khaw, K. T.; Hallmans, G.; Stattin, P.; Rinaldi, S.; Slimani, N.; Jenab, M.; Riboli, E.; Key, T. J., Plasma phyto-oestrogens and prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer* **2009**, *100* (11), 1817-23.
167. Kyro, C.; Olsen, A.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Skeie, G.; Loft, S.; Aman, P.; Leenders, M.; Dik, V. K.; Siersema, P. D.; Pischon, T.; Christensen, J.; Overvad, K.; Boutron-Ruault, M. C.; Fagherazzi, G.; Cottet, V.; Kuhn, T.; Chang-Claude, J.; Boeing, H.; Trichopoulou, A.; Naska, A.; Oikonomidou, D.; Masala, G.; Pala, V.; Tumino, R.; Vineis, P.; Mattiello, A.; Peeters, P. H.; Bakken, T.; Weiderpass, E.; Asli, L. A.; Sanchez, S.; Jakszyn, P.; Sanchez, M. J.; Amiano, P.; Huerta, J. M.; Barricarte, A.; Ljuslinder, I.; Palmqvist, R.; Khaw, K. T.; Wareham, N.; Key, T. J.; Travis, R. C.; Slimani, N.; Freisling, H.; Ferrari, P.; Gunter, M. J.; Murphy, N.; Riboli, E.; Tjonneland, A.; Landberg, R., Plasma alkylresorcinol concentrations, biomarkers of whole-grain wheat and rye intake, in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Br J Nutr* **2014**, *111* (10), 1881-90.
168. Rowland, I. R.; Wiseman, H.; Sanders, T. A.; Adlercreutz, H.; Bowey, E. A., Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer* **2000**, *36* (1), 27-32.
169. van der Velpen, V.; Hollman, P. C.; van Nielen, M.; Schouten, E. G.; Mensink, M.; Van't Veer, P.; Geelen, A., Large inter-individual variation in isoflavone plasma concentration limits use of isoflavone intake data for risk assessment. *Eur J Clin Nutr* **2014**, *68* (10), 1141-7.
170. Setchell, K. D.; Brown, N. M.; Desai, P.; Zimmer-Nechemias, L.; Wolfe, B. E.; Brashear, W. T.; Kirschner, A. S.; Cassidy, A.; Heubi, J. E., Bioavailability of Pure Isoflavones in Healthy Humans and Analysis of Commercial Soy Isoflavone Supplements. *J Nutr* **2001**, *131*, 1362S-75S.
171. Song, K. B.; Atkinson, C.; Frankenfeld, C. L.; Jokela, T.; Wahala, K.; Thomas, W. K.; Lampe, J. W., Prevalence of Daidzein-Metabolizing Phenotypes Differs between Caucasian and Korean American Women and Girls. *J Nutr* **2006**, *136*, 1347-51.
172. Akaza, H.; Miyanaga, N.; Takashima, N.; Naito, S.; Hirao, Y.; Tsukamoto, T.; Fujioka, T.; Mori, M.; Kim, W.; Song, J. M.; Pantuck, A. J., Comparisons of Percent Equol Producers between Prostate Cancer Patients and Controls: Case-controlled Studies of Isoflavones in Japanese, Korean and American Residents. *Jpn J Clin Oncol* **2004**, *34* (2), 86-89.
173. Setchell, K. D. R.; Cole, S. J., Method of Defining Equol-Producer Status and Its Frequency among Vegetarians. *J Nutr* **2006**, *136*, 2188-93.
174. Vacca, R. A.; Valenti, D.; Caccamese, S.; Daglia, M.; Braidy, N.; Nabavi, S. M., Plant polyphenols as natural drugs for the management of Down syndrome and related disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **2016**, *71*, 865-877.
175. Islam, M. A.; Alam, F.; Solayman, M.; Khalil, M. I.; Kamal, M. A.; Gan, S. H., Dietary Phytochemicals: Natural Swords Combating Inflammation and Oxidation-Mediated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, *2016*, 5137431.

176. Suganya, N.; Bhakkiyalakshmi, E.; Sarada, D. V.; Ramkumar, K. M., Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: role of polyphenols. *Br J Nutr* **2016**, *116* (2), 223-46.
177. Russo, G. L.; Tedesco, I.; Spagnuolo, C.; Russo, M., Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil? *Semin Cancer Biol* **2017**.
178. Pandey, M. K.; Gupta, S. C.; Nabavizadeh, A.; Aggarwal, B. B., Regulation of cell signaling pathways by dietary agents for cancer prevention and treatment. *Seminars in Cancer Biology* **2017**.
179. Amawi, H.; Ashby, C. R., Jr.; Tiwari, A. K., Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting? *Chin J Cancer* **2017**, *36* (1), 50.
180. Ren, J.; Meng, S.; Lekka, C. E.; Kaxiras, E., Complexation of Flavonoids with Iron: Structure and Optical Signatures. *J Phys Chem B* **2008**, *112*, 1845-1850.
181. Morand, C.; Milenkovic, D., Polyphénols et santé vasculaire mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovations Agronomiques* **2014**, *42*, 47-62.
182. Sirk, T. W.; Brown, E. F.; Friedman, M.; Sum, A. K., Molecular binding of catechins to biomembranes: relationship to biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (15), 6720-6728.
183. Yoshioka, H.; Haga, H.; Kubota, M.; Sakai, Y.; Yoshioka, H., Interaction of (+)-catechin with a lipid bilayer studied by the spin probe method. *Biosci Biotechnol Biochem* **2006**, *70* (2), 395-400.
184. Yu, X.; Chu, S.; Hagerman, A. E.; Lorigan, G. A., Probing the interaction of polyphenols with lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy. *J Agric Food Chem* **2011**, *59* (12), 6783-9.
185. Kamihira, M.; Nakazawa, H.; Kira, A.; Mizutani, Y.; Nakamura, M.; Nakayama, T., Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated by a quartz-crystal microbalance analysis. *Biosci Biotechnol Biochem* **2008**, *72* (5), 1372-5.
186. Oteiza, P. I.; Erlejan, A. G.; Verstraeten, S. V.; Keen, C. L.; Fraga, C. G., Flavonoid-membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface? *Clinical and Developmental Immunology* **2005**, *12* (1), 19-25.
187. Kosinova, P.; Berka, K.; Wykes, M.; Otyepka, M.; Trouillas, P., Positioning of antioxidant quercetin and its metabolites in lipid bilayer membranes: implication for their lipid-peroxidation inhibition. *J Phys Chem B* **2012**, *116* (4), 1309-18.
188. Dangles, O.; Dufour, C.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C., Binding of Flavonoids to Plasma Proteins. *Methods Enzymol.* **2001**, *335*, 319-33.
189. Xiao, J.; Zhao, Y.; Wang, H.; Yuan, Y.; Yang, F.; Zhang, C.; Yamamoto, K., Noncovalent interaction of dietary polyphenols with common human plasma proteins. *J Agric Food Chem* **2011**, *59* (19), 10747-54.
190. Xiao, J.; Chen, T.; Cao, H.; Chen, L.; Yang, F., Molecular property-affinity relationship of flavanoids and flavonoids for HSA in vitro. *Mol Nutr Food Res* **2011**, *55* (2), 310-7.
191. Cao, H.; Jia, X.; Shi, J.; Xiao, J.; Chen, X., Non-covalent interaction between dietary stilbenoids and human serum albumin: Structure-affinity relationship, and its influence on the stability, free radical scavenging activity and cell uptake of stilbenoids. *Food Chem* **2016**, *202*, 383-8.
192. Tarahovsky, Y. S.; Kim, Y. A.; Yagolnik, E. A.; Muzafarov, E. N., Flavonoid-membrane interactions: involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1838* (5), 1235-46.
193. Annaba, F.; Kumar, P.; Dudeja, A. K.; Saksena, S.; Gill, R. K.; Alrefai, W. A., Green tea catechin EGCG inhibits ileal apical sodium bile acid transporter ASBT. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2010**, *298* (3), G467-73.
194. Forman, H. J.; Ursini, F.; Maiorino, M., An overview of mechanisms of redox signaling. *J Mol Cell Cardiol* **2014**, *73*, 2-9.
195. Feillet-Coudray, C.; Sutra, T.; Fouret, G.; Ramos, J.; Wrutniak-Cabello, C.; Cabello, G.; Cristol, J. P.; Coudray, C., Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radical Biology and Medicine* **2009**, *46* (5), 624-632.

