HAL
open science

Impact respiratoire des systèmes électroniques de délivrance de nicotine

Romain Dusautoir

To cite this version:

Romain Dusautoir. Impact respiratoire des systèmes électroniques de délivrance de nicotine. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS049 . tel-03649687

HAL Id: tel-03649687

https://theses.hal.science/tel-03649687

Submitted on 22 Apr 2022

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.

Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

THÈSE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Soutenue publiquement par

Romain DUSAUTOIR

Le 27 janvier 2021

Impact respiratoire des systèmes électroniques de délivrance de nicotine

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

Composition du jury :

Présidente :	**Pr Delphine ALLORGE** PU-PH - Faculté de Pharmacie, Lille
Rapporteur(e)s :	**Dr Sophie LANONE** DR - INSERM, IMRB, Université Paris Est Créteil
	Pr Jérémie POURCHEZ Pr -ENS Mines de Saint-Étienne
Examinatrice :	**Dr Ghislaine LACROIX** IR - INERIS, Verneuil-en-Halatte
Directeurs de thèse :	**Dr Jean-Marc LO GUIDICE** CRCN - INSERM, Université de Lille
	Dr Sébastien ANTHÉRIEU MCF – Université de Lille

Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu Sophie Lanone, Jérémie Pourchez et Ghislaine Lacroix et Delphine Allorge d'avoir accepté d'être membres de mon jury et d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie aussi sincèrement les membres de mon comité de suivi de thèse, Sabine Le Gouvello, Corine Glineur et Jean-François Goossens, pour leurs conseils et leurs remarques.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur thèse, Jean-Marc Lo Guidice. Merci pour son accueil chaleureux dès mon arrivée en master 2, pour la confiance qu'il m'a accordé en me proposant ce sujet de thèse et pour sa disponibilité malgré son poste de directeur de l'équipe ULR4483. Merci pour les nombreuses discussions que nous avons eues et pour vos éclairages concernant mes questions incessantes, parfois existentielles, et qui m'ont aidé à aller au bout de ce travail.

Un grand merci à Sébastien Anthérieu, mon co-directeur de thèse, qui a su trouver du temps dans son emploi du temps pour être là aux bons moments et m'apporter ses précieux conseils. Merci pour ton aide précieuse dans la rédaction de cet article et pour ta rigueur scientifique qui nous auront permis de valoriser cette partie *vitro* au-delà de ce que j'espérais.

Je voudrais remercier Guillaume Garçon de m'avoir accueilli au sein de de son laboratoire de toxicologie à la faculté de pharmacie et de m'avoir permis d'effectuer quelques heures d'enseignements durant ma thèse, c'était très formateur et j'espère pouvoir réitérer cet exercice. Merci pour votre bonne humeur et vos conseils toujours bien placés.

J'aimerais également remercier Nadine Locoge et Marie Verrièle de m'avoir ouvert les portes de l'IMT de Douai et de leur laboratoire. Un grand merci particulier à Isabelle Fronval, sans qui la caractérisation chimique des émissions n'aurait pas été possible. Je suis arrivé ignorant, avec beaucoup d'incertitudes, mais son aide m'a permis de mieux appréhender cette discipline si particulière, merci.

La réalisation de ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans le travail de tous les collaborateurs. Alors je remercie Philippe GOSSET, et plus spécialement Gwenola Kervoaze de l'équipe INSERM U1019 de l'Institut Pasteur de Lille pour les expositions de

souris. Je remercie également Fabrice Nesslany et Anne Platel du laboratoire de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille pour les expérimentations de génotoxicité. Et merci à Nicolas Beauval de m'avoir formé sur le fonctionnement de la machine à fumer, d'avoir partagé ses connaissances sur le domaine de l'e-cig et pour avoir doser la nicotine.

Merci à l'Institut National du Cancer (contrat n°INCa_11505) et à l'Institut de Recherche en Santé Publique (contrat n°INCa_13648) d'avoir financé ces travaux de recherche. Et merci à l'Université de Lille et à l'École Doctorale Biologie-Santé de Lille de m'avoir alloué une bourse de thèse.

Un grand merci à Gianni Zarcone pour toute son aide durant ma thèse. Ça me fait bizarre de penser que tu as été stagiaire un jour tellement tu fais partie intégrante de l'équipe aujourd'hui. On en a passé des heures devant la machine à fumer et dans le bureau, à parler de tout et de rien, à corriger des fichiers Excel et des scripts R. Je te souhaite tout le courage et le bonheur pour ton projet de thèse.

J'en profite pour remercier les « nouveaux » membres du bureau, Emeline Barbier et Jessica Carpentier. Vous m'avez majoritairement connu stressé et occupé, mais c'était un plaisir de partager le bureau avec vous pendant cette dernière année de thèse.

Évidemment, que serait cette section de remerciement sans les « anciens membres du bureau », Jules Sotty et Corentin De Sousa. Les années folles comme on les appelle encore. Il me faudrait trop de mots pour tout raconter alors je vais faire au plus court. Djulo, l'acolyte doctorant, qui m'a montré le chemin à suivre, et Coco le support technique sur qui on peut tout le temps compter. Le cocktail émulation scientifique/ludique parfait. Merci d'avoir rendu ces années de thèses si agréables, sans vous, ce n'était pas pareil.

Un énorme merci à Jamila Boudjema pour sa bonne humeur en toute circonstance et pour toutes les viennoiseries qu'elle nous a apportées. Bon courage pour ta fin de thèse. Merci également à Céline Grare et Djamal Achour pour les nombreuses discussions pendant les manips, les repas, la muscu et j'en passe…

J'ai une pensée pour toutes les personnes que j'ai croisées et qui ont participé, de près ou de loin, au bon déroulement de cette thèse, professionnellement et personnellement : Salim Dekiouk, William Laine, Raeeka Khamari, Grégoire Savary, Cynthia Van Der Hauwaert, Edmone Dewaeles, Julie Lemaire, Yara Saleh, Benjamin Lima, Thomas Martinez

et j'en oublie sûrement… Evidemment, une pensée pour Anne Trinh qui m'a toujours poussé à faire une thèse, c'est peu grâce/à cause de toi que j'en suis là ! Merci à tous.

Je remercie mon père, ma mère et toute ma famille et belle-famille pour leur soutien sans faille tout au long de cette thèse. C'était rassurant de savoir que vous n'étiez jamais très loin. J'espère être à la hauteur de ce que vous m'avez apporté.

Merci à mes amis. Le temps a été une denrée très précieuse pendant cette thèse et ce n'était pas toujours facile de se voir régulièrement, surtout ces derniers mois avec l'ajout du facteur « confinement ». Tous les moments passés avec vous auront été précieux et importants pour moi, alors merci.

Enfin, merci à Louise. Ce n'est clairement pas évident de vivre avec un doctorant et son lot de deadlines, de doutes et de remises en question. Ces années de thèse auront aussi été synonymes d'épreuves et de sacrifices sur le plan personnel, mais tu as toujours été là. Pour ça, je te remercie autant que je te demande pardon. Je n'aurais pas pu surmonter ces obstacles sans ton soutien et ta présence. J'espère que la fin de ce projet de thèse sera aussi le début d'une nouvelle aventure ensemble. Je t'aime.

Valorisation scientifique des travaux

- **Article présenté dans le manuscrit :**

R Dusautoir, G Zarcone, M Verriele, G Garçon, I Fronval, N Beauval, D Allorge, V Riffault, N Locoge, J-M Lo-Guidice, S Anthérieu. *Comparison of the chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells.* Journal of Hazardous Materials, 2021, https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123417

- **Articles non présentés dans le manuscrit :**

N Beauval, M Verrièle, A Garat, I Fronval, R Dusautoir, S Anthérieu, G Garçon, J-M Lo-Guidice, D Allorge, N Locoge. *Influence of puffing conditions on the carbonyl composition of e-cigarette aerosols*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2019, https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.08.015

Y Saleh, S Antherieu, R Dusautoir, L Alleman, J Sotty, C De Sousa, A Platel, E Perdrix, V Riffault, I Fronval, F Nesslany, L Canivet, G Garçon, J-M Lo-Guidice. *Exposure to Atmospheric Ultrafine Particles Induces Severe Lung Inflammatory Response and Tissue Remodeling in Mice*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16071210

- **Communications :**

  – ***Orale :***

R Dusautoir, G Zarcone, M Verriele, G Garçon, I Fronval, N Beauval, D Allorge, V Riffault, N Locoge, J-M Lo-Guidice, S Anthérieu. *Impact respiratoire des systèmes électroniques de délivrance de nicotine.* Groupement d'Intérêt Scientifique REFERtab, 5 nov 2019, Hôpital Université de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

J-M Lo Guidice, Y Saleh, S Anthérieu, R Dusautoir, J Sotty, L Alleman, E Perdrix, P Dubot, A Platel, F Nesslany, G Garçon. *Impact pulmonaire de l'exposition chronique aux particules ultrafines (PUF) chez la souris.* 2ème Rencontre régionale Pollution Santé Longévité, 19 sept 2018, Lille, France.

Y Saleh, S Anthérieu, R Dusautoir, J Sotty, L Alleman, E Perdrix, P Dubot, A Platel, F Nesslany, G Garçon, J-M Lo-Guidice. *Etude de la pathogénicité pulmonaire de la pollution particulaire ultrafine. Expositions professionnelles ou environnementales et risques de*

cancer. Restitution du programme national de recherche environnement santé travail et du plan Cancer ; ANSES, 2 oct 2108, Paris, France.

- ***Affichées :***

R Dusautoir, G Zarcone, M Verriele, G Garçon, I Fronval, N Beauval, D Allorge, V Riffault, N Locoge, J-M Lo-Guidice, S Anthérieu. *Chemical characterization and in vitro toxicity of electronic cigarette and heated tobacco product emissions compared to conventional cigarette smoke. 15th* International Union of Toxicology, 15-18 juillet 2019, Hawaii, États-Unis.

R Dusautoir, G Zarcone, M Verriele, G Garçon, I Fronval, N Beauval, D Allorge, V Riffault, N Locoge, J-M Lo-Guidice, S Anthérieu. *Chemical characterization and in vitro toxicity of electronic cigarette and heated tobacco product emissions compared to conventional cigarette smoke.* Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie, 27-28 nov 2018, Lille, France.

R Dusautoir, G Zarcone, M Verriele, G Garçon, I Fronval, N Beauval, D Allorge, V Riffault, N Locoge, J-M Lo-Guidice, S Anthérieu. *Chemical characterization and in vitro toxicity of electronic cigarette and heated tobacco product emissions compared to conventional cigarette smoke.* 19ème Journée André Verbert, 10 sept 2019, Lille, France.

Y Saleh, S Anthérieu, L Alleman, R Dusautoir, A Platel, J Sotty, P Dubot, E Perdrix, F Nesslany, L Canivet, G Garçon, J-M Lo Guidice. *Étude de la pathogénicité pulmonaire de la pollution particulaire utlrafine.* Journée Interdisciplinaires de la Qualité de l'Air, 2-3 fév 2017, Villeneuve d'Ascq, France.

Y Saleh, S Anthérieu, R Dusautoir, J Sotty, L Alleman, L Canivet, E Perdrix, P Dubot, A Platel, F Nesslany, G Garçon, J-M Lo Guidice. *Murine pulmonary responses after sub-chronic exposure to environmental ultrafine particles.* 19th International Conferance on Air Pollution and Control, 25-26 mai 2017, Londres, Royaume-Uni.

Y Saleh, S Anthérieu, R Dusautoir, L Alleman, L Canivet, E Perdrix, J Sotty, C De Sousa, G Garçon, J-M Lo-Guidice. *Les particules ultrafines ont une toxicité pulmonaire plus importante que les particules fines chez la souris.* 2ème Journée de la recherche de la faculté de Pharmacie de Lille, 11 juil 2018, Lille, France.