196. Lopez-Alarcon, C.; Denicola, A., Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta* **2013**, *763*, 1-10.
197. Chalopin, M.; Tesse, A.; MartÃ-nez, M. C.; Rognan, D.; Arnal, J.-F. o.; Andriantsitohaina, R., Estrogen Receptor Alpha as a Key Target of Red Wine Polyphenols Action on the Endothelium. *PLoS ONE* **2010**, *5* (1), e8554.
198. Zhang, T.; Liang, X.; Shi, L.; Wang, L.; Chen, J.; Kang, C.; Zhu, J.; Mi, M., Estrogen receptor and PI3K/Akt signaling pathway involvement in S-(-)equol-induced activation of Nrf2/ARE in endothelial cells. *PLoS One* **2013**, *8* (11), e79075.
199. Ho, H. H.; Chang, C. S.; Ho, W. C.; Liao, S. Y.; Wu, C. H.; Wang, C. J., Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF-kappaB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. *Food Chem Toxicol* **2010**, *48* (8-9), 2508-16.
200. Chang, S. S.; Lee, V. S.; Tseng, Y. L.; Chang, K. C.; Chen, K. B.; Chen, Y. L.; Li, C. Y., Gallic Acid Attenuates Platelet Activation and Platelet-Leukocyte Aggregation: Involving Pathways of Akt and GSK3beta. *Evid Based Complement Alternat Med* **2012**, *2012*, 683872.
201. Amado, N. G.; Fonseca, B. F.; Cerqueira, D. M.; Neto, V. M.; Abreu, J. G., Flavonoids: potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. *Life Sci* **2011**, *89* (15-16), 545-54.
202. Al-Hanbali, M.; Ali, D.; Bustami, M.; Abdel-Malek, S.; Al-Hanbali, R.; Alhussainy, T.; Qadan, F.; Matalka, K. Z., Epicatechin suppresses IL-6, IL-8 and enhances IL-10 production with NF-kB nuclear translocation in whole blood stimulated system. *Neuroendocrinology Letters* **2009**, *30*, 131-138.
203. Vineis, P.; Schatzkin, A.; Potter, J. D., Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis* **2010**, *31* (10), 1703-9.
204. Mendelsohn, J.; Gray, J. W.; Howley, P. M.; Israel, M. A.; Thompson, C. B., Preface. In *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, Content Repository Only!: Philadelphia, 2015; p xix.
205. Abel, E. L.; DiGiovanni, J., Environmental Carcinogenesis - Ch. 7 - Mendelsohn, John. In *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, Gray, J. W.; Howley, P. M.; Israel, M. A.; Thompson, C. B., Eds. Content Repository Only!: Philadelphia, 2015; pp 103-128.e2.
206. Fearon, E. R., Colon and Rectal Cancer - Ch. 34 - Mendelsohn, John. In *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, Gray, J. W.; Howley, P. M.; Israel, M. A.; Thompson, C. B., Eds. Content Repository Only!: Philadelphia, 2015; pp 499-514.e2.
207. Vippera, K.; O'Keefe, S. J., Diet, microbiota, and dysbiosis: a 'recipe' for colorectal cancer. *Food Funct* **2016**, *7* (4), 1731-40.
208. Terzic, J.; Grivennikov, S.; Karin, E.; Karin, M., Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* **2010**, *138* (6), 2101-2114 e5.
209. Baylin, S. B., Epigenetics and Cancer - Ch. 5 - Mendelsohn, John. In *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, Gray, J. W.; Howley, P. M.; Israel, M. A.; Thompson, C. B., Eds. Content Repository Only!: Philadelphia, 2015; pp 67-78.e3.
210. Baylin, S. B.; Ohm, J. E., Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* **2006**, *6* (2), 107-16.
211. Lage, H., An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci* **2008**, *65* (20), 3145-67.
212. D'Andrea, A. D., DNA Repair Pathways and Human Cancer - Ch. 4 - Mendelsohn, John. In *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, Gray, J. W.; Howley, P. M.; Israel, M. A.; Thompson, C. B., Eds. Content Repository Only!: Philadelphia, 2015; pp 47-66.e2.
213. Folkman, J.; Kalluri, R., Cancer without disease. *Nature* **2004**, 427-787.
214. Bissell, M. J.; Hines, W. C., Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* **2011**, *17* (3), 320-9.
215. Medzhitov, R., Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **2008**, *454* (7203), 428-35.
216. Chai, E. Z.; Siveen, K. S.; Shanmugam, M. K.; Arfuso, F.; Sethi, G., Analysis of the intricate relationship between chronic inflammation and cancer. *Biochem J* **2015**, *468* (1), 1-15.



217. Sica, A.; Allavena, P.; Mantovani, A., Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* **2008**, *267* (2), 204-15.
218. Edin, S.; Wikberg, M. L.; Dahlin, A. M.; Rutegard, J.; Oberg, A.; Oldenborg, P. A.; Palmqvist, R., The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS One* **2012**, *7* (10), e47045.
219. Quail, D. F.; Joyce, J. A., Inflammation and Cancer - Ch. 19 - Mendelsohn, John. In *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, Gray, J. W.; Howley, P. M.; Israel, M. A.; Thompson, C. B., Eds. Content Repository Only!: Philadelphia, 2015; pp 285-296.e3.
220. Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B., Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* **2010**, *49* (11), 1603-16.
221. Landry, W. D.; Cotter, T. G., ROS signalling, NADPH oxidases and cancer. *Biochem Soc Trans* **2014**, *42* (4), 934-8.
222. Kovacic, P.; Jacintho, J. D., Mechanisms of Carcinogenesis Focus on Oxidative Stress and Electron Transfer. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8* (7), 773-796.
223. Patlevic, P.; Vaskova, J.; Svorc, P., Jr.; Vasko, L.; Svorc, P., Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integr Med Res* **2016**, *5* (4), 250-258.
224. Sreevalsan, S.; Safe, S., Reactive Oxygen Species and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* **2013**, *9* (4), 350-357.
225. Espinosa-Diez, C.; Miguel, V.; Mennerich, D.; Kietzmann, T.; Sanchez-Perez, P.; Cadenas, S.; Lamas, S., Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol* **2015**, *6*, 183-97.
226. Hollman, P. C.; Cassidy, A.; Comte, B.; Heinonen, M.; Richelle, M.; Richling, E.; Serafini, M.; Scalbert, A.; Sies, H.; Vidry, S., The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr* **2011**, *141* (5), 989S-1009S.
227. Rizvi, S.; Raza, S. T.; Ahmed, F.; Ahmad, A.; Abbas, S.; Mahdi, F., The Role of Vitamin E in Human Health and Some diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal* **2013**, *14* (2), 157-165.
228. Leenders, M.; Leufkens, A. M.; Siersema, P. D.; van Duijnhoven, F. J.; Vrieling, A.; Hulshof, P. J.; van Gils, C. H.; Overvad, K.; Roswall, N.; Kyro, C.; Boutron-Ruault, M. C.; Fagherazzi, G.; Cadeau, C.; Kuhn, T.; Johnson, T.; Boeing, H.; Aleksandrova, K.; Trichopoulou, A.; Klinaki, E.; Androulidaki, A.; Palli, D.; Grioni, S.; Sacerdote, C.; Tumino, R.; Panico, S.; Bakker, M. F.; Skeie, G.; Weiderpass, E.; Jakszyn, P.; Barricarte, A.; Maria Huerta, J.; Molina-Montes, E.; Arguelles, M.; Johansson, I.; Ljuslinder, I.; Key, T. J.; Bradbury, K. E.; Khaw, K. T.; Wareham, N. J.; Ferrari, P.; Duarte-Salles, T.; Jenab, M.; Gunter, M. J.; Vergnaud, A. C.; Wark, P. A.; Bueno-de-Mesquita, H. B., Plasma and dietary carotenoids and vitamins A, C and E and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* **2014**, *135* (12), 2930-9.
229. Bruchard, M.; Ghiringhelli, F., Tumor microenvironment: regulatory cells and immunosuppressive cytokines. *Med Sci (Paris)* **2014**, *30* (4), 429-35.
230. Korkaya, H.; Davis, A.; Wicha, M. S., Cancer Stem Cells and the Microenvironment - Ch. 10 - Mendelsohn, John. In *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, Gray, J. W.; Howley, P. M.; Israel, M. A.; Thompson, C. B., Eds. Content Repository Only!: Philadelphia, 2015; pp 157-164.e3.
231. Ghajar, C. M.; Correia, A. L.; Bissell, M. J., The Role of the Microenvironment in Tumor Initiation, Progression, and Metastasis - Ch. 16 - Mendelsohn, John. In *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, Gray, J. W.; Howley, P. M.; Israel, M. A.; Thompson, C. B., Eds. Content Repository Only!: Philadelphia, 2015; pp 239-256.e5.
232. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Ervik, M.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year. **2013**.
233. Goss, K. H.; Groden, J., Biology of the Adenomatous Polyposis Coli Tumor Suppressor. *Journal of Clinical Oncology* **2000**, *18* (9), 1967-1979.

234. Ferguson, L. R.; Chen, H.; Collins, A. R.; Connell, M.; Damia, G.; Dasgupta, S.; Malhotra, M.; Meeker, A. K.; Amedei, A.; Amin, A.; Ashraf, S. S.; Aquilano, K.; Azmi, A. S.; Bhakta, D.; Bilsland, A.; Boosani, C. S.; Chen, S.; Ciriolo, M. R.; Fujii, H.; Guha, G.; Halicka, D.; Helferich, W. G.; Keith, W. N.; Mohammed, S. I.; Niccolai, E.; Yang, X.; Honoki, K.; Parslow, V. R.; Prakash, S.; Rezazadeh, S.; Shackelford, R. E.; Sidransky, D.; Tran, P. T.; Yang, E. S.; Maxwell, C. A., Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin Cancer Biol* **2015**, *35 Suppl*, S5-24.
235. Brenner, H.; Kloor, M.; Pox, C. P., Colorectal cancer. *The Lancet* **2014**, *383* (9927), 1490-1502.
236. Abbas, T.; Keaton, M. A.; Dutta, A., Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5* (3), a012914.
237. Labianca, R.; Beretta, G. D.; Kildani, B.; Milesi, L.; Merlin, F.; Mosconi, S.; Pessi, M. A.; Prochilo, T.; Quadri, A.; Gatta, G.; de Braud, F.; Wils, J., Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **2010**, *74* (2), 106-33.
238. Hou, T. Y.; Davidson, L. A.; Kim, E.; Fan, Y. Y.; Fuentes, N. R.; Triff, K.; Chapkin, R. S., Nutrient-Gene Interaction in Colon Cancer, from the Membrane to Cellular Physiology. *Annu Rev Nutr* **2016**, *36*, 543-70.
239. Voutsinas, J.; Wilkens, L. R.; Franke, A.; Vogt, T. M.; Yokochi, L. A.; Decker, R.; Le Marchand, L., Heterocyclic amine intake, smoking, cytochrome P450 1A2 and N-acetylation phenotypes, and risk of colorectal adenoma in a multiethnic population. *Gut* **2013**, *62* (3), 416-22.
240. Aran, V.; Victorino, A. P.; Thuler, L. C.; Ferreira, C. G., Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clin Colorectal Cancer* **2016**, *15* (3), 195-203.
241. Orlando, F. A.; Tan, D.; Baltodano, J. D.; Khoury, T.; Gibbs, J. F.; Hassid, V. J.; Ahmed, B. H.; Alrawi, S. J., Aberrant crypt foci as precursors in colorectal cancer progression. *J Surg Oncol* **2008**, *98* (3), 207-13.
242. Brown, N. E.; Hinds, P. W., Tumor Suppressor Genes - Ch. 3 - Mendelsohn, John. In *The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, Gray, J. W.; Howley, P. M.; Israel, M. A.; Thompson, C. B., Eds. Content Repository Only!: Philadelphia, 2015; pp 35-46.e1.
243. Klaus, A.; Birchmeier, W., Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8*, 387-398.
244. Oguma, K.; Oshima, H.; Aoki, M.; Uchio, R.; Naka, K.; Nakamura, S.; Hirao, A.; Saya, H.; Taketo, M. M.; Oshima, M., Activated macrophages promote Wnt signalling through tumor necrosis factor-alpha in gastric tumours cells. *EMBO J* **2008**, *27*, 1671-1681.
245. Castellone, M. D.; Teramoto, H.; Williams, B. O.; Druey, K. M.; Gutkind, J. S., Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* **2005**, *310*, 1504-1510.
246. IARC, World Cancer Report 2014. In *World Cancer Report 2014*, Stewart, B. W.; Wild, C. P., Eds. ©International Agency for Research on Cancer, 2014: Lyon 2014.
247. Huxley, R. R.; Ansary-Moghaddam, A.; Clifton, P.; Czernichow, S.; Parr, C. L.; Woodward, M., The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer* **2009**, *125* (1), 171-80.
248. Song, M.; Garrett, W. S.; Chan, A. T., Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology* **2015**, *148* (6), 1244-60 e16.
249. Tsoi, K. K.; Pau, C. Y.; Wu, W. K.; Chan, F. K.; Griffiths, S.; Sung, J. J., Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2009**, *7* (6), 682-688 e1-5.
250. Derry, M. M.; Raina, K.; Agarwal, C.; Agarwal, R., Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Front Oncol* **2013**, *3*, 119.
251. Botteri, E.; Simona Iodice, S.; Bagnardi, V.; Raimondi, S.; Lowenfels, A. B.; Maisonneuve, P., Smoking and Colorectal Cancer: A Meta-analysis. *JAMA* **2008**, *300*, 2765-78.