Table des matières

ABRÉVIATIONS **5**

CONTEXTE **9**

INTRODUCTION **11**

1. LE TABAGISME 11
   1.1. Epidémiologie 11
   1.2. Pathologies associées au tabagisme 11
      1.2.1. Cancer du poumon 12
      1.2.2. La broncho-pneumopathie chronique obstructive 13
      1.2.3. Pathologies interstitielles 14
      1.2.4. Asthme 14
   1.3. Composition chimique du tabac et de la fumée de cigarette 14
   1.4. Mécanismes d'actions toxiques de la fumée de cigarette 19
      1.4.1. Vulnérabilité des voies respiratoires à la fumée de cigarette 19
      1.4.2. Inflammation et stress oxydant liés au tabac 21
      1.4.3. Altérations génétiques 23
      1.4.4. Altérations épigénétiques 27
   1.5. Les politiques de lutte contre le tabagisme 34
2. LES NOUVEAUX PRODUITS DE DELIVRANCE DE NICOTINE 36
   2.1. La cigarette électronique 36
      2.1.1. Epidémiologie du vapotage 36
      2.1.2. Cadre réglementaire de l'e-cig 37
      2.1.3. Principe de fonctionnement 38
      2.1.4. Les différents modèles 38
      2.1.5. Les e-liquides et leur composition 41
      2.1.6. Composition des aérosols d'e-cig 43
      2.1.7. Etats des connaissances sur la toxicité in vitro de l'e-cig 45
      2.1.8. Etats des connaissances sur la toxicité in vivo de l'e-cig 52
      2.1.9. Effets de l'e-cig sur la santé humaine 56
   2.2. Le tabac chauffé 58
      2.2.1. Généralités 58
      2.2.2. Principe de fonctionnement 59
      2.2.3. Composition des sticks d'iQOS 61
      2.2.4. Composition des aérosols d'iQOS 61
      2.2.5. Analyses toxicologiques de l'iQOS 62

2.2.6. Effets du tabac chauffé sur la santé humaine 66

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU PROJET DE THESE 71

MATERIELS ET METHODES 77

1. DISPOSITIFS UTILISES ET GENERATION DES AEROSOLS 77
1.1. Cigarettes 77
1.2. Cigarettes électroniques et e-liquide 77
1.3. Tabac chauffé 77
1.4. Génération des aérosols 78
2. CARACTERISATION CHIMIQUE DES AEROSOLS 79
2.1. Composés carbonylés 79
2.1.1. Collecte des aérosols 79
2.1.2. Analyse des composés carbonylés 80
2.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques 80
2.2.1. Collecte des aérosols 80
2.2.2. Analyse des HAP 81
2.3. Nicotine 82
3. EXPERIMENTATIONS *IN VITRO* 82
3.1. Modèle et méthode de culture cellulaire 82
3.2. Exposition des cellules 83
3.3. Analyse de la viabilité cellulaire 84
3.4. Mesure des médiateurs de l'inflammation 85
3.5. Analyse du glutathion 85
3.6. Extraction des ARN 86
3.7. Analyse de l'expression des gènes 86
3.8. Analyses statistiques 87
4. EXPERIMENTATIONS *IN VIVO* 87
4.1. Souris et design expérimental des expérimentations *in vivo* 87
4.2. Machine à fumer et modules d'exposition 88
4.3. Sacrifices et recueils des échantillons 89
4.4. Analyse de la génotoxicité 90
4.4.1. Test des comètes 90
4.4.2. Test des micronoyaux 90
4.4.3. Test du Pig-A 91
4.5. Extraction de l'ADN pulmonaire 91
4.6. Dosage de la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OHdG) pulmonaire 92
4.7. Analyse de la méthylation globale de l'ADN pulmonaire 92

4.8. Extraction protéique 92
4.9. Dosage de l'enzyme HDAC 92
4.10. Dosage de l'enzyme HAT 93
4.11. Extraction des ARN pulmonaires 93
4.12. MicroArrays 93
4.13. OpenArrays 94
4.14. Analyses statistiques 95

RESULTATS ET DISCUSSIONS 101

1. CARACTERISATION CHIMIQUE DES EMISSIONS D'E-CIG, DE TABAC CHAUFFE ET DE CIGARETTE 101
1.1. Températures des aérosols générés 101
1.2. Analyse de la nicotine 103
1.3. Analyse des composés carbonylés 103
1.4. Analyse des HAP 106
1.5. Normalisation par la quantité de nicotine 108
1.6. Discussion 110
2. COMPARAISON DE LA TOXICITE *IN VITRO* DES EMISSIONS D'E-CIG, DE TABAC CHAUFFE ET DE CIGARETTE 119
2.1. Mesure de la viabilité cellulaire 119
2.2. Analyse du stress oxydant 121
2.3. Analyse de l'expression de gènes du métabolisme et du stress oxydant 123
2.4. Analyse de l'inflammation 124
2.5. Analyse de la corrélation entre la composition des aérosols et la toxicité in vitro 126
2.6. Discussion 127
3. *ÉVALUATION DE LA TOXICITE PULMONAIRE DES EMISSIONS D'E-CIG ET DE CIGARETTE DANS UN MODELE DE SOURIS BALB/C* 135
3.1. Génotoxicité 136
3.1.1. Analyse des lésions oxydatives de l'ADN 136
3.1.2. Analyse des cassures simple et double brins de l'ADN (test des comètes) 137
3.1.3. Analyse des aberrations chromosomiques (test des micronoyaux) 138
3.1.4. Analyse des mutations géniques (test du Pig-A) 140
3.2. Modifications épigénétiques 141
3.2.1. Méthylation globale de l'ADN 141
3.2.2. Analyse de la modification des histones 142
3.2.3. Analyse des miARN 143
3.3. Analyses transcriptomiques 146

3.3.1. Expositions aiguës 146
3.3.2. Expositions chroniques de 3 et 6 mois 148
3.3.3. Analyses fonctionnelles des gènes dérégulés 152
3.4. Discussion 157

DISCUSSION GENERALE 171

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 177

BIBLIOGRAPHIE 181

ANNEXES 213

Abréviations

5-hmC	5-hydroxyméthyle-cytosine
8-OHdG	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine
ABC	ATP binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AFNOR	Association Française de Normalisation
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
AhRR	Aryl hydrocarbon Receptor Repressor
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Alimentaire
ApoE	Apolipoprotein E
ARN	Acide ribonucléique
ASE	Accelerated Solvant Extractor
ATP	Adénosine-triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
BPDE	Benzo[a]pyrène-diol-époxyde
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CO	Monoxyde de carbone
CO2	Dioxyde de carbone
COV	Composés Organiques Volatils
Ctrl	Contrôle
CYP	Cytochromes p450
DNMT	ADN méthyltransférases
DNPH	2,4-Dinitrophénylhydrazine
e-cig	Cigarette électronique
ED50	Dose efficace 50 %
EMX	Enzyme du métabolisme des xénobiotiques
ENU	N-nitroso-N-éthylurée
ERO	Espèces Réactives de L'oxygène
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FDA	Food and Drug Administration
FXR	Liver X receptor
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colony stimulating factor
GRAS	Generally Recognized As Safe
GRO-α	Growth-regulated alpha protein
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HAT	Histone acétylase
HCI	Health Canana Intense
HDAC	Histone désacétylase
HMOX1	Heme Oxygenase 1
HMT	Histone méthyltransférase
HTP	Tabac chauffé
IAL	Interface air-liquide
IFN-γ	Interferon-γ
IL-	Interleukine -
IMPECS	Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine
INCa	Institut National du Cancer

IPA	Ingenuity pathway analysis
JTI	Japan Tobacco International
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
Mb18W	Modèle Modbox réglé à la puissance 18W
Mb30W	Modèle Modbox réglé à la puissance 30W
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
miARN	MicroARN
MIP1-α	Macrophage Inflammatory Protein 1 α
MMP	Métalloprotéase matricielle
MMS	Méthanesulfonate de méthyle
MNPCE	Micronoyaux comptés dans les érythrocytes
N_2	Diazote
NCE	Nombre d'érythrocytes normochromatiques
NHBE	Normal human bronchial epithelial cells
NNK	Nitrosamine cétone
NNN	N'-nitrosonornicotine
NOx	Oxyde d'azote
NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
NRF2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
Ogg1	8-hydroxyguanine ADN-glycosylase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCE	Nombre d'érythrocytes polychromatiques
PIG-A	Phosphatidyl-inositol glycane A
PMI	Philip Morris
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RANTES	Regulation on Activation, Normal T cell expressed and secreted
RBC	Erythrocytes totaux
RBC	Red blood cells
RESPIRE	Respiratory impact of electronic cigarette
RET	Réticulocytes
RET	Réticulocytes circulants
RISC	RNA-induced silencing complex
RXR	Retinoid X receptor
SEDN	Systèmes électroniques de délivrance de nicotine
SLC7A11	Solute Carrier Family 7 Member 11
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TNS	Traitements nicotiniques de substitution
TP53	Tumor protein 53
UHPLC	Chromatographie liquide à ultra-haute performance
UV	Ultraviolet
XPC	Xeroderma pigmentosum complementation group C

Contexte et introduction

Contexte

La consommation de tabac est aujourd'hui clairement reconnue comme un problème majeur de santé publique. Elle est responsable du décès de la moitié de ses consommateurs réguliers, soit plus de 8 millions de morts par an dans le monde (OMS, 2019) et 75 000 par an en France (Pasquereau, 2020). La seule solution efficace pour réduire la mortalité est le sevrage tabagique mais la forte dépendance du consommateur à la nicotine rend ce sevrage difficile. Depuis 2014, de nombreuses politiques de santé établies en France ont été mises en place avec, notamment, le paquet de cigarettes neutre, l'augmentation du prix du paquet et les messages sensibilisant aux risques de la fumée ont contribué à une diminution du tabagisme. En parallèle de cette diminution, la prévalence de l'usage d'un nouveau type de dispositif permettant la prise de nicotine augmente : la cigarette électronique (ou e-cig).

En effet, le marché de l'e-cig s'est considérablement développé dans le monde et en France depuis le début de sa commercialisation en 2010. La prévalence de vapoteurs quotidiens est passée de 3 % en 2014 à 4,4 % en 2019 (Pasquereau, 2020). Cependant, le manque de données scientifiques justifie les nombreuses interrogations des organismes de santé sur l'impact sanitaire à long terme de la consommation d'e-cig. La littérature disponible sur le sujet suggère que les émissions d'e-cig seraient bien moins toxiques que la fumée de cigarette. Mais, en septembre 2019, des cas de pneumopathies sévères, voire mortelles, survenues chez des vapoteurs ont été recensées aux Etats-Unis. Une enquête de la Food and Drug Administration (FDA) a relié ces cas à une utilisation anormale de l'e-cig, et notamment, à l'ajout dans le e-liquide d'huile de cannabis contenant de l'acétate de vitamine E. Cette molécule se transformerait en substance collante après avoir été chauffée et inhalée (FDA, 2020). Certains pays comme la Thaïlande ou l'Argentine préfèrent alors interdire l'utilisation de l'e-cig. A l'heure actuelle, des données toxicologiques sont encore nécessaires pour recommander l'utilisation de l'e-cig en tant que substitut nicotinique. L'urgence d'apporter des réponses est d'autant plus grande que les modèles d'e-cig disponibles sont de plus en plus performants en termes de génération d'aérosols avec le risque de comporter plus de composés toxiques dans leurs aérosols.

Plus récemment, l'industrie du tabac a également mis au point un nouveau dispositif commercialisé comme une alternative à la cigarette : le tabac chauffé. Ce dispositif, introduit sur le marché français en 2017, permet de générer un aérosol à partir de feuilles

chauffées de tabac. Les études de toxicité publiées jusqu'à maintenant soulignent la réduction du danger par rapport à la cigarette. Cependant, ces études sont pour la grande majorité issues de l'industrie du tabac elle-même. Il y a alors une nécessité de mener des études indépendantes sur la toxicité de ce nouveau produit du tabac.

L'e-cig et les produits du tabac chauffé se présentent comme des alternatives à la cigarette classique, et pourraient participer à la réduction de la consommation de cigarette. Mais dans l'état actuel des connaissances, ces nouveaux dispositifs posent également des problèmes de santé publique. Le tabac chauffé est un produit dérivé du tabac, certes supposé sans combustion, mais le chauffage des feuilles de tabac pourrait générer les mêmes dérivés secondaires que ceux retrouvés dans la fumée de cigarette. L'e-cig, quant à elle, n'est pas un dérivé du tabac, mais les constituants des e-liquides, les produits dérivés du chauffage de ce dernier et les contaminants issus du dispositif lui-même pourraient induire des effets néfastes à long terme. La prudence des autorités de santé et des agences sanitaires sur l'utilisation de ces alternatives à la cigarette témoigne du manque de données expérimentales indépendantes disponibles. L'amélioration des connaissances sur la composition chimique des aérosols et leur toxicité potentielle *in vitro* et *in vivo,* ainsi que l'apport de données cliniques à long terme chez l'Homme permettra de mieux caractériser le danger d'une exposition à ces nouveaux produits et, *in fine*, de mieux juger de leur balance bénéfices/risques.

Introduction

1. Le tabagisme

1.1. Epidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la santé, la consommation de tabac est un problème majeur de santé publique mondiale. Elle est responsable de plus de 8 millions de morts chaque année dans le monde parmi lesquels 7 millions sont des consommateurs ou d'anciens consommateurs et 1,2 millions sont des personnes involontairement exposées à la fumée. Le tabagisme est ainsi la première cause de mortalité évitable dans le monde (OMS, 2019). En France, en 2015, les décès attribuables au tabac ont été estimés à plus de 75 000, dont 61,7% sont survenus suite à un cancer. Selon ces chiffes, la consommation de cigarettes est alors responsable de 13% de la totalité des décès survenus en France métropolitaine (Bonaldi, 2019). Les données du Baromètre de Santé publique France de 2018 montrent une diminution de la prévalence du tabagisme quotidien alors que celle-ci était stable depuis quelques années. Elle était d'environ 30% jusqu'en 2016 pour descendre à 27% en 2017 et 25% en 2018. La prévalence de fumeurs occasionnels en 2018 est estimée à 32% (Andler *et al.*, 2018). Cette tendance à la diminution est encourageante mais l'impact sanitaire du tabagisme ne déclinera pas dans un futur proche du fait du décalage entre la consommation et l'apparition des maladies pour lesquelles les fumeurs ont un risque plus élevé.

1.2. Pathologies associées au tabagisme

L'association entre le tabagisme et l'apparition précoce de pathologies ne fait aujourd'hui aucun doute (Doll *et al.*, 2004). La consommation de tabac est formellement associée à 21 pathologies : 12 types de cancers, les maladies cardiovasculaires, le diabète, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BCPO) et d'autres pathologies respiratoires. Ce nombre est même considéré comme sous-estimé car il n'explique pas la totalité de l'excès de mortalité retrouvé dans une population de fumeurs (Carter *et al.*, 2015). En France, plus de 80% des décès suite à des cancers du poumon sont imputables à la consommation de tabac, de même qu'environ 70% des décès de cancers des voies aérodigestives supérieures et environ 30% des cancers du foie et de la vessie. Le tabagisme est également responsable d'environ 64% des décès des suites de maladies chroniques des voies respiratoires inférieures (incluant la bronchite, la BPCO, l'asthme…).

Enfin, en moyenne, environ 12 % des décès liés à l'ensemble des maladies cardio-vasculaires sont également attribuables à la consommation tabagique (Bonaldi, 2019) (Tableau 1).

Pathologies	% de décès attribuables au tabac
Cancers	
Poumon	82%
Voies aérodigestives supérieures	68%
Estomac	21%
Foie	27%
Pancréas	24%
Col de l'utérus	10%
Ovaire mucineux	18%
Colon-rectum	8%
Rein	25%
Vessie	32%
Leucémie	13%
Maladies respiratoires	
Maladies chroniques des voies respiratoires inférieures	64%
Affection des voies respiratoires inférieures	14%
Autres maladies respiratoires	16%
Maladies infectieuses	
Tuberculose	11%
Maladies cardiovasculaires	
Cardiopathies ischémiques	12%
Maladies cérébrovasculaires	7%
Cardiopathies hypertensives	14%
Autres maladies cardiaques	15%

Tableau 1. Pourcentage de décès attribuables au tabagisme en fonction des pathologies en France métropolitaine pour l'année 2015. D'après Bonaldi et al., *2019.*

De par le mode de consommation de la cigarette, les voies respiratoires sont les premiers tissus à devoir faire face aux agressions de la fumée de tabac. Ce chapitre vise à décrire brièvement les principales maladies pulmonaires ayant été associées au tabagisme.

1.2.1. Cancer du poumon

Le cancer du poumon reste la première cause de mortalité au monde et la fumée de cigarette augmente substantiellement le risque d'en développer un. En effet, chez les

fumeurs, 14,8 % des hommes et 11,2 % des femmes vont développer un cancer du poumon, contre 1,8 % des hommes et 1,3% des femmes chez les non-fumeurs (Bruder *et al.*, 2018). Avant les années 1960-1970, le cancer du poumon épidermoïde était la forme histologique la plus répandue mais, depuis, ce sont les adénocarcinomes qui sont les plus retrouvés (Djordjevic *et al.*, 1997). Ce changement de forme histologique est attribué à la modification de la composition de la cigarette. La réduction de la quantité de nicotine et l'ajout du filtre font que les fumeurs aspirent plus intensément pour être satisfaits, ce qui fait que les substances cancérogènes se déposent plus profondément dans les poumons (Harris, 2004; Hoffmann *et al.*, 1997). L'incidence du cancer du poumon est étroitement liée à la prévalence du tabagisme, avec un délai d'une vingtaine d'année qui correspond au temps de développement de la maladie. En effet, alors que l'incidence du cancer du poumon a tendance à diminuer dans les pays développés dans lesquels la lutte contre le tabagisme s'est développée, celle dans les pays en voie de développement reste élevée (Toh, 2009).

1.2.2. La broncho-pneumopathie chronique obstructive

La BPCO est une maladie inflammatoire chronique qui entraîne une obstruction irréversible des voies respiratoires. Les symptômes principaux sont des bronchites à répétition, des difficultés respiratoires et une toux chronique. Les principales composantes de la BPCO sont la bronchite chronique et l'emphysème. La bronchique chronique est une inflammation à long terme des bronches entraînant des difficultés à respirer et une production excessive de mucus. L'emphysème pulmonaire est une atteinte de l'intégrité des alvéoles pulmonaires qui provoque leur dilatation excessive et permanente pouvant conduire à leur rupture. Le tabagisme est le principal facteur de risque pour la BPCO, environ 80 % des cas sont attribuables au tabac et au moins 25 % des fumeurs développent cette maladie (Lokke *et al.*, 2006). En France, elle concerne 7 à 10 % des individus de 40 à 64 ans. La BPCO est responsable de 100 000 à 160 000 hospitalisations par an en France et cause environ 18 000 décès (Delmas *et al.*, 2018). L'afflux de cellules de l'inflammation provoqué par la fumée de cigarette entraîne la sécrétion de médiateurs de l'inflammation et de protéases responsables de la dégradation des tissus et de la perte d'élasticité observée dans la BPCO (Owen, 2008). L'arrêt du tabac est la solution la plus efficace pour réduire le risque de développer cette maladie et limiter l'avancement des symptômes (Tonnesen *et al.*, 2006).

1.2.3. Pathologies interstitielles

La consommation de cigarette est également suspectée d'être à l'origine de pathologies interstitielles (Cottin, 2006; Ryu *et al.*, 2001). Également connues sous le nom de pneumopathies parenchymateuses diffuses, ces pathologies regroupent les atteintes pulmonaires caractérisées généralement par un épaississement des parois alvéolaires, une prolifération de fibroblastes et un dépôt de collagène qui peuvent aboutir à une fibrose pulmonaire. Ces pathologies associées à la consommation de tabac regroupent la bronchiolite respiratoire avec pneumopathie interstitielle, la pneumopathie interstitielle desquamative, l'histiocytose langheransienne pulmonaire et la fibrose pulmonaire idiopathique (Selman, 2003; Wirth *et al.*, 2009). Les maladies interstitielles sont caractérisées par une accumulation de cellules inflammatoires dans le tissu pulmonaire, une dyspnée et une toux. Lorsque cette inflammation est persistante, notamment suite au tabagisme, un tissu cicatriciel (le tissu fibrotique) se forme, entraînant la dégradation des alvéoles. Ce phénomène engendre une diminution de l'élasticité du poumon et de la capacité de transfert de l'oxygène vers le sang.

1.2.4. Asthme

De par ses effets pro-inflammatoires, le tabagisme est également un facteur d'aggravation de l'asthme. L'asthme est une maladie chronique inflammatoire qui se manifeste par crises d'essoufflement, de respiration sifflante et de toux sèche. L'interaction de cette maladie avec la fumée de cigarette amène à des symptômes plus sévères : l'accélération du déclin de la fonction pulmonaire, une augmentation du risque mortel de la maladie et surtout la baisse de sensibilité aux effets thérapeutiques des corticostéroïdes (Eisner and Iribarren, 2007; Thomson, 2004). De plus, des études suggèrent la possibilité que le tabagisme soit également un facteur de risque pour l'apparition de l'asthme chez l'adulte (Piipari, 2004; Polosa *et al.*, 2008).

1.3. Composition chimique du tabac et de la fumée de cigarette

La toxicité du tabac peut être majoritairement expliquée par la composition chimique des émissions produites lors de la combustion. La fumée de cigarette renferme en effet plus de 8 000 composés différents (Rodgman and Perfetti, 2016), dont une centaine de composés nocifs ou potentiellement nocifs a été décrite par les autorités de santé américaines (FDA, 2012). La FDA inclut tous les composés chimiques présents dans le tabac et dans la fumée de cigarette qui une fois inhalés, ingérés ou absorbés dans

l'organisme nuisent ou peuvent nuire aux personnes exposées au tabac. La plupart de ces composés sont générés par des phénomènes de pyrolyse lors de la combustion des molécules organiques présentes dans le tabac (Baker, 2006; Torikaiu *et al.*, 2005). Cette combustion se fait à près de 900°C lors d'une prise de bouffée par l'utilisateur (Guerin *et al.*, 1987). Les composés retrouvés dans les émissions sont nombreux et peuvent être séparés en différentes familles de composés : les composés carbonylés et autres composés organiques volatiles (COV), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les métaux, les N-nitrosamines et la nicotine (Tableau 2).

Certains composés sont générés sous forme de gaz lors de la combustion du tabac. Il y a entre 400 et 500 gaz différents retrouvés dans les émissions (Hoffmann *et al.*, 1997), les majoritaires étant le diazote (N_2), le dioxygène(O_2), le dioxyde de carbone (CO_2), le monoxyde de carbone (CO) et les oxydes d'azote (NOx). Le CO_2 et le CO représentent environ 15% de la phase gazeuse. Le monoxyde de carbone est l'un des gaz les plus agressifs pour l'organisme. En effet, il peut se lier très fortement à l'hémoglobine et réduire la quantité d'oxygène disponible pour l'organisme. L'émission de ce gaz dans l'air ambiant via la fumée de cigarette est l'une des principales raisons pour justifier l'interdiction de fumer dans les lieux publics (Jo *et al.*, 2004). Les COV présents dans la fumée de cigarette sont issus de la combustion incomplète des molécules organiques du tabac lors d'une bouffée (Polzin *et al.*, 2007). Ils font partie des composés les plus toxiques retrouvés dans ces émissions (Fowles, 2003). Parmi eux peuvent être cités le xylène, le toluène, l'acétonitrile, mais aussi différents composés carbonylés. Très réactifs, ces derniers composés sont produits à hauteur de 1 mg par cigarette. Les aldéhydes majoritaires dans la fumée de cigarette sont l'acétaldéhyde, l'acroléine, et le formaldéhyde. Quant aux cétones, c'est l'acétone qui est prépondérante (Counts *et al.*, 2005). Certains de ces composés peuvent être irritants pour les voies respiratoires, voire cancérogènes et sont retrouvés dans la liste des produits nocifs ou potentiellement nocifs de la FDA (FDA, 2012).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des composés formés par la combustion incomplète de matières organiques naturelles d'origine végétale ou animale (Evans *et al.*, 1993). Ce sont des molécules formées d'au moins deux cycles aromatiques condensés contenant uniquement des atomes de carbone et d'hydrogène. En 1986, l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement a identifié 16 HAP prioritaires

démontrés comme particulièrement nocifs voire cancérogènes (Phillips, 1983). Ces 16 HAP ont été retrouvés dans la fumée de cigarette par le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) (CIRC, 2004).