252. Liang, P. S.; Chen, T. Y.; Giovannucci, E., Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* **2009**, *124* (10), 2406-15.
253. Ye, Y. N.; Liu, E. S.; Shin, V. Y.; Wu, W. K.; Cho, C. H., The modulating role of nuclear factor-kappaB in the action of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and cross-talk between 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in colon cancer growth induced by 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, *311* (1), 123-30.
254. Zhu, J. Z.; Wang, Y. M.; Zhou, Q. Y.; Zhu, K. F.; Yu, C. H.; Li, Y. M., Systematic review with meta-analysis: alcohol consumption and the risk of colorectal adenoma. *Aliment Pharmacol Ther* **2014**, *40* (4), 325-37.
255. Jayasekara, H.; MacInnis, R. J.; Room, R.; English, D. R., Long-Term Alcohol Consumption and Breast, Upper Aero-Digestive Tract and Colorectal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Alcohol Alcohol* **2016**, *51* (3), 315-30.
256. de Menezes, R. F.; Bergmann, A.; Thuler, L. C. S., Alcohol Consumption and Risk of Cancer: a Systematic Literature Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2013**, *14* (9), 4965-4972.
257. Testino, G., The Burden of Cancer Attributable to Alcohol Consumption. *Maedica (Buchar)* **2011**, *6*, 313-320.
258. Na, H. K.; Lee, J. Y., Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. *Int J Mol Sci* **2017**, *18* (6).
259. Seitz, H. K.; Stickel, F., Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr* **2010**, *5* (2), 121-8.
260. Renehan, A. G.; Tyson, M.; Egger, M.; Heller, R. F.; Zwahlen, M., Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *The Lancet* **2008**, *371* (9612), 569-578.
261. Calle, E. E.; Kaaks, R., Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4* (8), 579-91.
262. Hursting, S. D.; Digiovanni, J.; Dannenberg, A. J.; Azrad, M.; Leroith, D.; Demark-Wahnefried, W.; Kakarala, M.; Brodie, A.; Berger, N. A., Obesity, energy balance, and cancer: new opportunities for prevention. *Cancer Prev Res (Phila)* **2012**, *5* (11), 1260-72.
263. Bardou, M.; Barkun, A. N.; Martel, M., Obesity and colorectal cancer. *Gut* **2013**, *62* (6), 933-47.
264. World Cancer Research Fund; American Institute for Cancer Research, Continuous Update Project: Keeping the science current. Colorectal Cancer 2011 Report: Food, nutrition, physical activity, and the prevention of colorectal cancer. **2011**.
265. Zheng, J.; Zhao, M.; Li, J.; Lou, G.; Yuan, Y.; Bu, S.; Xi, Y., Obesity-associated digestive cancers: A review of mechanisms and interventions. *Tumour Biol* **2017**, *39* (3), 1010428317695020.
266. Pietrzyk, L.; Torres, A.; Maciejewski, R.; Torres, K., Obesity and Obese-related Chronic Low-grade Inflammation in Promotion of Colorectal Cancer Development. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2015**, *16* (10), 4161-4168.
267. Khandekar, M. J.; Cohen, P.; Spiegelman, B. M., Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11* (12), 886-95.
268. Aleman, J. O.; Eusebi, L. H.; Ricciardiello, L.; Patidar, K.; Sanyal, A. J.; Holt, P. R., Mechanisms of obesity-induced gastrointestinal neoplasia. *Gastroenterology* **2014**, *146* (2), 357-73.
269. Chan, D. S.; Lau, R.; Aune, D.; Vieira, R.; Greenwood, D. C.; Kampman, E.; Norat, T., Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One* **2011**, *6* (6), e20456.
270. Magee, E. A.; Curno, R.; Edmond, L. M.; Cummings, J. H., Contribution of dietary protein and inorganic sulfur to urinary sulfate toward a biomarker of inorganic sulfur intake. *Am J Clin Nutr* **2004**, *80*, 137-42.
271. Rowan, F. E.; Docherty, N. G.; Coffey, J. C.; O'Connell, P. R., Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative colitis. *Br J Surg* **2009**, *96* (2), 151-8.

272. Bastide, N. M.; Chenni, F.; Audebert, M.; Santarelli, R. L.; Tache, S.; Naud, N.; Baradat, M.; Jouanin, I.; Surya, R.; Hobbs, D. A.; Kuhnle, G. G.; Raymond-Letron, I.; Gueraud, F.; Corpet, D. E.; Pierre, F. H., A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res* **2015**, *75* (5), 870-9.
273. Joosen, A. M.; Kuhnle, G. G.; Aspinall, S. M.; Barrow, T. M.; Lecommandeur, E.; Azqueta, A.; Collins, A. R.; Bingham, S. A., Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis* **2009**, *30* (8), 1402-7.
274. Boada, L. D.; Henriquez-Hernandez, L. A.; Luzardo, O. P., The impact of red and processed meat consumption on cancer and other health outcomes: Epidemiological evidences. *Food Chem Toxicol* **2016**, *92*, 236-44.
275. Baena Ruiz, R.; Salinas Hernandez, P., Diet and cancer: risk factors and epidemiological evidence. *Maturitas* **2014**, *77* (3), 202-8.
276. Wang, H.; Iwasaki, M.; Haiman, C. A.; Kono, S.; Wilkens, L. R.; Keku, T. O.; Berndt, S. I.; Tsugane, S.; Le Marchand, L., Interaction between Red Meat Intake and NAT2 Genotype in Increasing the Risk of Colorectal Cancer in Japanese and African Americans. *PLoS One* **2015**, *10* (12), e0144955.
277. Borges-Canha, M.; Portela-Cidade, J. P.; Dinis-Ribeiro, M.; Leite-Moreira, A. F.; Pimentel-Nunes, P., Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig* **2015**, *107*, 659-671.
278. Keku, T. O.; Dulal, S.; Deveaux, A.; Jovov, B.; Han, X., The gastrointestinal microbiota and colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2015**, *308* (5), G351-63.
279. Kerr, J.; Anderson, C.; Lippman, S. M., Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. *The Lancet Oncology* **2017**, *18* (8), e457-e471.
280. Van Blarigan, E. L.; Meyerhardt, J. A., Role of physical activity and diet after colorectal cancer diagnosis. *J Clin Oncol* **2015**, *33* (16), 1825-34.
281. Boyle, T.; Keegel, T.; Bull, F.; Heyworth, J.; Fritschi, L., Physical Activity and Risks of Proximal and Distal Colon Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *JNCI- Natl. Cancer Inst.* **2012**, *104* (20), 1548-1561.
282. Kyu, H. H.; Bachman, V. F.; Alexander, L. T.; Mumford, J. E.; Afshin, A.; Estep, K.; Veerman, J. L.; Delwiche, K.; Iannarone, M. L.; Moyer, M. L.; Cercy, K.; Vos, T.; Murray, C. J.; Forouzanfar, M. H., Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *BMJ* **2016**, *354*, i3857.
283. Moore, S. C.; Lee, I. M.; Weiderpass, E.; Campbell, P. T.; Sampson, J. N.; Kitahara, C. M.; Keadle, S. K.; Arem, H.; Berrington de Gonzalez, A.; Hartge, P.; Adami, H. O.; Blair, C. K.; Borch, K. B.; Boyd, E.; Check, D. P.; Fournier, A.; Freedman, N. D.; Gunter, M.; Johannson, M.; Khaw, K. T.; Linet, M. S.; Orsini, N.; Park, Y.; Riboli, E.; Robien, K.; Schairer, C.; Sesso, H.; Spriggs, M.; Van Dusen, R.; Wolk, A.; Matthews, C. E.; Patel, A. V., Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. *JAMA Intern Med* **2016**, *176* (6), 816-25.
284. Simons, C. C. J. M.; Hughes, L. A. E.; van Engeland, M.; Goldbohm, R. A.; van den Brandt, P. A.; P. Weijenberg, M. P., Physical Activity, Occupational Sitting Time, and Colorectal Cancer Risk in the Netherlands Cohort Study. *Am J Epidemiol* **2013**, *177* (6), 514-30.
285. Bressa, C.; Bailen-Andrino, M.; Perez-Santiago, J.; Gonzalez-Soltero, R.; Perez, M.; Montalvo-Lominchar, M. G.; Mate-Munoz, J. L.; Dominguez, R.; Moreno, D.; Larrosa, M., Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. *PLoS One* **2017**, *12* (2), e0171352.
286. Aune, D.; Lau, R.; Chan, D. S.; Vieira, R.; Greenwood, D. C.; Kampman, E.; Norat, T., Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Ann Oncol* **2012**, *23* (1), 37-45.
287. Keum, N.; Aune, D.; Greenwood, D. C.; Ju, W.; Giovannucci, E. L., Calcium intake and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Int J Cancer* **2014**, *135* (8), 1940-8.

288. Ma, Y.; Zhang, P.; Wang, F.; Yang, J.; Liu, Z.; Qin, H., Association between vitamin D and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *J Clin Oncol* **2011**, *29* (28), 3775-82.
289. Cai, X.; Wang, C.; Yu, W.; Fan, W.; Wang, S.; Shen, N.; Wu, P.; Li, X.; Wang, F., Selenium Exposure and Cancer Risk: an Updated Meta-analysis and Meta-regression. *Sci Rep* **2016**, *6*, 19213.
290. Lamprecht, S. A.; Lipkin, M., Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3* (8), 601-14.
291. Feldman, D.; Krishnan, A. V.; Swami, S.; Giovannucci, E.; Feldman, B. J., The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* **2014**, *14* (5), 342-57.
292. Deeb, K. K.; Trump, D. L.; Johnson, C. S., Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7* (9), 684-700.
293. Larriba, M. J.; Gonzalez-Sancho, J. M.; Barbachano, A.; Niell, N.; Ferrer-Mayorga, G.; Munoz, A., Vitamin D Is a Multilevel Repressor of Wnt/b-Catenin Signaling in Cancer Cells. *Cancers (Basel)* **2013**, *5* (4), 1242-60.
294. Bassaganya-Riera, J.; Hontecillas, R.; Horne, W. T.; Sandridge, M.; Herfarth, H. H.; Bloomfeld, R.; Isaacs, K. L., Conjugated linoleic acid modulates immune responses in patients with mild to moderately active Crohn's disease. *Clin Nutr* **2012**, *31* (5), 721-7.
295. Bassaganya-Riera, J.; Hontecillas, R.; Beitz, D. C., Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid. *Clinical Nutrition* **2002**, *21* (6), 451-459.
296. Evans, N. P.; Misyak, S. A.; Schmelz, E. M.; Guri, A. J.; Hontecillas, R.; Bassaganya-Riera, J., Conjugated linoleic acid ameliorates inflammation-induced colorectal cancer in mice through activation of PPARgamma. *J Nutr* **2010**, *140* (3), 515-21.
297. Thangaraju, M.; Cresci, G. A.; Liu, K.; Ananth, S.; Gnanaprakasam, J. P.; Browning, D. D.; Mellinger, J. D.; Smith, S. B.; Digby, G. J.; Lambert, N. A.; Prasad, P. D.; Ganapathy, V., GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Res* **2009**, *69* (7), 2826-32.
298. Hamer, H. M.; Jonkers, D.; Venema, K.; Vanhoutvin, S.; Troost, F. J.; Brummer, R. J., Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **2008**, *27* (2), 104-19.
299. Aune, D.; Chan, D. S.; Lau, R.; Vieira, R.; Greenwood, D. C.; Kampman, E.; Norat, T., Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* **2011**, *343*, d6617.
300. Frolich, W.; Aman, P., Whole grain for whom and why? *Food Nutr Res* **2010**, *54*.
301. Fardet, A.; Rock, E.; Révész, C., Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? *Journal of Cereal Science* **2008**, *48* (2), 258-276.
302. Soderholm, P. P.; Koskela, A. H.; Lundin, J. E.; Tikkanen, M. J.; Adlercreutz, H. C., Plasma pharmacokinetics of alkylresorcinol metabolites: new candidate biomarkers for whole-grain rye and wheat intake. *Am J Clin Nutr* **2009**, *90* (5), 1167-71.
303. Landberg, R.; Aman, P.; Hallmans, G.; Johansson, I., Long-term reproducibility of plasma alkylresorcinols as biomarkers of whole-grain wheat and rye intake within Northern Sweden Health and Disease Study Cohort. *Eur J Clin Nutr* **2013**, *67* (3), 259-63.
304. Kyro, C.; Olsen, A.; Landberg, R.; Skeie, G.; Loft, S.; Aman, P.; Leenders, M.; Dik, V. K.; Siersema, P. D.; Pischon, T.; Christensen, J.; Overvad, K.; Boutron-Ruault, M. C.; Fagherazzi, G.; Cottet, V.; Kuhn, T.; Chang-Claude, J.; Boeing, H.; Trichopoulou, A.; Bamia, C.; Trichopoulos, D.; Palli, D.; Krogh, V.; Tumino, R.; Vineis, P.; Panico, S.; Peeters, P. H.; Weiderpass, E.; Bakken, T.; Asli, L. A.; Arguelles, M.; Jakszyn, P.; Sanchez, M. J.; Amiano, P.; Huerta, J. M.; Barricarte, A.; Ljuslinder, I.; Palmqvist, R.; Khaw, K. T.; Wareham, N.; Key, T. J.; Travis, R. C.; Ferrari, P.; Freisling, H.; Jenab, M.; Gunter, M. J.; Murphy, N.; Riboli, E.; Tjonneland, A.; Bueno-de-Mesquita, H. B., Plasma alkylresorcinols, biomarkers of whole-grain wheat and rye intake, and incidence of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* **2014**, *106* (1), djt352.
305. Fung, K. Y.; Cosgrove, L.; Lockett, T.; Head, R.; Topping, D. L., A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *Br J Nutr* **2012**, *108* (5), 820-31.

306. Louis, P.; Hold, G. L.; Flint, H. J., The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology* **2014**, *12* (10), 661-672.
307. Park, Y.; Spiegelman, D.; Hunter, D. J.; Albanes, D.; Bergkvist, L.; Buring, J. E.; Freudenheim, J. L.; Giovannucci, E.; Goldbohm, R. A.; Harnack, L.; Kato, I.; Krogh, V.; Leitzmann, M. F.; Limburg, P. J.; Marshall, J. R.; McCullough, M. L.; Miller, A. B.; Rohan, T. E.; Schatzkin, A.; Shore, R.; Sieri, S.; Stampfer, M. J.; Virtamo, J.; Weijenberg, M.; Willett, W. C.; Wolk, A.; Zhang, S. M.; Smith-Warner, S. A., Intakes of vitamins A, C, and E and use of multiple vitamin supplements and risk of colon cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *Cancer Causes Control* **2010**, *21* (11), 1745-57.
308. Baena Ruiz, R.; Salinas Hernandez, P., Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: Epidemiological evidence. *Maturitas* **2016**, *94*, 13-19.
309. Masisi, K.; Beta, T.; Moghadasian, M. H., Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chem* **2016**, *196*, 90-7.
310. Aune, D.; Lau, R.; Chan, D. S.; Vieira, R.; Greenwood, D. C.; Kampman, E.; Norat, T., Nonlinear reduction in risk for colorectal cancer by fruit and vegetable intake based on meta-analysis of prospective studies. *Gastroenterology* **2011**, *141* (1), 106-18.
311. Tanaka, T.; Shnimizu, M.; Moriwaki, H., Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules* **2012**, *17* (3), 3202-42.
312. Du, J.; Cullen, J. J.; Buettner, G. R., Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1826* (2), 443-57.
313. Pohanka, M.; Pejchal, J.; Snopkova, S.; Havlickova, K.; Karasova, J. Z.; Bostik, P.; Pikula, J., Ascorbic Acid An Old Player with a Broad Impact on Body Physiology Including Oxidative A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2012**, *12*, 35-43.
314. Singh, S. V.; Singh, K., Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis* **2012**, *33* (10), 1833-42.
315. Gupta, P.; Wright, S. E.; Kim, S. H.; Srivastava, S. K., Phenethyl isothiocyanate: a comprehensive review of anti-cancer mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1846* (2), 405-24.
316. Mannisto, S.; Yaun, S. S.; Hunter, D. J.; Spiegelman, D.; Adami, H. O.; Albanes, D.; van den Brandt, P. A.; Buring, J. E.; Cerhan, J. R.; Colditz, G. A.; Freudenheim, J. L.; Fuchs, C. S.; Giovannucci, E.; Goldbohm, R. A.; Harnack, L.; Leitzmann, M.; McCullough, M. L.; Miller, A. B.; Rohan, T. E.; Schatzkin, A.; Virtamo, J.; Willett, W. C.; Wolk, A.; Zhang, S. M.; Smith-Warner, S. A., Dietary carotenoids and risk of colorectal cancer in a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am J Epidemiol* **2007**, *165* (3), 246-55.
317. Hertog, M. G. L.; Feskens, E. J. M.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.; Kromhout, D., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* **1993**, *342*, 1007-11.
318. Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Kahn, M. B., Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in The Netherlands. *J Agric Food Chem* **1992**, *40*, 2379-2383.
319. Le Marchand, L., Cancer preventive effects of flavonoids—a review. *Biomed Pharmacother* **2002**, *56*, 296-301.
320. Ji, B.-T.; Chow, W.-H.; Hsing, A. W.; McLaughlin, J. K.; Dai, Q.; Gao, Y.-T.; Blot, W. J.; Fraumeni, J. F., Green tea consumption and the risk of pancreatic and colorectal cancers. *International Journal of Cancer* **1997**, *70* (3), 255-258.
321. Cotterchio, M.; Boucher, B. A.; Manno, M.; Gallinger, S.; Okey, A.; Harper, P., Dietary Phytoestrogen Intake Is Associated with reduced colorectal cancer risk. *J Nutr* **2007**, *136*, 3046-3053.
322. Akhter, M.; Iwasaki, M.; Yamaji, T.; Sasazuki, S.; Tsugane, S., Dietary isoflavone and the risk of colorectal adenoma: a case-control study in Japan. *Br J Cancer* **2009**, *100* (11), 1812-6.
323. Rossi, M.; Negri, E.; Talamini, R.; Bosetti, C.; Parpinel, M.; Gnagnarella, P.; Franceschi, S.; Dal Maso, L.; Montella, M.; Giacosa, A.; La Vecchia, C., Flavonoids and colorectal cancer in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**, *15* (8), 1555-8.