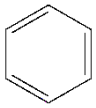
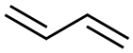
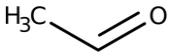
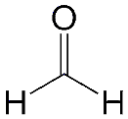
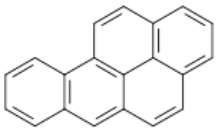
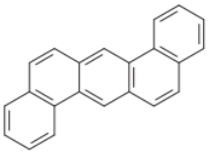
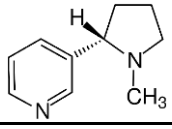
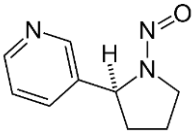
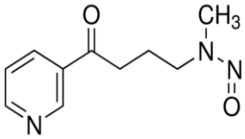
Parmi les nombreux alcaloïdes présents dans les feuilles de tabac, c'est la nicotine qui est le plus abondant. La teneur retrouvée dans une cigarette varie entre 6 et 18 mg par cigarette, selon les marques (Counts et al., 2005, CIRC, 2004). La nicotine est en partie responsable de la dépendance tabagique. Elle provoque une addiction chez l'Homme en mimant l'action de l'acétylcholine, un neurotransmetteur naturel (Brody *et al.*, 2009). En se fixant sur les récepteurs nicotiniques, elle déclenche la libération de dopamine qui alimente le circuit de la récompense chez le fumeur. De plus, la nicotine est une molécule fortement soluble et peut donc se dissoudre facilement dans les épithéliums pulmonaires et gagner la circulation sanguine, facilitant son pouvoir addictogène (Hukkanen *et al.*, 2005). Bien que la nicotine puisse être toxique à doses très élevées et participer à la toxicité du tabac, elle n'est pas considérée comme cancérogène. C'est pour cela que les traitements nicotiniques de substitution font partie de la liste des traitements préconisés par l'OMS pour lutter contre le tabagisme.

Les *N*-nitrosamines sont une famille de composés chimiques issus de l'association d'un nitrate ou d'un nitrite avec une amine (dérivé de l'ammoniac). C'est pendant le séchage et la combustion du tabac que la nicotine et ses dérivés peuvent être transformés en nitrosamines. La N'-nitrosonornicotine (NNN) et la nitrosamine cétone (NNK) sont celles retrouvées en plus grande quantité dans la fumée de tabac (Hecht and Hoffmann, 1988, CIRC, 2010). Elles sont les plus toxiques (Hecht, 1999) et ont été classées par le CIRC comme cancérogènes de classe 1 en 2012.

Les métaux font également partie des substances auxquelles peuvent être exposés les fumeurs. Ces métaux peuvent provenir des pesticides utilisés dans la culture des feuilles de tabac (Frank *et al.*, 1977), mais en majorité, ils proviennent directement des contaminations de l'air et des sols. En effet, la capacité des plants de tabac à absorber l'excès de métaux dans les sols, très utilisée dans l'agriculture moderne, devient un problème sanitaire pour les cultures de tabac destinées à la production de cigarette. Aluminium, arsenic, cadmium, chrome, cuivre, plomb, manganèse, mercure, nickel, sélénium, vanadium et zinc ont tous été mis en évidence dans la fumée de cigarette (Bernhard *et al.*, 2005). Parmi les plus toxiques, le cadmium est le métal le plus étudié

dans la fumée de cigarette, il y est retrouvé dans des quantités comprises entre 0,5 et 1,5 µg par cigarette en moyenne. Ce métal s'accumule en majorité dans les reins et peut causer une dysfonction tubulaire et une insuffisance rénale. Mais il s'accumule également dans la circulation et dans les poumons, ce qui peut causer des emphysèmes et des maladies cardiovasculaires (Hendrick, 2004; Navas-Acien *et al.*, 2004). Le cadmium est classé comme cancérogène de classe 1 par le CIRC et a été relié à l'apparition de cancer du poumon, du rein, de la prostate, du colon et du sein (Järup, 2003; Satarug and Moore, 2004). Le chrome hexavalent, ou chrome VI, également un cancérogène de classe 1, est retrouvé à hauteur de 0,5 µg par cigarette (Smith, 1997), il s'accumule en majorité dans les tissus pulmonaires. Une étude a retrouvé 3 fois plus de chrome dans les poumons d'individus fumeurs que dans des poumons d'individus non-fumeurs (Pääkkö *et al.*, 1989). Le chrome présent peut alors induire des cassures simple brin de l'ADN (Liu *et al.*, 1999) et avoir des effets mutagènes (Shrivastava *et al.*, 2005). Enfin le plomb et l'arsenic sont également considérés comme cancérogènes de classe 1. Ils sont retrouvés à hauteur de 0,93 µg/g de tabac et 0,15 µg/g, respectivement (Lazarević *et al.*, 2012). Alors que l'exposition au plomb est plutôt corrélée au développement de maladies neurodégénératives (White *et al.*, 2007), l'exposition à l'arsenic peut mener à une augmentation des altérations de l'ADN au niveau pulmonaire (Hays *et al.*, 2006), au cancer du poumon et de la vessie, et à des maladies cardiovasculaires (Chen *et al.*, 2004; Steinmaus *et al.*, 2003).

Tableau 2. Exemples de composés ou de famille de composés retrouvés dans la fumée de cigarette et leurs effets sur la santé humaine. Classification CIRC : 1 – agent cancérogène avéré ; 2A – agent probablement cancérogène ; 2B – agent peut-être cancérogène.

Famille de composés	Exemple	Classification CIRC	Effets sur la santé
COV	 Benzène	1	Irritants des voies respiratoires, cancérogènes
	 1,3-butadiene	1	
Composés carbonylés	 Acétaldéhyde	2B	Irritants des voies respiratoires, cancérogènes
	 Formaldéhyde	1	
HAP	 Benzo(a)pyrène	1	Adduits à l'ADN, Cancérogènes
	 dibenz(a,h)anthracène	2A	
Nicotine		N.D.	Pouvoir addictogène
N-Nitrosamines	 *N*-nitrosonornicotine (NNN)	1	Adduits à l'ADN Cancérogène
	 *N*-nitrosamine cétone (NNK)	1	
Métaux	Arsenic	1	Risques cardiovasculaires Toxicité hépatique, rénale, pulmonaire
	Cadmium	1	

L'identification des risques liés au tabagisme peut être compliquée. En effet, la fumée de cigarette générée est un mélange complexe d'un grand nombre de substances toxiques. Une revue a tenté d'identifier les composés de la fumée de cigarette dont le potentiel toxique est le plus élevé. Ainsi, le 1,3-butadiène serait le composé le plus cancérogène ; l'acroléine et l'acétaldéhyde seraient les plus irritants pour les voies respiratoires ; l'arsenic et le cyanure d'hydrogène amèneraient le plus de risques cardiovasculaires (Fowles, 2003). En plus de la toxicité clairement établie de certains composés, l'effet cocktail dû aux nombreuses substances qui composent la fumée de cigarette rend sa toxicité globale difficile à caractériser.

1.4. Mécanismes d'actions toxiques de la fumée de cigarette

1.4.1. Vulnérabilité des voies respiratoires à la fumée de cigarette

La fumée de cigarette est un mélange d'un grand nombre de composés qui peuvent être cytotoxiques, génotoxiques, mutagènes et/ou cancérogènes (Bluhm *et al.*, 1971; Ding *et al.*, 2008). L'accumulation de ces composés chez les fumeurs réguliers favorise l'apparition de lésions au niveau du tissu pulmonaire. En effet, les voies respiratoires et l'épithélium bronchique sont en première ligne face aux agressions chimiques de l'air que nous respirons. Pour protéger le tissu pulmonaire, des mécanismes sont mis en place pour éliminer les particules et les gaz inhalés (Figure 1). Ces défenses comprennent les barrières physiques avec les poils nasaux, les circonvolutions des sinus et les réflexes de toux et d'éternuement. Mais, au niveau pulmonaire, elles reposent aussi sur les cellules sécrétrices de mucus et les cellules ciliées qui permettent la clairance-mucociliaire, et sur les cellules de l'immunité avec les cellules inflammatoires et les macrophages alvéolaires. A côté des processus majeurs de protection des voies aériennes cités précédemment, il existe des systèmes enzymatiques puissants capables de transformer toute molécule étrangère ou xénobiotique, le plus souvent hydrophobe, en métabolite suffisamment hydrophile pour être excrété dans les urines ou dans la bile. Ces enzymes sont classiquement classées en deux catégories : les enzymes de phase I, représentées en majorité par la superfamille du cytochrome P450 (CYP), qui catalysent des réactions d'oxydation (Guengerich, 2008) et les enzymes de phase II, surtout représentées par des transférases, qui catalysent la conjugaison à une molécule endogène (glutathion,

groupement méthyl…) des xénobiotiques ou de leur(s) métabolite(s) préalablement produit(s).

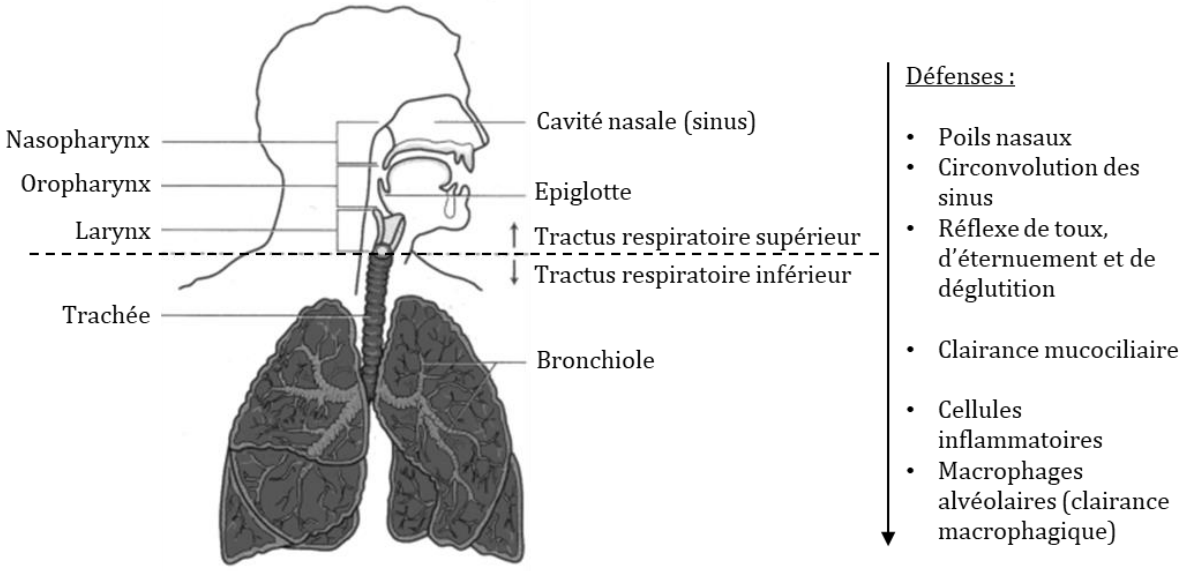


Figure 1. Synthèse des mécanismes de défenses des voies respiratoires. D'après Surgeon General's Report, 2010.

Le processus de combustion de la fumée de cigarette génère une phase particulaire et une phase gazeuse, avec la grande majorité des composés toxiques qui se trouve dans la phase particulaire (Witschi, 2005). Pour les gaz, l'efficacité de la clairance muco-ciliaire dépend de la solubilité du gaz en question (Kreyling *et al.*, 2000). Un gaz très soluble sera piégé dans le mucus et pourra être éliminé plus facilement. Un gaz peu soluble (comme le CO) pourra, par contre, arriver jusqu'aux alvéoles et diffuser à travers la membrane alvéolo-capillaire. Concernant la phase particulaire, l'élimination dépend de la taille des particules. Alors que les particules les plus grosses (<2,5 µm) vont se déposer par impaction au niveau des voies respiratoires supérieures, les particules émises par la combustion de la cigarette, de taille comprise entre 0,3 à 0,4 µm (Bernstein, 2004; Martonen, 1992) se déposent plus profondément dans les voies respiratoires distales. Au niveau des alvéoles, du fait de l'absence du système muco-ciliaire, l'élimination des particules est assurée principalement par la clairance macrophagique. Celle-ci étant très lente, les particules ont ainsi tendance à s'accumuler (Cohen *et al.*, 1979; Kreyling *et al.*, 2000). Une exposition chronique aux particules sur lesquelles sont adsorbés de nombreux composés toxiques peut entretenir un environnement propice à l'inflammation et au stress oxydant.