324. Theodoratou, E.; Kyle, J.; Cetnarskyj, R.; Farrington, S. M.; Tenesa, A.; Barnetson, R.; Porteous, M.; Dunlop, M.; Campbell, H., Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2007**, *16* (4), 684-93.
325. Kyle, J. A.; Sharp, L.; Little, J.; Duthie, G. G.; McNeill, G., Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case-control study. *Br J Nutr* **2010**, *103* (3), 429-36.
326. Djuric, Z.; Sevenson, R. K.; Kato, I., Association of dietary quercetin with reduced risk of proximal colon cancer. *Nutr Cancer* **2012**, *64* (3), 351-60.
327. Rossi, M.; Negri, E.; Parpinel, M.; Lagiou, P.; Bosetti, C.; Talamini, R.; Montella, M.; Giacosa, A.; Franceschi, S.; La Vecchia, C., Proanthocyanidins and the risk of colorectal cancer in Italy. *Cancer Causes Control* **2010**, *21* (2), 243-50.
328. Jin, H.; Leng, Q.; Li, C., Dietary flavonoid for preventing colorectal neoplasms. *Cochrane Database Syst Rev* **2012**, (8), CD009350.
329. Grosso, G.; Godos, J.; Lamuela-Raventos, R.; Ray, S.; Micek, A.; Pajak, A.; Sciacca, S.; D'Orazio, N.; Del Rio, D.; Galvano, F., A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Mol Nutr Food Res* **2017**, *61* (4).
330. Arts, I. C. W.; Jacobs, D. R. J.; Gross, M.; Harnack, L. J.; Folsom, A. R., Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control* **2002**, *13*, 373-382.
331. Simons, C. C.; Hughes, L. A.; Arts, I. C.; Goldbohm, R. A.; van den Brandt, P. A.; Weijenberg, M. P., Dietary flavonol, flavone and catechin intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands Cohort Study. *Int J Cancer* **2009**, *125* (12), 2945-52.
332. Yang, G.; Shu, X. O.; Li, H.; Chow, W. H.; Cai, H.; Zhang, X.; Gao, Y. T.; Zheng, W., Prospective cohort study of soy food intake and colorectal cancer risk in women. *Am J Clin Nutr* **2009**, *89* (2), 577-83.
333. Yuan, J. M.; Gao, Y. T.; Yang, C. S.; Yu, M. C., Urinary biomarkers of tea polyphenols and risk of colorectal cancer in the Shanghai Cohort Study. *International Journal of Cancer* **2007**, *120* (6), 1344-1350.
334. Kuijsten, A.; Arts, I. C.; Hollman, P. C.; van't Veer, P.; Kampman, E., Plasma enterolignans are associated with lower colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**, *15* (6), 1132-6.
335. Zhou, Y.; Zheng, J.; Li, Y.; Xu, D. P.; Li, S.; Chen, Y. M.; Li, H. B., Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients* **2016**, *8* (8).
336. Adams, K. F.; Lampe, P. D.; Newton, K. M.; Ylvisaker, J. T.; Feld, A.; David Myerson, D.; Scott S Emerson, S. S.; Emily White, E.; Potter, J. D.; Lampe, J. W., Soy protein containing isoflavones does not decrease colorectal epithelial cell proliferation in a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* **2005**, *82*, 620-6.
337. Vis, E. H.; Geerse, G. J.; Eline S. Klaassens, E. S.; van Boekel, M. A.; M. Alink, G. M., Possible Mechanisms Behind the Differential Effects of Soy Protein and Casein Feedings on Colon Cancer Biomarkers in the Rat. *NUTRITION AND CANCER* **2005**, *51* (1), 37-44.
338. Cruz-Correa, M.; Shoskes, D. A.; Sanchez, P.; Zhao, R.; Hylind, L. M.; Wexner, S. D.; Giardiello, F. M., Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2006**, *4* (8), 1035-8.
339. Carroll, R. E.; Benya, R. V.; Turgeon, D. K.; Vareed, S.; Neuman, M.; Rodriguez, L.; Kakarala, M.; Carpenter, P. M.; McLaren, C.; Meyskens, F. L., Jr.; Brenner, D. E., Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)* **2011**, *4* (3), 354-64.
340. He, Z.-Y.; Shi, C.-B.; Wen, H.; Li, F.-L.; Wang, B.-L.; Wang, J., Upregulation of p53 Expression in Patients with Colorectal Cancer by Administration of Curcumin. *Cancer Investigation* **2011**, *29* (3), 208-213.
341. Hoensch, H.; Groh, B.; Edler, L.; Kirch, W., Prospective cohort comparison of flavonoid treatment in patients with resected colorectal cancer to prevent recurrence. *World J Gastroenterol* **2008**, *14* (14), 2187-2193.

342. Shanmugam, M. K.; Lee, J. H.; Chai, E. Z.; Kanchi, M. M.; Kar, S.; Arfuso, F.; Dharmarajan, A.; Kumar, A. P.; Ramar, P. S.; Looi, C. Y.; Mustafa, M. R.; Tergaonkar, V.; Bishayee, A.; Ahn, K. S.; Sethi, G., Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. *Semin Cancer Biol* **2016**, *40-41*, 35-47.
343. Lewandowska, H.; Kalinowska, M.; Lewandowski, W.; Stepkowski, T. M.; Brzoska, K., The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *J Nutr Biochem* **2016**, *32*, 1-19.
344. Khan, N.; Adhami, V. M.; Mukhtar, H., Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochem Pharmacol* **2008**, *76* (11), 1333-9.
345. Carocho, M.; Ferreira, I. C. F. R., The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2013**, *13*, 1236-1258.
346. Forbes-Hernandez, T. Y.; Giampieri, F.; Gasparrini, M.; Mazzoni, L.; Quiles, J. L.; Alvarez-Suarez, J. M.; Battino, M., The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: a focus on apoptotic mechanisms. *Food Chem Toxicol* **2014**, *68*, 154-82.
347. Link, A.; Balaguer, F.; Goel, A., Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* **2010**, *80* (12), 1771-92.
348. Yang, C. S.; Wang, H.; Li, G. X.; Yang, Z.; Guan, F.; Jin, H., Cancer prevention by tea: Evidence from laboratory studies. *Pharmacol Res* **2011**, *64* (2), 113-22.
349. Yang, C. S.; Wang, X.; Lu, G.; Picinich, S. C., Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9* (6), 429-39.
350. Beltz, L. A.; Bayer, D. K.; Moss, A. L.; Simet, I. M., Mechanisms of Cancer Prevention by Green and Black Tea Polyphenols. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2006**, *6* (5), 389-406.
351. Peng, G.; Dixon, D. A.; Muga, S. J.; Smith, T. J.; Wargovich, M. J., Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. *Mol Carcinog* **2006**, *45* (5), 309-19.
352. Hwang, J. T.; Ha, J.; Park, I. J.; Lee, S. K.; Baik, H. W.; Kim, Y. M.; Park, O. J., Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett* **2007**, *247* (1), 115-21.
353. Orner, G. A.; Dashwood, W. M.; Blum, C. A.; Diaz, G. D.; Li, Q.; Dashwood, R., Suppression of tumorigenesis in the Apcmin mouse down-regulation regulation of  $\beta$ -catenin signaling by a combination of tea plus sulindac. *Carcinogenesis* **2003**, *24*, 263-267.
354. Xiao, H.; Hao, X.; Simi, B.; Ju, J.; Jiang, H.; Reddy, B. S.; Yang, C. S., Green tea polyphenols inhibit colorectal aberrant crypt foci (ACF) formation and prevent oncogenic changes in dysplastic ACF in azoxymethane-treated F344 rats. *Carcinogenesis* **2008**, *29* (1), 113-9.
355. Hao, X.; Xiao, H.; Ju, J.; Lee, M. J.; Lambert, J. D.; Yang, C. S., Green Tea Polyphenols Inhibit Colorectal Tumorigenesis in Azoxymethane-Treated F344 Rats. *Nutr Cancer* **2017**, *69* (4), 623-631.
356. Hao, X.; Bose, M.; Lambert, J. D.; Ju, J.; Lu, G.; Lee, M.-J.; Park, S. C.; Husain, A.; Sun, Y.; Yang, C. S., Inhibition of Intestinal Tumorigenesis in ApcMin/+ Mice by Green Tea Polyphenols (Polyphenon E) and Individual Catechins. *NUTRITION AND CANCER* **2007**, *59* (1), 62-69.
357. Dong, Z.; Ma, W.; Huang, C.; Yang, C. S., Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate, and theaflavins. *Cancer Res* **1997**, *57* (19), 4414-9.
358. Moretti, M.; Bennett, J.; Tornatore, L.; Thotakura, A. K.; Franzoso, G., Cancer: NF-kappaB regulates energy metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* **2012**, *44* (12), 2238-43.
359. Tornatore, L.; Thotakura, A. K.; Bennett, J.; Moretti, M.; Franzoso, G., The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol* **2012**, *22* (11), 557-66.
360. Baker, R. G.; Hayden, M. S.; Ghosh, S., NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* **2011**, *13* (1), 11-22.
361. Oz, H. S.; Ebersole, J. L., Green Tea Polyphenols Mediated Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells by a Fadd-Dependent Pathway. *J Cancer Ther* **2010**, *1* (3), 105-113.