1.4.2. Inflammation et stress oxydant liés au tabac

1.4.2.1. Effets du tabagisme sur le stress oxydant

Les voies respiratoires sont donc particulièrement exposées aux espèces oxydantes présentes dans l'environnement, c'est pourquoi on y trouve une forte concentration de systèmes antioxydants. Les principales défenses antioxydantes non enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E, la vitamine C ou encore l'acide urique. Lors d'un stress oxydant, ces antioxydants vont être consommés et l'organisme devra les régénérer pour pouvoir lutter à nouveau efficacement. Les systèmes de défense antioxydante enzymatiques catalysent des réactions de neutralisation des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces enzymes comprennent principalement les superoxydes dismutases, glutathions peroxydases, glutathions réductases et catalases. La présence d'ERO dans la cellule n'est pas problématique à des doses raisonnables. Cependant, lorsque la balance oxydants/antioxydants est déséquilibrée, il y a alors ce qui est appelé un stress oxydant. La perte de cette homéostasie peut être due à une augmentation du nombre d'ERO ou alors à un défaut des défenses antioxydantes. Dès lors, l'excès de radicaux libres et d'ERO entraîne des dommages oxydatifs sur les macromolécules cellulaires. Sur l'ADN, les ERO peuvent oxyder certaines bases nucléiques (en particulier la désoxyguanine pour former la 8-OHdG), aboutissant à une altération possible des gènes et de leur expression. Au niveau des lipides, il peut y avoir des réactions de peroxydation pouvant perturber l'intégrité des membranes et altérer la fonction de certains récepteurs. Enfin, les ERO peuvent également provoquer des réactions d'oxydation de groupements sulfhydrils ou de carbonylation des acides aminés, altérant ainsi la fonction des protéines cellulaires. Tous ces produits d'oxydations sont considérés comme des marqueurs biologiques de stress oxydant.

À cause des nombreux composés organiques qui la composent, la fumée de cigarette contient un grand nombre de produits oxydants (monoxyde de carbone, aldéhydes, HAP, N-nitrosamines…) (Pryor, 1992; Wogan *et al.*, 2004). Il a été estimé dès 1985 que la pyrolyse du tabac génère entre 10^{14} et 10^{17} radicaux libres par bouffée (Church and Pryor, 1985). Les radicaux majoritaires retrouvés dans la phase gazeuse sont l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote qui réagissent pour former le peroxynitrite. Dans la phase particulaire, les quinones et les anions superoxydes réagissent pour former des radicaux hydroxyles et du peroxyde d'hydrogène. De plus, la présence de fer dans la fumée de

cigarette entraîne la génération d'autant plus d'ERO à partir du peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton (Pryor and Stone, 1993).

Le tabagisme contribue alors à augmenter le taux d'oxydants et à perturber l'homéostasie. Il a été montré chez les fumeurs que les taux d'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN sont supérieurs à ceux des non-fumeurs (Frei *et al.*, 1991; Kalra *et al.*, 1991; Morrow *et al.*, 1995; Reznick *et al.*, 1992). Ce stress oxydant chronique est admis depuis de nombreuses années comme ayant un rôle central dans la cancérogénèse induite par le tabac, par le biais de dommages à l'ADN (Pryor, 1997), mais aussi dans le développement de la BCPO (Bowler *et al.*, 2004).

1.4.2.2. Effet du tabagisme sur l'inflammation

Comme précisé précédemment, au niveau des voies respiratoires, la clairance muco-ciliaire permet d'éliminer une partie des substances toxiques des phases gazeuse et particulaire de la fumée de cigarette. Cependant, une partie de ces substances peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires dans lesquelles ce mécanisme n'a pas lieu à cause de l'absence de cellules à mucus et de cellules ciliées. Ainsi, à ce niveau, la protection se fait par le biais de la réponse immunitaire innée, une réponse non-spécifique de l'organisme contre une substance exogène dont les macrophages alvéolaires et les monocytes sont les acteurs les plus importants au niveau pulmonaire. Une exposition chronique à la fumée de cigarette engendre une augmentation du nombre de cellule de l'inflammation dans les voies aériennes et les tissus pulmonaires chez l'Homme, en particulier du nombre de macrophages alvéolaires (Schaberg *et al.*, 1992). Chez les fumeurs chroniques, les macrophages participent largement à la dérégulation de la balance oxydants/antioxydants en produisant des ERO, et leurs fonctions de phagocytose, d'élimination des bactéries et de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires sont également altérées (King *et al.*, 1988; Martin and Warr, 1977; McCrea *et al.*, 1994). L'exposition à la fumée de cigarette est également associée à la sécrétion de médiateurs de l'inflammation. Plusieurs études montrent une augmentation du *tumor necrosis factor-alpha* (TNF-a), des interleukines IL-1, IL-6, IL-8 (Bermudez *et al.*, 2002; Chung, 2005; Churg *et al.*, 2002) qui favorisent le recrutement de cellules impliquées dans l'inflammation (neutrophiles, macrophages). Cet afflux de cellules provoque également une sécrétion accrue de protéases et un déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases (Shaykhiev *et al.*, 2009). Churg et ses collaborateurs suggèrent que les

métalloprotéases matricielles (MMP) sécrétées en excès durant le processus inflammatoire sont responsables de la dégradation des parois alvéolaires observée suite à une exposition à la fumée de cigarette (Churg *et al.*, 2007).

Le lien entre le stress oxydant et l'inflammation est complexe. En effet, les deux mécanismes s'auto-alimentent et contribuent au maintien l'un de l'autre. Alors que l'organisme est capable de rééquilibrer les différentes homéostasies en condition normale, l'exposition chronique à la fumée de cigarette, en apportant des espèces oxydantes et en induisant une réponse inflammatoire, provoque un déséquilibre constant qui participe à la dégradation des tissus pulmonaires menant à diverses pathologies respiratoires (Figure 2, d'après Zuo et al., 2014).

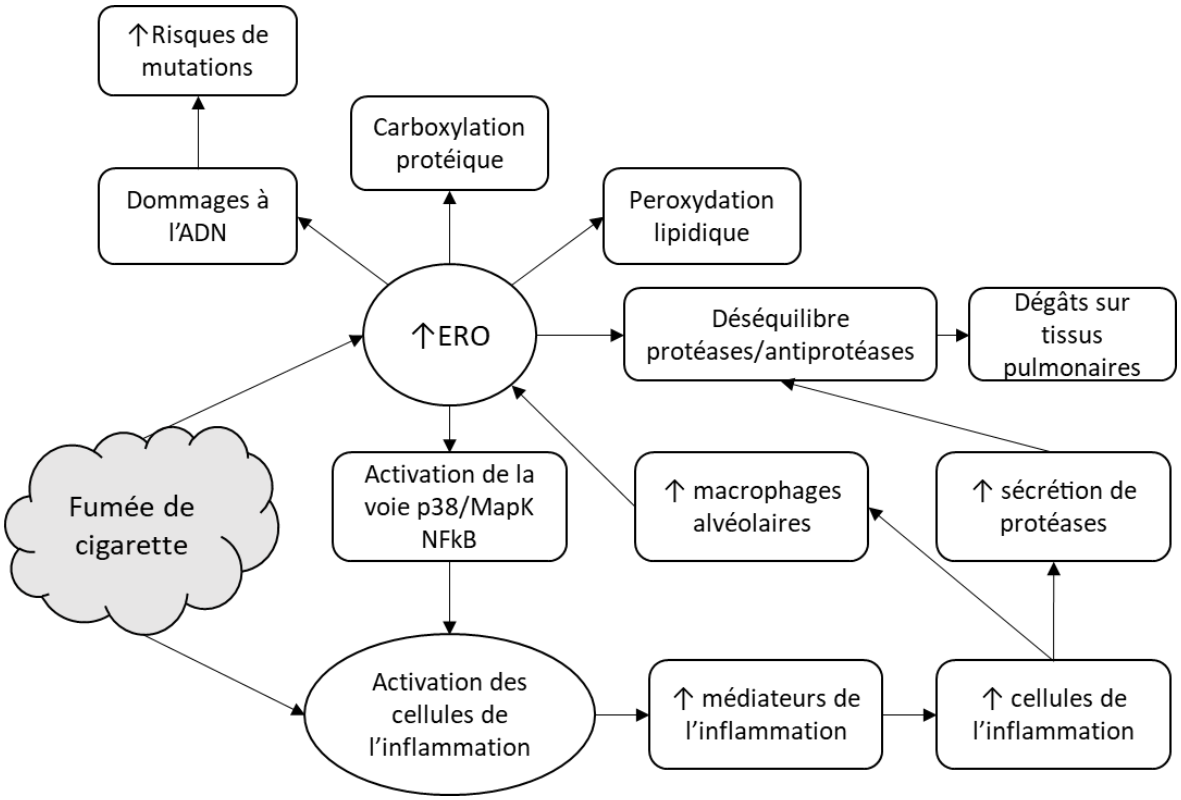


Figure 2. Schéma des mécanismes induits par la fumée de cigarette liés à l'inflammation et au stress oxydant menant à la destruction des tissus pulmonaires. Adapté de Zuo et al., 2014.

1.4.3. Altérations génétiques

1.4.3.1. Les effets génotoxiques du tabac

Chaque bouffée de cigarette contient un mélange d'une soixantaine de composés toxiques avérés cancérogènes chez l'animal ou chez l'Homme. Ce nombre est vraisemblablement sous-estimé puisque la toxicité de certains composés peut ne pas avoir été caractérisée. Les aldéhydes, les HAP, les N-nitrosamines, les COV ou encore les métaux sont les composés auxquels il faut apporter le plus d'attention du fait de leur haut

potentiel cancérogène et des quantités retrouvées dans la fumée de cigarette (Hoffmann *et al.*, 2001). La plupart de ces composés exercent leur génotoxicité favorisant la formation d'adduits à l'ADN (Hecht, 1999) qui peuvent induire des cassures des brins d'ADN, et des oxydations de bases nucléiques, qui peuvent mener à des mutations si elles ne sont pas réparées (CIRC, 2004).

1.4.3.2. Implication des enzymes du métabolisme

Pour pouvoir former des adduits, la plupart des composés cancérogènes contenus dans la fumée de cigarette nécessitent une activation métabolique. Bien que dans la plupart des cas, les réactions de biotransformations médiées par les enzymes, de la superfamille des cytochromes P450 (CYP) aboutissent à la détoxification des xénobiotiques, il arrive qu'elles soient responsables de la bio-activation de certains composés, les rendant plus réactifs que les produits initiaux et capables de former des adduits à l'ADN. Par exemple, l'activité de certains CYP peut transformer les HAP, le 1,3-butadiène ou le benzène en époxydes très réactifs qui, s'ils ne sont pas désactivés par des époxydes hydrolases et des enzymes de phase II, peuvent conduire à la formation d'adduits à l'ADN mutagènes (Fretland and Omiecinski, 2000 ; Hayes et al., 2005). Les cytochromes P450 1A1 et 1B1 (CYP1A1 et CYP1B1), impliqués dans la métabolisation des HAP, sont les plus inductibles par la fumée de cigarette via une interaction avec le récepteur aux hydrocarbures aromatiques AhR (Aryl Hydrocarbons Receptor) (Nebert *et al.*, 2004; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004). D'autres enzymes de la famille des cytochromes P450 sont également impliquées dans le métabolisme de xénobiotiques présents dans la fumée de cigarette, même si elles sont moins représentées : CYP1A2 pour les amines aromatiques qui est peu exprimé dans le poumon (Kim and Guengerich, 2005) et les CYP2A6, CYP2A13, et CYP2E1 pour la nicotine et les N-nitrosamines (Guengerich *et al.*, 1991; Jalas *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*, 1992; Yoo *et al.*, 1988). Certaines études ont montré que les fumeurs expriment certains CYP (CYP1A1 et CYP1B1) à des taux plus importants au niveau pulmonaire (Kim *et al.*, 2004; Port *et al.*, 2004; Willey *et al.*, 1997). A noter que certains composés tels que le formaldéhyde ou l'acétaldéhyde peuvent aussi former des adduits sans avoir besoin d'être activés. La balance entre l'activation métabolique et la détoxification joue un rôle fondamental dans la formation d'adduits, en particulier sur l'ADN (Figure 3, d'après Furrukh, 2013). Plus le taux d'adduits est élevé, plus le risque de mutations géniques l'est également (Phillips, 2007).

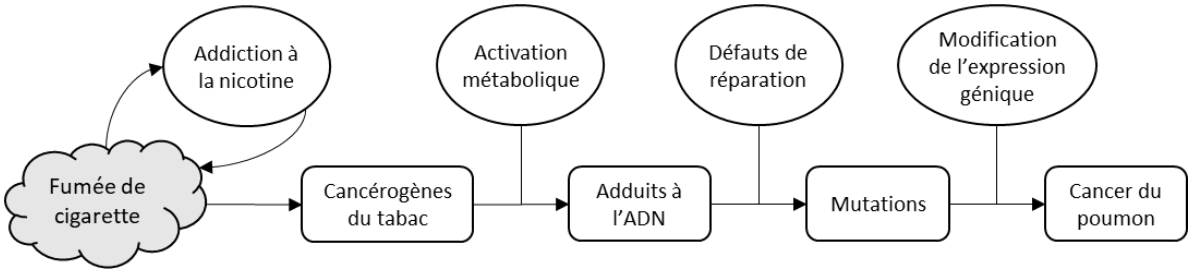


Figure 3. Schéma des mécanismes d'induction du cancer du poumon par les adduits à l'ADN. D'après Furrukh, 2013.

1.4.3.3. Les adduits mis en évidence chez les fumeurs

Différents composés cancérogènes retrouvés dans les émissions peuvent être à l'origine de la formation des adduits à l'ADN (Phillips, 2002; Phillips and Venitt, 2012). Par exemple, le benzo[a]pyrène-diol-époxyde (BPDE) qui est un adduit issu du métabolisme du benzo[a]pyrène, a été retrouvé dans 40% des tissus pulmonaires des fumeurs (Boysen and Hecht, 2003) et dans des cellules bronchiques épithéliales prélevées chez des patients atteints de cancer du poumon (Rojas, 2004). L'acétaldéhyde et le formaldéhyde présents dans la fumée de cigarette peuvent également former des adduits détectables dans le sang de fumeurs, le 1,N2-propano-20-désoxyguanosine et le N6-hydroxyméthyldésoxyadénosine, respectivement (Garcia *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009). Les nitrosamines spécifiques du tabac, NNK et NNN peuvent respectivement former les adduits méthanediazo-hydroxyde et 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone (Hölzle *et al.*, 2007). Les espèces réactives de l'oxygène générées suite à l'exposition à la fumée de cigarette peuvent aussi former des adduits à l'ADN en oxydant la désoxyguanosine en 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG) notamment. Il est clairement établi que la présence d'adduits sur l'ADN induit des erreurs de réplication lors des divisions cellulaires. Si les mutations engendrées affectent une région cruciale de certains oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, cela peut amorcer un processus de tumorigénèse.

1.4.3.4. Les mutations induites par le tabagisme

L'augmentation du risque de mutation a pu être associée à certains adduits causés par des composés retrouvés dans la fumée de cigarette. Par exemple, le BPDE, un métabolite du benzo[a]pyrène responsable de la formation d'adduits a été associé à certaines mutations de *TP53* observées dans des cancers pulmonaires humains (Boysen and Hecht, 2003; Pfeifer *et al.*, 2002; Phillips, 2002). Le gène *TP53* est un gène suppresseur de tumeur retrouvé inactivé dans un grand nombre de cancers humains. Il code pour la protéine p53 qui est un facteur de transcription notamment impliqué dans la régulation

du cycle cellulaire et dans l'apoptose. De nombreuses études ont montré que les mutations de *TP53* étaient plus communément retrouvées chez les fumeurs que chez les non-fumeurs (Greenblatt *et al.*, 1994; Hernandez-Boussard and Hainaut, 1998; Pfeifer *et al.*, 2002). Le Calvez et al. ont même montré que des fumeurs de longue durée avaient 13 fois plus de risques d'avoir des mutations de ce gène par rapport à des individus n'ayant jamais fumé (Le Calvez *et al.*, 2005). Un autre exemple, la O6-méthylguanine, un adduit généré une nitrosamine, provoque la substitution d'une guanine par une adénine, fréquemment observée dans la séquence de *KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), qui entraîne l'activation de l'oncogène et des voies de signalisation intracellulaires en aval (prolifération, migration, résistance à apoptose…). Des mutations de cet oncogène *KRAS* ont également été montrées dans 30 % des cancers du poumon chez les fumeurs (Gealy *et al.*, 1999). Ce gène code pour la protéine KRAS qui favorise la prolifération cellulaire en réponse à un stimulus par les hormones de croissance. Les N-nitrosamines et les HAP présents dans la fumée de cigarette ont été associées à ces mutations de *KRAS* (Pfeifer and Hainaut, 2003; Ziegel *et al.*, 2003). Globalement, les mutations des gènes *KRAS* et *TP53* sont les plus fréquemment retrouvées chez les fumeurs atteints d'un cancer du poumon. Elles sont majoritairement induites par les dommages à l'ADN provoqués par les HAP mais d'autres composés de la fumée de cigarette tels que les aldéhydes et les radicaux libres, capables également d'induire la formation d'adduits, peuvent être impliqués dans la cancérogénèse (Pfeifer *et al.*, 2002).

Au final, les mutations induites par les composés retrouvés dans la fumée de cigarette vont modifier l'expression de gènes critiques impliqués directement ou indirectement dans les processus cellulaires. Ainsi, la diminution de protéines pro-apoptotiques de la famille de BCL-2, de la protéine du rétinoblastome (Rb) ou du gène *TP53* sont des caractéristiques couramment retrouvées dans le cancer du poumon induit par la fumée de cigarette. De la même façon, une augmentation des voies anti-apoptotiques telles que *RAS/MAPK*, *PI3K/AKT*, *NFKB* peut être retrouvée dans le cas de cancer du poumon. Ces

caractéristiques confèrent aux cellules cancéreuses une résistance à l'apoptose qui améliore leur survie et leur prolifération (Figure 4).

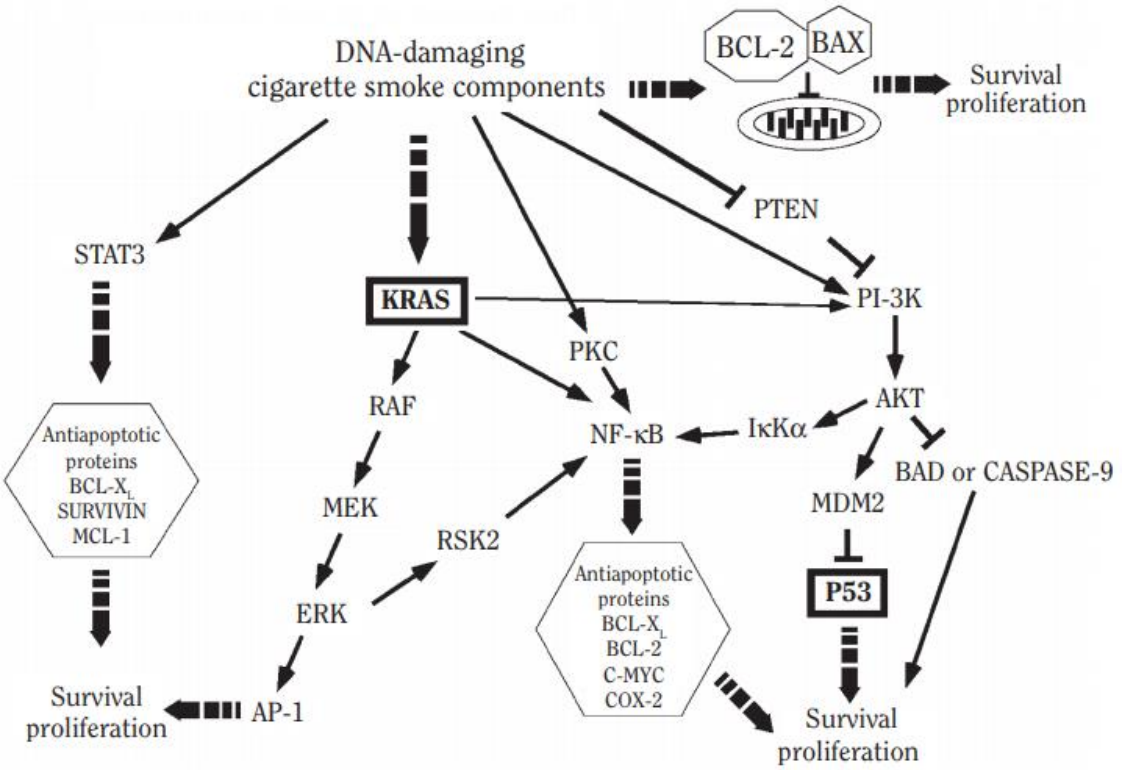


Figure 4. Schéma des voies de signalisation dérégulées dans le cas d'un cancer du poumon induit par la cigarette. D'après Surgeon General, 2010.

1.4.4. Altérations épigénétiques

En plus de ses effets mutagènes directs, le tabac peut aussi induire des modifications épigénétiques. Ces altérations, généralement réversibles, sont caractérisées par leur héritabilité au cours des divisions cellulaires mais n'impliquent pas de changement au niveau de la séquence primaire de l'ADN. En remodelant l'arrangement des nucléosomes au sein de la chromatine, en changeant le profil de méthylation de l'ADN, ou encore en modifiant l'expression d'ARN non codants, le tabac peut modifier l'expression du génome de façon indirecte.

1.4.4.1.Modification de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique qui change une cytosine en 5-méthylcytosine. Chez les mammifères elle a lieu le plus souvent au niveau des ilots CpG (région di nucléotidique d'une cytosine suivie d'une guanine) présents dans les régions promotrices des gènes. Lorsqu'il y a méthylation, la transcription du gène concerné est bloquée (Figure 5).

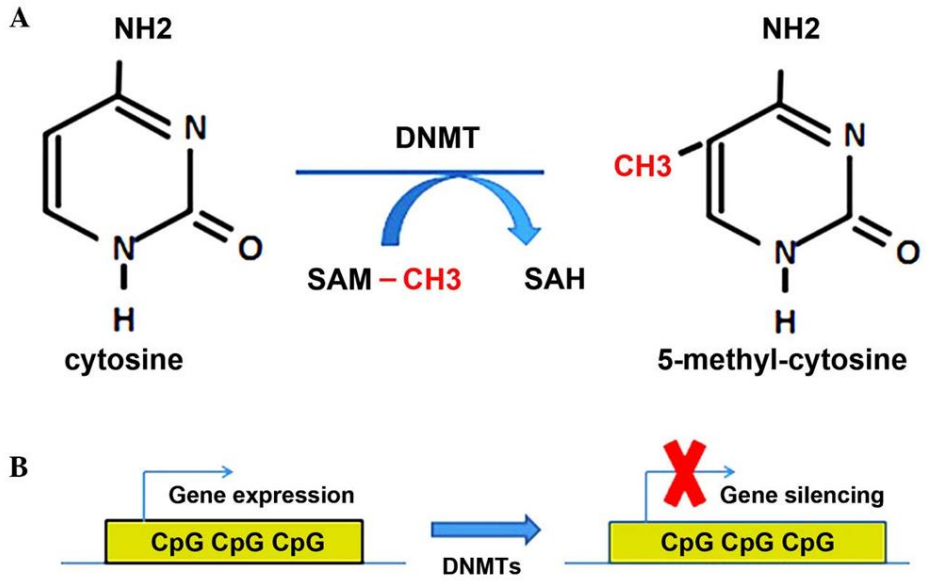


Figure 5. Schéma du processus de méthylation de l'ADN. (A) L'ADN méthyltransférase (DNMT) change la cytosine en 5-méthylcytosine. (B) La méthylation des cytosine des ilôts CpG sur la région promotrice d'un gène inhibe sa transcription. D'après Cui et al., 2016.