362. Cerezo-Guisado, M. I.; Zur, R.; Lorenzo, M. J.; Risco, A.; Martin-Serrano, M. A.; Alvarez-Barrientos, A.; Cuenda, A.; Centeno, F., Implication of Akt, ERK1/2 and alternative p38MAPK signalling pathways in human colon cancer cell apoptosis induced by green tea EGCG. *Food Chem Toxicol* **2015**, *84*, 125-32.
363. Saldanha, S. N.; Kala, R.; Tollefsbol, T. O., Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechin gallate and sodium butyrate. *Exp Cell Res* **2014**, *324* (1), 40-53.
364. Huang, Y.; Li, W.; Su, Z. Y.; Kong, A. N., The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem* **2015**, *26* (12), 1401-13.
365. Zhang, Q.; Tang, X.; Lu, Q.; Zhang, Z.; Rao, J.; Le, A. D., Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1 $\alpha$  protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther* **2006**, *5* (5), 1227-38.
366. Choy, Y. Y.; Fraga, M.; Mackenzie, G. G.; Waterhouse, A. L.; Cremonini, E.; Oteiza, P. I., The PI3K/Akt pathway is involved in procyanidin-mediated suppression of human colorectal cancer cell growth. *Mol Carcinog* **2016**, *55* (12), 2196-2209.
367. Gorlach, S.; Wagner, W.; Podsedek, A.; Szewczyk, K.; Koziółkiewicz, M.; Dastyk, J., Procyanidins From Japanese Quince (*Chaenomeles Japonica*) Fruit Induce Apoptosis in Human Colon Cancer Caco-2 Cells in a Degree of Polymerization-Dependent Manner. *Nutrition and Cancer* **2011**, *63* (8), 1348-1360.
368. Zhang, H.; Zhang, M.; Yu, L.; Zhao, Y.; He, N.; Yang, X., Antitumor activities of quercetin and quercetin-5',8'-disulfonate in human colon and breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* **2012**, *50* (5), 1589-99.
369. Yoshida, T.; Konishi, M.; Horinaka, M.; Yasuda, T.; Goda, A. E.; Taniguchi, H.; Yano, K.; Wakada, M.; Sakai, T., Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *375* (1), 129-33.
370. Li, W.; Du, B.; Wang, T.; Wang, S.; Zhang, J., Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via the Ataxia-Telangiectasia Mutated-p53 pathway with the involvement of p53 Upregulated Modulator of Apoptosis. *Chem Biol Interact* **2009**, *177* (2), 121-7.
371. Lee, H. S.; Cho, H. J.; Yu, R.; Lee, K. W.; Chun, H. S.; Park, J. H., Mechanisms underlying apoptosis-inducing effects of Kaempferol in HT-29 human colon cancer cells. *Int J Mol Sci* **2014**, *15* (2), 2722-37.
372. Li, X.; Wang, J. N.; Huang, J. M.; Xiong, X. K.; Chen, M. F.; Ong, C. N.; Shen, H. M.; Yang, X. F., Chrysin promotes tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis in human cancer cell lines. *Toxicol In Vitro* **2011**, *25* (3), 630-5.
373. Lee, Y. K.; Hwang, J. T.; Kwon, D. Y.; Surh, Y. J.; Park, O. J., Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK $\alpha$ 1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Lett* **2010**, *292* (2), 228-36.
374. Li, C.; Yang, X.; Chen, C.; Cai, S.; Hu, J., Isorhamnetin suppresses colon cancer cell growth through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Mol Med Rep* **2014**, *9* (3), 935-40.
375. Dihal, A. A.; Woutersen, R. A.; van Ommen, B.; Rietjens, I. M.; Stierum, R. H., Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colorectal cell line Caco-2. *Cancer Lett* **2006**, *238* (2), 248-59.
376. Gee, J. M.; Hara, H.; Johnson, I. T., Suppression of Intestinal Crypt Cell Proliferation and Aberrant Crypt Foci by Dietary Quercetin in Rats. *NUTRITION AND CANCER* **2002**, *43* (2), 193-201.
377. Saud, S. M.; Young, M. R.; Jones-Hall, Y. L.; Ileva, L.; Ebuomwan, M. O.; Wise, J.; Colburn, N. H.; Kim, Y. S.; Bobe, G., Chemopreventive activity of plant flavonoid isorhamnetin in colorectal cancer is mediated by oncogenic Src and beta-catenin. *Cancer Res* **2013**, *73* (17), 5473-84.
378. Qin, J.; Teng, J.; Zhu, Z.; Chen, J.; Huang, W. J., Genistein induces activation of the mitochondrial apoptosis pathway by inhibiting phosphorylation of Akt in colorectal cancer cells. *Pharm Biol* **2016**, *54* (1), 74-9.

379. Xiao, X.; Liu, Z.; Wang, R.; Wang, J.; Zhang, S.; Cai, X.; Wu, K.; Bergan, R. C.; Xu, L.; Fan, D., Genistein suppresses FLT4 and inhibits human colorectal cancer metastasis. *Oncotarget* **2015**, *6*, 3225-3229.
380. Lepri, S. R.; Zanelatto, L. C.; da Silva, P. B. G.; Sartori, D.; Ribeiro, L. R.; Mantovani, M. S., The effects of genistein and daidzein on cell proliferation kinetics in HT29 colon cancer cells: the expression of CTNNBIP1 ( $\beta$ -catenin), APC (adenomatous polyposis coli) and BIRC5 (survivin). *Human Cell* **2014**, *27* (2), 78-84.
381. Pampaloni, B.; Palmini, G.; Mavilia, C.; Zonefrati, R.; Tanini, A.; Brandi, M. L., In vitro effects of polyphenols on colorectal cancer cells. *World J Gastrointest Oncol* **2014**, *6* (8), 289-300.
382. Song, H. M.; Park, G. H.; Eo, H. J.; Jeong, J. B., Naringenin-Mediated ATF3 Expression Contributes to Apoptosis in Human Colon Cancer. *Biomol Ther (Seoul)* **2016**, *24* (2), 140-6.
383. Aranganathan, S.; Nalini, N., Antiproliferative efficacy of hesperetin (citrus flavanoid) in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Phytother Res* **2013**, *27* (7), 999-1005.
384. Subramanian, A. P.; Jaganathan, S. K.; Mandal, M.; Supriyanto, E.; Muhamad, I., Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World J Gastroenterol* **2016**, *22* (15), 3952-61.
385. Jaganathan, S. K., Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. *ScientificWorldJournal* **2012**, *2012*, 372345.
386. Miki, H.; Uehara, N.; Kimura, A.; Sasaki, T.; Yuri, T.; Yoshizawa, K.; Tsubura, A., Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int J Oncol* **2012**, *40* (4), 1020-8.
387. Colin, D. J.; Limagne, E.; Ragot, K.; Lizard, G.; Ghiringhelli, F.; Solary, E.; Chauffert, B.; Latruffe, N.; Delmas, D., The role of reactive oxygen species and subsequent DNA-damage response in the emergence of resistance towards resveratrol in colon cancer models. *Cell Death Dis* **2014**, *5*, e1533.
388. Demoulin, B.; Hermant, M.; Castrogiovanni, C.; Staudt, C.; Dumont, P., Resveratrol induces DNA damage in colon cancer cells by poisoning topoisomerase II and activates the ATM kinase to trigger p53-dependent apoptosis. *Toxicol In Vitro* **2015**, *29* (5), 1156-65.
389. Lin, S. T.; Tu, S. H.; Yang, P. S.; Hsu, S. P.; Lee, W. H.; Ho, C. T.; Wu, C. H.; Lai, Y. H.; Chen, M. Y.; Chen, L. C., Apple Polyphenol Phloretin Inhibits Colorectal Cancer Cell Growth via Inhibition of the Type 2 Glucose Transporter and Activation of p53-Mediated Signaling. *J Agric Food Chem* **2016**, *64* (36), 6826-37.
390. Mojzer, E. B.; Hrcic, M. K.; Skerget, M.; Knez, Z.; Bren, U., Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **2016**, *21* (7).
391. Gleichenhagen, M.; Schieber, A., Current challenges in polyphenol analytical chemistry. *Current Opinion in Food Science* **2016**, *7*, 43-49.
392. Ding, Y.; Peng, M.; Zhang, T.; Tao, J. S.; Cai, Z. Z.; Zhang, Y., Quantification of conjugated metabolites of drugs in biological matrices after the hydrolysis with beta-glucuronidase and sulfatase: a review of bio-analytical methods. *Biomed Chromatogr* **2013**, *27* (10), 1280-95.
393. Saha, S.; Hollands, W.; Needs, P. W.; Ostertag, L. M.; de Roos, B.; Duthie, G. G.; Kroon, P. A., Human O-sulfated metabolites of (-)-epicatechin and methyl(-)-epicatechin are poor substrates for commercial aryl-sulfatases: implications for studies concerned with quantifying epicatechin bioavailability. *Pharmacol Res* **2012**, *65* (6), 592-602.
394. Grun, C. H.; van Dorsten, F. A.; Jacobs, D. M.; Le Belleguic, M.; van Velzen, E. J. J.; Bingham, M. O.; Janssen, H. G.; van Duynhoven, J. P. M., GC-MS methods for metabolic profiling of microbial fermentation products of dietary polyphenols in human and in vitro intervention studies. *Journal of Chromatography B* **2008**, *871* (2), 212-219.
395. Kole, P. L.; Venkatesh, G.; Kotecha, J.; Sheshala, R., Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed Chromatogr* **2011**, *25* (1-2), 199-217.
396. Bylda, C.; Thiele, R.; Kobold, U.; Volmer, D. A., Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst* **2014**, *139* (10), 2265-76.

397. Koole, A.; Bosman, J.; Franke, J. P.; de Zeeuw, R. A., Multiresidue analysis of beta(2)-agonists in human and calf urine using multimodal solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* **1999**, *726* (1-2), 149-156.
398. Craig, A., LC-MS Ionization Effect from Solid Phase Extraction Extractables. *The Reporter* **2006**, *26* (5), 7-9.
399. Souza-Silva, É. A.; Reyes-Garcés, N.; Gómez-Ríos, G. A.; Boyacı, E.; Bojko, B.; Pawliszyn, J., A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *71*, 249-264.
400. Lee, A. H.; Tan, L.; Hiramatsu, N.; Ishisaka, A.; Alfonso, H.; Tanaka, A.; Uemura, N.; Fujiwara, Y.; Takechi, R., Plasma concentrations of coffee polyphenols and plasma biomarkers of diabetes risk in healthy Japanese women. *Nutr Diabetes* **2016**, *6*, e212.
401. Prasain, J. K.; Arabshahi, A.; Moore, D. R., 2nd; Greendale, G. A.; Wyss, J. M.; Barnes, S., Simultaneous determination of 11 phytoestrogens in human serum using a 2 min liquid chromatography/tandem mass spectrometry method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2010**, *878* (13-14), 994-1002.
402. Wyns, C.; Bolca, S.; De Keukeleire, D.; Heyerick, A., Development of a high-throughput LC/APCI-MS method for the determination of thirteen phytoestrogens including gut microbial metabolites in human urine and serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2010**, *878* (13-14), 949-56.
403. Prasain, J. K.; Peng, N.; Dai, Y.; Moore, R.; Arabshahi, A.; Wilson, L.; Barnes, S.; Michael Wyss, J.; Kim, H.; Watts, R. L., Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. *Phytomedicine* **2009**, *16* (2-3), 233-43.
404. Marmet, C.; Actis-Goretta, L.; Renouf, M.; Giuffrida, F., Quantification of phenolic acids and their methylates, glucuronides, sulfates and lactones metabolites in human plasma by LC-MS/MS after oral ingestion of soluble coffee. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *88*, 617-25.
405. Magiera, S.; Baranowska, I.; Kusa, J., Development and validation of UHPLC-ESI-MS/MS method for the determination of selected cardiovascular drugs, polyphenols and their metabolites in human urine. *Talanta* **2012**, *89*, 47-56.
406. Gao, S.; Zhan, Q.; Li, J.; Yang, Q.; Li, X.; Chen, W.; Sun, L., LC-MS/MS method for the simultaneous determination of ethyl gallate and its major metabolite in rat plasma. *Biomed Chromatogr* **2010**, *24* (5), 472-8.
407. Teunissen, S. F.; Rosing, H.; Koornstra, R. H.; Linn, S. C.; Schellens, J. H.; Schinkel, A. H.; Beijnen, J. H., Development and validation of a quantitative assay for the analysis of tamoxifen with its four main metabolites and the flavonoids daidzein, genistein and glycitein in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2009**, *877* (24), 2519-29.
408. Guy, P. A.; Renouf, M.; Barron, D.; Cavin, C.; Dionisi, F.; Kochhar, S.; Rezzi, S.; Williamson, G.; Steiling, H., Quantitative analysis of plasma caffeic and ferulic acid equivalents by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2009**, *877* (31), 3965-74.
409. Norskov, N. P.; Kyro, C.; Olsen, A.; Tjonneland, A.; Knudsen, K. E., High-Throughput LC-MS/MS Method for Direct Quantification of Glucuronidated, Sulfated, and Free Enterolactone in Human Plasma. *J Proteome Res* **2016**, *15* (3), 1051-8.
410. Norskov, N. P.; Olsen, A.; Tjonneland, A.; Bolvig, A. K.; Laerke, H. N.; Knudsen, K. E., Targeted LC-MS/MS Method for the Quantitation of Plant Lignans and Enterolignans in Biofluids from Humans and Pigs. *J Agric Food Chem* **2015**, *63* (27), 6283-92.
411. Palma-Duran, S. A.; Caire-Juvera, G.; Robles-Burgeno Mdel, R.; Ortega-Velez, M. I.; Gutierrez-Coronado Mde, L.; Almada Mdel, C.; Chavez-Suarez, K.; Campa-Siqueiros, M.; Grajeda-Cota, P.; Saucedo-Tamayo Mdel, S.; Valenzuela-Quintanar, A. I., Serum levels of phytoestrogens as

- biomarkers of intake in Mexican women. *International journal of food sciences and nutrition* **2015**, *66* (7), 819-25.
412. de Ferrars, R. M.; Czank, C.; Saha, S.; Needs, P. W.; Zhang, Q.; Raheem, K. S.; Botting, N. P.; Kroon, P. A.; Kay, C. D., Methods for isolating, identifying, and quantifying anthocyanin metabolites in clinical samples. *Anal Chem* **2014**, *86* (20), 10052-8.
413. de Oliveira, D. M.; Pinto, C. B.; Sampaio, G. R.; Yonekura, L.; Catharino, R. R.; Bastos, D. H., Development and validation of methods for the extraction of phenolic acids from plasma, urine, and liver and analysis by UPLC-MS. *J Agric Food Chem* **2013**, *61* (25), 6113-21.
414. Martinez-Huelamo, M.; Tulipani, S.; Torrado, X.; Estruch, R.; Lamuela-Raventos, R. M., Validation of a New LC-MS/MS Method for the Detection and Quantification of Phenolic Metabolites from Tomato Sauce in Biological Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60* (18), 4542-4549.
415. Baranowska, I.; Hejniak, J.; Magiera, S., Development and validation of a RP-UHPLC-ESI-MS/MS method for the chiral separation and determination of flavanone, naringenin and hesperetin enantiomers. *Talanta* **2016**, *159*, 181-8.
416. Urpi-Sarda, M.; Monagas, M.; Khan, N.; Llorach, R.; Ma Lamuela-Raventos, R.; Jauregui, O.; Estruch, R.; Izquierdo-Pulido, M.; Andres-Lacueva, C., Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (43), 7258-7267.
417. Serra, A.; Macia, A.; Romero, M. P.; Salvado, M. J.; Bustos, M.; Fernandez-Larrea, J.; Motilva, M. J., Determination of procyanidins and their metabolites in plasma samples by improved liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2009**, *877* (11-12), 1169-76.
418. Feliciano, R. P.; Mecha, E.; Bronze, M. R.; Rodriguez-Mateos, A., Development and validation of a high-throughput micro solid-phase extraction method coupled with ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid identification and quantification of phenolic metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr A* **2016**, *1464*, 21-31.
419. Orozco-Solano, M. I.; Ferreira-Vera, C.; Priego-Capote, F.; Luque de Castro, M. D., Automated method for determination of olive oil phenols and metabolites in human plasma and application in intervention studies. *J Chromatogr A* **2012**, *1258*, 108-16.
420. Milder, I. E.; Kuijsten, A.; Arts, I. C. W.; Feskens, E. J. M.; Kampman, E.; Hollman, P. C. H.; Van 't Veer, P., Relation between Plasma Enterodiols and Enterolactone and Dietary Intake of Lignans in a Dutch Endoscopy-Based Population. *J Nutr* **2007**, *137*, 1266-1271.
421. Kuijsten, A.; Buijsman, M. N.; Arts, I. C.; Mulder, P. P.; Hollman, P. C., A validated method for the quantification of enterodiols and enterolactone in plasma using isotope dilution liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2005**, *822* (1-2), 178-84.
422. Cao, J.; Zhang, Y.; Chen, W.; Zhao, X., The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr* **2010**, *103* (2), 249-55.
423. Zhang, Y.; Cao, J.; Chen, W.; Yang, J.; Hao, D.; Zhang, Y.; Chang, P.; Zhao, X., Reproducibility and relative validity of a food frequency questionnaire to assess intake of dietary flavonol and flavone in Chinese university campus population. *Nutr Res* **2010**, *30* (8), 520-6.
424. Stobiecki, M.; Kachlicki, P., Isolation and Identification of Flavonoids. In *The Science of Flavonoids*, Grotewold, E., Ed. Springer New York: New York, NY, 2006; pp 47-69.
425. Lucci, P.; Saurina, J.; Núñez, O., Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2017**, *88*, 1-24.
426. Stylos, E.; Chatziathanasiadou, M. V.; Syriopoulou, A.; Tzakos, A. G., Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based bioavailability determination of the major classes of phytochemicals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2017**, *1047*, 15-38.

427. Bronsema, K. J.; Bischoff, R.; van de Merbel, N. C., Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2012**, *893-894*, 1-14.
428. Fekete, S.; Schappler, J.; Veuthey, J.-L.; Guillarme, D., Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *63*, 2-13.
429. Fekete, S.; Veuthey, J. L.; Guillarme, D., Comparison of the most recent chromatographic approaches applied for fast and high resolution separations: Theory and practice. *J Chromatogr A* **2015**, *1408*, 1-14.
430. Fekete, S.; Kohler, I.; Rudaz, S.; Guillarme, D., Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal* **2014**, *87*, 105-19.
431. Kitteringham, N. R.; Jenkins, R. E.; Lane, C. S.; Elliott, V. L.; Park, B. K., Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2009**, *877* (13), 1229-39.
432. Ramanathan, R.; Jemal, M.; Ramagiri, S.; Xia, Y. Q.; Humpreys, W. G.; Olah, T.; Korfmacher, W. A., It is time for a paradigm shift in drug discovery bioanalysis: from SRM to HRMS. *J Mass Spectrom* **2011**, *46* (6), 595-601.
433. Nie, Y.; Liu, X.; Yang, X.; Zhao, Z., Review: Recent application of chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for enantiomeric pharmaceutical and biomedical determinations. *J Chromatogr Sci* **2013**, *51* (8), 753-63.
434. Hooper, L. K., P. A.; Rimm, E. B.; Cohn, J. S.; Harvey, I.; Le Cornu, K. A.; Ryder, J. J.; Hall, W. L.; Cassidy, Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 38-50.
435. Kim, J.; Kim, H. J.; Joung, H.; Park, M. K.; Li, S.; Song, Y.; Franke, A. A.; Paik, H. Y., Overnight urinary excretion of isoflavones as an indicator for dietary isoflavone intake in Korean girls of pubertal age. *Br J Nutr* **2010**, *104* (5), 709-15.
436. Bohn, T., Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr Rev* **2014**, *72* (7), 429-52.
437. Verkasalo, P. K.; Appleby, P. N.; Allen, N. E.; Davey, G.; Adlercreutz, H.; Key, T. J., Soya intake and plasma concentrations of daidzein and genistein: validity of dietary assessment among eighty British women (Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition). *British Journal of Nutrition* **2001**, *86* (03), 415.
438. Riboli, E.; Hunt, K. J.; Slimani, N.; Ferrari, P.; Norat, T.; Fahey, M.; Charrondiere, U. R.; Hemon, B.; Casagrande, C.; Vignat, J.; Overvad, K.; Tjonneland, A.; Clavel-Chapelon, F.; Thiebaut, A.; Wahrendorf, J.; Boeing, H.; Trichopoulos, D.; Trichopoulou, A.; Vineis, P.; Palli, D.; Bueno-De-Mesquita, H. B.; Peeters, P. H.; Lund, E.; Engeset, D.; Gonzalez, C. A.; Barricarte, A.; Berglund, G.; Hallmans, G.; Day, N. E.; Key, T. J.; Kaaks, R.; Saracci, R., European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr* **2002**, *5* (6B), 1113-24.
439. Ward, H.; Chapelais, G.; Kuhnle, G. G. C.; Luben, R.; Khaw, K.-T.; Bingham, S., Lack of Prospective Associations between Plasma and Urinary Phytoestrogens and Risk of Prostate or Colorectal Cancer in the European Prospective into Cancer-Norfolk Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2008**, *17* (10), 2891-2894.
440. Urpi-Sarda, M.; Monagas, M.; Khan, N.; Llorach, R.; Lamuela-Raventos, R. M.; Jauregui, O.; Estruch, R.; Izquierdo-Pulido, M.; Andres-Lacueva, C., Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2009**, *1216* (43), 7258-67.
441. Feliciano, R. P.; Boeres, A.; Massacessi, L.; Istas, G.; Ventura, M. R.; Nunes Dos Santos, C.; Heiss, C.; Rodriguez-Mateos, A., Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols. *Arch Biochem Biophys* **2016**, *599*, 31-41.
442. Baranowska, I.; Magiera, S., Analysis of isoflavones and flavonoids in human urine by UHPLC. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *399*, 3211-3219.