Plusieurs études suggèrent que la fumée de cigarette a un effet sur l'état de méthylation de l'ADN (Dogan *et al.*, 2014; Elliott *et al.*, 2014; Guida *et al.*, 2015; Philibert *et al.*, 2013; Shenker *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013; Zaghlool *et al.*, 2015; Zeilinger *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2016). La méthylation de l'ADN est catalysée par les ADN méthyltransférases (DNMTs). Une étude montre que l'expression de *DNMT1* est augmentée dans les tissus pulmonaires des fumeurs (Kwon *et al.*, 2007). DNMT1 est recrutée lorsque la cellule repère des anomalies dans la séquence nucléotidique des gènes, afin d'inactiver le ou les gène(s) concerné(s) (Cuozzo *et al.*, 2007; Mortusewicz *et al.*, 2005). Par exemple, le gène *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), un gène essentiel dans le fonctionnement du cycle cellulaire a été montré inactivé dans le cancer du poumon suite à une hyperméthylation aberrante de sa région promotrice (Palmisano *et al.*, 2000). Bien que la fumée de cigarette induise une hyperméthylation spécifique de certains gènes, l'exposition à cette dernière induirait une hypométhylation globale de l'ADN, ce qui correspond alors à une augmentation de la transcription d'un certain

nombre d'autres gènes (Buro-Auriemma *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2012). Des sites CpG de la région promotrice des gènes *AHRR* (Aryl Hydrocarbons Receptor Repressor) ; *CYP1B1* et *ALDH3A1* (aldéhyde déshydrogénase 3A1) ont été notamment retrouvés déméthylés chez des fumeurs réguliers (Freudenheim *et al.*, 2019). Cette hypométhylation se traduit par une surexpression des gènes concernés et ainsi une hausse de la réponse de l'organisme aux xénobiotiques présents dans la fumée de cigarette. La modification de l'état de méthylation de l'ADN est réversible, en effet, le niveau de méthylation observés chez des fumeurs ayant arrêté de fumer pendant 5 ans est majoritairement revenu au niveau de méthylation des non-fumeurs. Cependant, certains sites, notamment *AHRR*, ne reviennent pas au niveau initial, jusqu'à 30 ans après l'arrêt (Joehanes *et al.*, 2016), suggérant des effets permanents du tabagisme sur l'expression génique.

1.4.4.2. Modification des histones

L'exposition à la fumée de cigarette peut également influer sur l'expression des gènes en étant responsable de réarrangements au niveau de la condensation de la chromatine (Arimilli *et al.*, 2017; Philibert *et al.*, 2012). Les histones sont les protéines responsables de la compaction de l'ADN. Les modifications post-traductionnelles de ces histones (phosphorylation, acétylation, méthylation et ubiquitinylation) influent sur l'état chromatinien et ainsi sur l'accessibilité des gènes et leur expression (Figure 6).

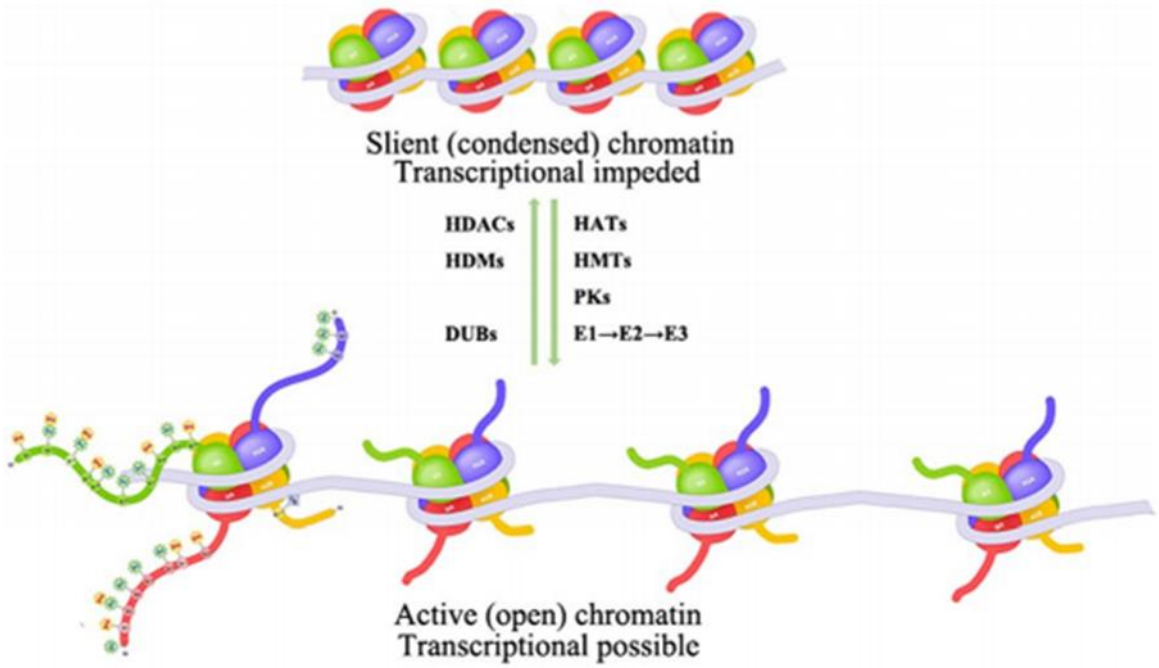


Figure 6. Influence des modifications des histones sur l'état de compaction de l'ADN. Les histones acétyltransférases (HAT), les histones méthyltransférases (HMT), les phosphorylases (PK) et les enzymes de l'ubiquitinylation (E1, E2 et E3) favorisent la décompaction et la transcription. Les histone désacétylases (HDAC), les histones dé-méthylases (HDM) et les enzymes de dé-ubiquitinylation (DUB) favorisent la compaction et empêchent la transcription. D'après Zong et al., 2019.

L'acétylation des histones est un processus dynamique qui requiert l'intervention d'enzymes : les histones acétyltransférases (HAT), qui ajoutent des groupements acétyles, et les histones désacétylases (HDAC), qui les enlèvent. Ces enzymes régulent la balance acétylation/désacétylation des histones. Par exemple, lorsqu'une histone est acétylée, la région promotrice d'un gène peut devenir accessible aux enzymes et aux facteurs de transcription, favorisant sa transcription (Adenuga and Rahman, 2010; Yao *et al.*, 2010). Les données de la littérature montrent que la hausse de l'acétylation des histones induite par la fumée de cigarette est due à une baisse de l'activité des HDAC (Ito *et al.*, 2005; Marwick *et al.*, 2004; Sundar *et al.*, 2014; Szulakowski *et al.*, 2006). De plus, des dosages chez des patients atteints de BPCO montrent que la baisse d'activité des HDAC est directement liée au nombre de cigarettes fumées par an (Chen *et al.*, 2012b). Chez des patients atteints de BCPO, l'expression de *HDAC2*, *HDAC5*, *HDAC8* (Ito *et al.*, 2005; Szulakowski *et al.*, 2006), *HDAC7* (To *et al.*, 2012) et *HDAC10* (Jeong *et al.*, 2018) a été montrée comme réduite au niveau pulmonaire. L'acétylation des histones H3 et H4 a été associée à l'augmentation de la transcription de gènes pro-inflammatoire (*IL-6*, *IL-8*, *TNF-α* par exemple) ; la persistance de l'inflammation dans le cas de patients atteints de BPCO ayant arrêté de fumer serait due à ces modifications (Szulakowski *et al.*, 2006).

Une étude a également montré que la fumée de cigarette avait un impact sur le niveau de méthylation des histones (Sundar *et al.*, 2014). Une augmentation de l'activité de l'histone méthyltransférase (HMT) et des mono- et des di-méthylations a été mise en évidence par cette étude sur les histones H3 (H3K27me2/3, H3K36me1/2, H3K56me2, and H3K79me1/2) et H4 (H4K20me1/2, H4R23me1, H4K31me2, H4R35me1/2, H4R36me1, H4R55me1 and H4K77me1) chez des souris exposées à la fumée de cigarette. Par ailleurs, l'expression de *EZH2* (Enhancer of zeste homolog 2), une HMT spécifique de la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3), est augmentée suite à une exposition de cellules bronchiques exposées à la fumée de cigarette (Wang *et al.*, 2016).

La phosphorylation des histones est également altérée suite à une exposition à la fumée de cigarette. L'augmentation de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 est d'ailleurs associée à l'activation par les composés de la fumée de cigarette de la voie p38/MAPK (Sundar *et al.*, 2012; Szulakowski *et al.*, 2006) qui favorise l'expression de gènes pro-inflammatoires.

Les modifications des histones jouent un rôle primordial dans l'expression des gènes. Les mécanismes de modifications d'histones sont nombreux, complexes et interdépendants. Cependant, de nombreuses études témoignent que la fumée de cigarette a un effet, à la fois sur les modifications et sur les enzymes impliquées. C'est pourquoi l'étude des effets de la cigarette sur ce qui est appelé le « code des histones » pourrait permettre de mieux comprendre les dérégulations observées dans le cas de pathologies liées au tabac, notamment au niveau de l'inflammation.

1.4.4.3. Les microARN

1.4.4.3.1. Biogénèse des microARN

Les microARN (miARN) sont des petits ARNs non codants d'une vingtaine de nucléotides qui peuvent contrôler l'expression génique au niveau post-transcriptionnel en s'appariant à des ARNm cibles. Les miARN sont synthétisés quasi-exclusivement par l'ARN polymérase II sous la forme de précurseurs appelés « pri-miARN ». Après une étape de maturation, ils sont clivés par Drosha, une RNase de type III, pour arriver à des structures de 60 à 70 nucléotides en épingle à cheveux appelées « pré-miARN ». Ceux-ci sont ensuite transportés du noyau vers le cytoplasme par l'exportine-5. Dicer, une autre RNase de type III prend alors en charge les pré-miARN pour cliver la boucle terminale donnant naissance aux miARN et à leur brin complémentaire miARN*. Les miARN sont alors incorporés au complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), où leur brin complémentaire est dégradé, pour former les miARN matures (Figure 7, d'après (Winter *et al.*, 2009)).

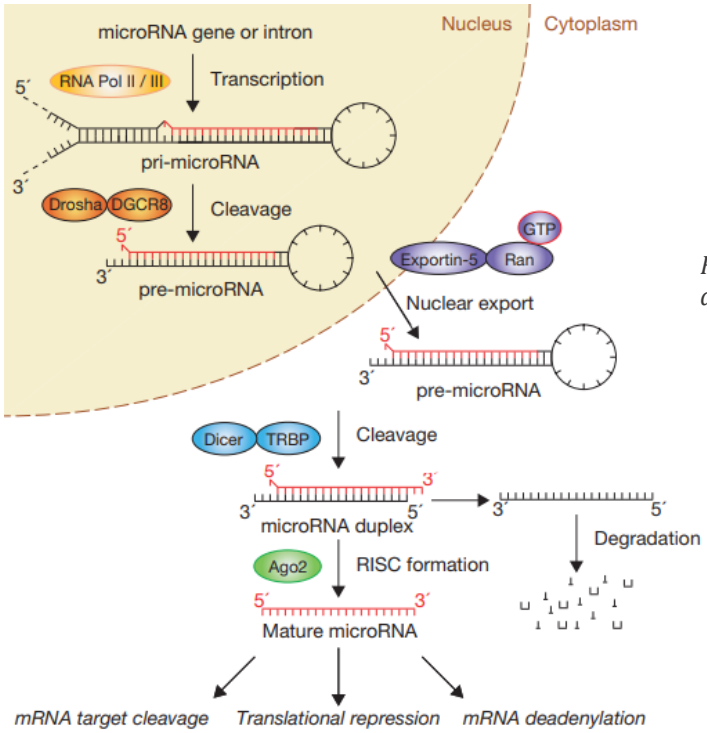


Figure 7. Schéma de la biogénèse canonique des miARN. D'après Winter et al., *2009.*

1.4.4.3.2. Rôles des miARN et implications dans le tabagisme

Les miARN peuvent réguler l'expression d'un gène de plusieurs façons : soit en induisant la dégradation des ARNm cibles, ou alors en inhibant leur traduction. Dans le cas d'une dégradation, le miARN couplé au complexe RISC (RNA-induced silencing complex) reconnaît la séquence de l'ARNm cible pour qu'il soit clivé. Dans le cas d'une inhibition de la traduction, l'appariement du miARN avec l'ARNm cible est suffisant pour

bloquer la traduction. Ce deuxième mécanisme d'action est celui majoritairement retrouvé chez les mammifères (Béné and Cartron, 2009).

Un miARN peut réguler plusieurs gènes cibles, et un gène cible peut être régulé par plusieurs miARN. De cette façon, les miARN ont un rôle dans de nombreux processus physiologiques tels que la croissance cellulaire, la prolifération, l'apoptose ou encore la différenciation (Singh et al., 2008). De plus, des altérations de l'expression de miARN ont été mises en évidence dans de nombreuses pathologies humaines (Alipoor *et al.*, 2016) et notamment dans les cancers (Calin and Croce, 2006).