443. Gasperotti, M.; Masuero, D.; Guella, G.; Mattivi, F.; Vrhovsek, U., Development of a targeted method for twenty-three metabolites related to polyphenol gut microbial metabolism in biological samples, using SPE and UHPLC-ESI-MS/MS. *Talanta* **2014**, *128*, 221-30.
444. Magiera, S.; Uhlschmied, C.; Rainer, M.; Huck Ch, W.; Baranowska, I.; Bonn, G. K., GC-MS method for the simultaneous determination of beta-blockers, flavonoids, isoflavones and their metabolites in human urine. *J Pharm Biomed Anal* **2011**, *56* (1), 93-102.
445. Lara-Guzmán, O. J.; Álvarez-Quintero, R.; Osorio, E.; Naranjo-Cano, M.; Muñoz-Durango, K., GC/MS method to quantify bioavailable phenolic compounds and antioxidant capacity determination of plasma after acute coffee consumption in human volunteers. *Food Research International* **2016**, *89*, 219-226.
446. Gros, C.; Laboues, B., Study of the Dansylation Reaction of Amino Acids, Peptides and Proteins. *European J. Biochem.* **1969**, *7*, 463-470.
447. Tapuhi, Y.; Schmidt, D. E.; Lindner, W.; Karger, B. L., Dansylation of amino-acids for High-performance liquid chromatography analysis. *Analytical Biochemistry* **1980**, *115*, 123-129.
448. Bartzatt, R., Dansylation of aromatic, aliphatic, and medicinal carboxylic acid compounds in 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer. *Analytica Chimica Acta* **2003**, *488* (2), 203-209.
449. Tang, Z.; Guengerich, F. P., Dansylation of unactivated alcohols for improved mass spectral sensitivity and application to analysis of cytochrome P450 oxidation products in tissue extracts. *Anal Chem* **2010**, *82* (18), 7706-12.
450. Grace, P. B.; Teale, P., Purification of the crude solution from *Helix pomatia* for use as beta-glucuronidase and aryl sulfatase in phytoestrogen assays. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2006**, *832* (1), 158-61.
451. Leveques, A.; Actis-Goretta, L.; Rein, M. J.; Williamson, G.; Dionisi, F.; Giuffrida, F., UPLC-MS/MS quantification of total hesperetin and hesperetin enantiomers in biological matrices. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *57*, 1-6.
452. Hakkinen, S. H.; Torronen, A. R., Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 517-524.
453. Goodrich, K. M.; Neilson, A. P., Simultaneous UPLC-MS/MS analysis of native catechins and procyanidins and their microbial metabolites in intestinal contents and tissues of male Wistar Furth inbred rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2014**, *958*, 63-74.
454. Nunez-Sanchez, M. A.; Garcia-Villalba, R.; Monedero-Saiz, T.; Garcia-Talavera, N. V.; Gomez-Sanchez, M. B.; Sanchez-Alvarez, C.; Garcia-Albert, A. M.; Rodriguez-Gil, F. J.; Ruiz-Marin, M.; Pastor-Quirante, F. A.; Martinez-Diaz, F.; Yanez-Gascon, M. J.; Gonzalez-Sarrias, A.; Tomas-Barberan, F. A.; Espin, J. C., Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Mol Nutr Food Res* **2014**, *58* (6), 1199-211.
455. Grace, P. B.; Taylor, J. I.; Botting, N. P.; Fryatt, T.; Oldfield, M. F.; Al-Maharik, N.; Bingham, S. A., Quantification of isoflavones and lignans in serum using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, *17* (12), 1350-7.
456. Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M., Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* **2003**, *75*, 3019-3030.
457. Pastor, A.; Rodriguez-Morato, J.; Olesti, E.; Pujadas, M.; Perez-Mana, C.; Khymenets, O.; Fito, M.; Covas, M. I.; Sola, R.; Motilva, M. J.; Farre, M.; de la Torre, R., Analysis of free hydroxytyrosol in human plasma following the administration of olive oil. *J Chromatogr A* **2016**, *1437*, 183-90.
458. Norskov, N. P.; Knudsen, K. E., Validated LC-MS/MS Method for the Quantification of Free and Bound Lignans in Cereal-Based Diets and Feces. *J Agric Food Chem* **2016**, *64* (44), 8343-8351.
459. Muzzio, M.; Huang, Z.; Hu, S. C.; Johnson, W. D.; McCormick, D. L.; Kapetanovic, I. M., Determination of resveratrol and its sulfate and glucuronide metabolites in plasma by LC-MS/MS and their pharmacokinetics in dogs. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *59*, 201-8.

460. Frankenfeld, C. L.; Patterson, R. E.; Horner, N. K.; Neuhouser, M. L.; Skor, H. E.; Kalhorn, T. F.; Howald, W. N.; Lampe, J. W., Validation of a soy food-frequency questionnaire and evaluation of correlates of plasma isoflavone concentrations in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **2003**, *77*, 674-80.
461. Serra, A.; Macia, A.; Romero, M. P.; Valls, J.; Blade, C.; Arola, L.; Motilva, M. J., Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in in vitro and in vivo models. *Br J Nutr* **2010**, *103* (7), 944-52.
462. Sano, A.; Yamakoshi, J.; Tokutake, S.; Tobe, K.; Kubota, Y.; Kikuchi, M., Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci Biotechnol Biochem* **2003**, *67* (5), 1140-3.
463. Holt, R. R.; Lazarus, S. A.; Sullards, M. C.; Zhu, Q. Y.; Schramm, D. D.; Hammerstone, G. F.; Fraga, C. G.; Schmitz, H. H.; Keen, C. L., Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr* **2002**, *76*, 798-804.
464. Baba, S.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Terao, J., ABSORPTION AND URINARY EXCRETION OF PROCYANIDIN B2 [EPICATECHIN-(4-8)-EPICATECHIN] IN RATS. *Free Radical Biology & Medicine* **2002**, *33*, 142-148.
465. Perez-Jimenez, J.; Hubert, J.; Hooper, L.; Cassidy, A.; Manach, C.; Williamson, G.; Scalbert, A., Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr* **2010**, *92* (4), 801-9.
466. Akhter, M.; Inoue, M.; Kurahashi, N.; Iwasaki, M.; Sasazuki, S.; Tsugane, S.; Japan Public Health Center-Based Prospective Study, G., Dietary soy and isoflavone intake and risk of colorectal cancer in the Japan public health center-based prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2008**, *17* (8), 2128-35.
467. Schleipen, B.; Hertrampf, T.; Fritzscheier, K. H.; Kluxen, F. M.; Lorenz, A.; Molzberger, A.; Velders, M.; Diel, P., ERbeta-specific agonists and genistein inhibit proliferation and induce apoptosis in the large and small intestine. *Carcinogenesis* **2011**, *32* (11), 1675-83.
468. Setchell, K. D. R.; Brown, N. M.; Lydeking-Olsen, E., The Clinical Importance of the Metabolite Equol—A Clue to the Effectiveness of Soy and Its Isoflavone. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3577-3584.
469. Hullar, M. A.; Burnett-Hartman, A. N.; Lampe, J. W., Gut microbes, diet, and cancer. *Cancer Treat Res* **2014**, *159*, 377-99.
470. Kasai, C.; Sugimoto, K.; Moritani, I.; Tanaka, J.; Oya, Y.; Inoue, H.; Tameda, M.; Shiraki, K.; Ito, M.; Takei, Y.; Takase, K., Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: Terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing analyses. *Oncology Reports* **2016**, *35* (1), 325-333.
471. Okuda, S.; Yamada, T.; Hamajima, M.; Itoh, M.; Katayama, T.; Bork, P.; Goto, S.; Kanehisa, M., KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways. *Nucleic Acids Research* **2008**, *36* (Web Server issue), W423-W426.
472. Goldstein, D. S.; Eisenhofer, G.; Kopin, I. J., Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**, *305* (3), 800-11.
473. Combet, E.; Lean, M. E.; Boyle, J. G.; Crozier, A.; Davidson, D. F., Dietary flavonols contribute to false-positive elevation of homovanillic acid, a marker of catecholamine-secreting tumors. *Clin Chim Acta* **2011**, *412* (1-2), 165-9.
474. Biasutto, L.; Marotta, E.; Garbisa, S.; Zoratti, M.; Paradisi, C., Determination of quercetin and resveratrol in whole blood—implications for bioavailability studies. *Molecules* **2010**, *15* (9), 6570-9.
475. Fiorani, M.; Accorsi, A., Dietary flavonoids as intracellular substrates for an erythrocyte trans-plasma membrane oxidoreductase activity. *British Journal of Nutrition* **2007**, *94* (03), 338.
476. Fiorani, M.; Accorsi, A.; Cantoni, O., Human Red Blood Cells as A Natural Flavonoid Reservoir. *Free Radical Research* **2009**, *37* (12), 1331-1338.
477. Fiorani, M.; Guidarelli, A.; Blasa, M.; Azzolini, C.; Candiracci, M.; Piatti, E.; Cantoni, O., Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and

release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid. *J Nutr Biochem* **2010**, *21* (5), 397-404.

478. Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J.; Santos-Buelga, C., The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *J Sci Food Agric* **2012**, *92* (9), 1822-5.

479. Bartholome, R.; Haenen, G. R. M. M.; Hollman, P. C. H.; Bast, A.; Dagniele, P. C.; Roos, D.; Keijer, J.; Kroon, P. A.; Needs, P. W.; Arts, I. C. W., Deconjugation Kinetics of Glucuronidated Phase II Flavonoid Metabolites by b-glucuronidase from Neutrophils. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2010**, *25*, 379-387.