Izzotti *et al.*, en 2009, ont analysé la dérégulation des miARN chez des rats exposés à la fumée de cigarette pendant 28 jours. Ils montrent que 26% des 484 miARN analysés sont sous-exprimés et 7% sont surexprimés par rapport aux rats non exposés (Izzotti *et al.*, 2009). En observant l'effet de l'arrêt du tabagisme, ils ont aussi mis en évidence que les dérégulations des miARN chez des souris exposées pendant 4 semaines sont restaurées après 1 semaine d'arrêt (Izzotti *et al.*, 2011). Cependant, chez des souris exposées pendant 4 mois à la cigarette, les changements d'expression de miARN persistent 3 mois après l'arrêt (Izzotti *et al.*, 2011). Ces travaux suggèrent que plus l'exposition à la cigarette est longue, moins les effets sur le miRNome sont réversibles et peuvent être impliqués dans le développement de pathologies. Des dérégulations ont également été mises en évidence chez l'Homme (Schembri *et al.*, 2009). L'analyse de l'ensemble des miARN sur des cellules épithéliales bronchiques issue de fumeurs montrent que 82% des miARN dérégulés sont sous-exprimés par rapport aux non-fumeurs. Mascaux et al. retrouvent également que sur les 69 miARN dérégulés, une vaste majorité est sous-exprimée (Mascaux *et al.*, 2009). Le Tableau 3 présente quelques exemples de miARN dérégulés dans le cancer du poumon et leurs cibles potentielles associées (Li *et al.*, 2019a).

Tableau 3. Exemple de miARN retrouvés dérégulés dans le cancer du poumon

Sur-exprimé	Sous-exprimé	Fonction suspectée	Espèce	Références
miR-294	miR-30, let-7, miR-10, miR-26, miR-34, miR-223, miR-122, miR-123, miR-124, miR-99, miR-125, miR-140, miR-145, miR-146, miR-191, miR-192, miR-219, miR-222	Cible p53, oncogène, STAT3, apoptose	Rat	(Izzotti *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2016)
let7e, miR-19a, miR-191, miR-142, miR-350	miR-92b, miR-668, miR-700	Suppresseur de tumeur, apoptose	Souris	(Yuchuan *et al.*)
miR-31		Cible Wnt	Humain	(Lv *et al.*, 2017; Xi *et al.*, 2010)
	let-7i, miR-154-5p	Cible NF-kB, MAPK, HIF-1	Humain	(Huang *et al.*)

Finalement, les composés toxiques contenus dans la fumée de cigarette forment un cocktail qui favorise le déséquilibre de la balance entre agressions et défenses pulmonaires. Le pouvoir addictogène de la cigarette contribue à maintenir ces dérégulations dans le temps et mène à la persistance d'un stress oxydant et d'une inflammation chronique. Par ces mécanismes, le tabagisme chronique est responsable de la dégradation des tissus pulmonaires pouvant amener à des pathologies respiratoires. De plus, la formation d'adduits à l'ADN et les modifications épigénétiques favorisées par la consommation de cigarette augmentent le risque de modifications d'expression génique. Lorsque ces modifications d'expression affectent des gènes suppresseurs de tumeurs, des oncogènes ou des gènes critiques impliqués dans des processus cellulaires importants, elles favorisent également l'apparition de cancer.

1.5. Les politiques de lutte contre le tabagisme

Il a été montré qu'il n'existe pas de seuil au-dessous duquel le tabagisme n'est pas dangereux. Actuellement, le seul moyen efficace pour ralentir le développement des pathologies associées au tabagisme et diminuer le risque de décès est le sevrage tabagique. Il est estimé que l'arrêt de la consommation du tabac à l'âge de 60, 50, 40 ou

30 ans permettrait d'augmenter respectivement d'environ 3, 6, 9 ou 10 ans l'espérance de vie (Doll *et al.*, 2004). Le sevrage tabagique est rendu difficile compte tenu du pouvoir addictogène de la nicotine présente dans le tabac. La diminution du nombre de fumeurs reste cependant une perspective majeure puisqu'elle permet à la fois de réduire le nombre de morts évitables et de réduire les dépenses et les moyens de santé impliqués dans la prise en charge des pathologies provoquées par le tabac. Pour cela, plusieurs types d'action sont mises en place par les gouvernements. Le premier niveau d'action se fait au niveau financier. Le prix du tabac est probablement la mesure la plus efficace pour réduire son utilisation. Il est estimé que pour 10% d'augmentation du prix du tabac, la consommation baisse de 3 à 4% (Levy *et al.*, 2004). En France, la hausse des taxes visant à réduire la consommation de tabac est progressive depuis quelques années, et a pour objectif de fixer le prix moyen du paquet à 10 euros ; ce prix a été atteint depuis le 1er mars 2020 pour certaines marques de cigarettes. Le deuxième niveau d'action se situe au niveau marketing. Depuis le 15 avril 2010, les fabricants de tabac se doivent d'imprimer une image dissuasive couvrant au moins 40% de l'arrière du paquet. Une autre mesure datant du 20 mai 2016, impose aux industriels du tabac de ne produire que des paquets neutres. L'objectif ici est de sensibiliser la population au risque du tabac et d'en véhiculer une image néfaste, dans le but de limiter l'accès au tabac à de nouveaux utilisateurs, mais aussi d'encourager des fumeurs à arrêter. Les différentes actions mises en œuvre semblent porter leur fruit, puisque les derniers chiffres montrent que la part de fumeurs quotidiens est passée de 28,5 % en 2014 à 24 % en 2019 (Pasquereau, 2020).

En France, près de 58% des fumeurs quotidiens souhaitent arrêter, mais l'addiction à la nicotine rend la tâche difficile (Tabac-Info-Service). Pour cela, en plus d'un accompagnement psychologique proposé aux fumeurs, il existe des solutions médicamenteuses non-nicotiniques et nicotiniques. La pharmacothérapie non-nicotinique consiste à agir directement sur le système nerveux en imitant l'action de la nicotine. Les médicaments prescrits (bupropion, varénecline et cytisine) visent ainsi à réduire l'envie de fumer et les symptômes de manque, et diminuent les effets plaisants de la cigarette et des autres produits du tabac. La pharmacologie par des traitements nicotiniques de substitution (TNS) est disponible sous la forme de gommes à mâcher, de pastilles à sucer, de patches, d'inhalateurs ou encore de sprays nasaux. Ces traitements permettent de réduire l'envie de fumer et les symptômes de manque en délivrant une dose contrôlée de nicotine sans les autres produits toxiques retrouvés dans la fumée de

cigarette. Le but étant de diminuer les doses graduellement jusqu'à ce que l'utilisateur puisse se passer de nicotine. Les taux de réussite de sevrage tabagique sont faibles (environ 5%) surtout en l'absence d'aide pharmacologique. En effet, la majorité des personnes ayant essayé d'arrêter de fumer continue à consommer du tabac avec des périodes d'abstinence et de rechute (Lagrue, 2005). En France, l'aide au sevrage tabagique consiste en un accompagnement psychologique par un professionnel de santé, permettant d'aider le fumeur à modifier son comportement. Cette thérapie comportementale peut être accompagnée ou non de traitements pharmacologiques.

Ainsi, même si les différents traitements pharmacologiques disponibles (nicotiniques ou non-nicotiniques) apparaissent comme efficaces (Cahill *et al.*, 2014; Le Foll and George, 2007), le taux de rechute à long terme une fois les traitements arrêtés sont les mêmes qu'en l'absence de traitements (Alpert *et al.*, 2013). C'est pourquoi, il y a une nécessité d'apporter de nouvelles solutions plus efficaces permettant une aide au sevrage tabagique sur le long terme.

2. Les nouveaux produits de délivrance de nicotine

Depuis quelques années, des nouveaux produits permettant de délivrer de la nicotine sont apparus sur le marché. L'OMS distingue deux dispositifs : les Systèmes Electroniques de Délivrance de Nicotine (SEDN) et les produits du tabac chauffé. Les SEDN appelés aussi cigarette électronique ou e-cig sont des systèmes qui chauffent un liquide pour créer un aérosol inhalable par l'utilisateur. Le liquide contient de la nicotine, ou non, mais pas de tabac. Les produits du tabac chauffé sont des dispositifs électroniques qui génèrent un aérosol à partir de feuilles de tabac. Ces produits pourraient être de nouvelles solutions dans l'aide à l'arrêt de la cigarette. Cependant, l'OMS émet des réserves sur leur innocuité et ne conseille pas leur utilisation tant que les risques sanitaires ne seront pas clairement identifiés, d'où l'intérêt d'évaluer rapidement leur impact sur la santé humaine.

2.1. La cigarette électronique

2.1.1. Epidémiologie du vapotage

Le principe de l'e-cig a été inventé en 2003 par un pharmacien chinois Hon Lik (Hajek *et al.*, 2014) et consiste à générer un aérosol à partir d'une solution appelée e-liquide contenant, ou non, de la nicotine. Lors de l'inhalation, le e-liquide est transformé en « vapeur » ou « e-vapeur », permettant de véhiculer la nicotine et mimant la fumée de la

cigarette conventionnelle. Les utilisateurs d'e-cig sont appelés « vapoteurs » et l'action de « vapoter » fait même son entrée dans le dictionnaire en 2015.

Introduite sur le marché européen en 2006 et américain en 2007 (Noel *et al.*, 2011), l'e-cig se développe et évolue rapidement dans les années 2010. Les chiffres européens montrent que sur 27 000 personnes interrogées en 2017, 15 % ont déjà essayé au moins une fois l'e-cig (contre 12 % en 2014). Les français sont parmi ceux qui l'expérimentent le plus, avec plus d'un fumeur sur deux qui l'a déjà essayée (55 %) (Pasquereau *et al.*, 2017). En France, en 2019, la prévalence du vapotage quotidien était de 4,4 % chez les 18-75 ans. Un chiffre en hausse puisqu'elle n'était que de 3,0 % en 2014 (Pasquereau, 2020).

Entre 2014 et 2017, en France métropolitaine, la part de fumeurs quotidiens a diminué de 64,5 % à 39,7 % chez les vapoteurs alors que la part des ex-fumeurs a augmenté de 23,5 % à 49,5 % (Pasquereau, 2020). Ces résultats suggèrent que l'e-cig pourrait aider les fumeurs à arrêter le tabac. Dans le même temps, de plus en plus d'études s'interrogent sur l'efficacité de l'e-cig pour le sevrage tabagique. Deux études britanniques montrent même qu'avec un accompagnement, le taux d'abstinence est plus élevé qu'avec certains TNS classiques (Hajek *et al.*, 2019; Jackson *et al.*, 2019).

2.1.2. Cadre réglementaire de l'e-cig

En Europe, la directive sur les produits du tabac (TPD pour « *Tobacco Product Derived* » en anglais) de 2014 avait classé l'e-cig comme un « produit dérivé du tabac » pour mieux encadrer leur commercialisation. Cette directive a été transposée dans le droit français en 2016 par l'ordonnance 2016-623. L'e-cig, qui est en France un produit de consommation, rentre dans la catégorie des « produits de vapotage ». Cette ordonnance vise surtout à encadrer les ventes de e-liquides et leur composition. Un fabricant doit ainsi d'abord soumettre un dossier de mise sur le marché à l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Alimentaire, de l'Environnement et du travail) 6 mois avant de mettre en vente son e-liquide nicotiné. De plus, la mention du mot « tabac » est prohibée pour les produits du vapotage.

Depuis le 1er octobre 2017, l'utilisation de l'e-cig dans les lieux publics est limitée. Elle est interdite dans les établissements scolaires et ceux destinés à l'accueil, à la formation et à l'hébergement des mineurs, dans les moyens de transports collectifs fermés et dans les lieux de travail fermés et couverts à l'usage collectif.

2.1.3. Principe de fonctionnement

L'e-cig peut prendre aujourd'hui de nombreuses formes, mais ses composants et son fonctionnement restent essentiellement identiques. Il est possible de distinguer 3 parties : un réservoir, un atomiseur, et une batterie (Figure 8). Le réservoir sert à contenir le e-liquide, l'atomiseur est composé d'une résistance, tandis que la batterie alimente celle-ci. Lors d'une prise de bouffée, le e-liquide contenu dans le réservoir, aussi appelé « clearomiseur », est chauffé par la résistance. Le e-liquide est amené jusqu'à la résistance par capillarité à travers une matière absorbante, constituée de fibre de silice ou de coton. Le réservoir possède deux ouvertures : une entrée d'air, permettant de faire circuler le flux d'air qui va générer l'aérosol, et une sortie, équipée d'un embout buccal ou « drip tip » pour faire sortie la vapeur.

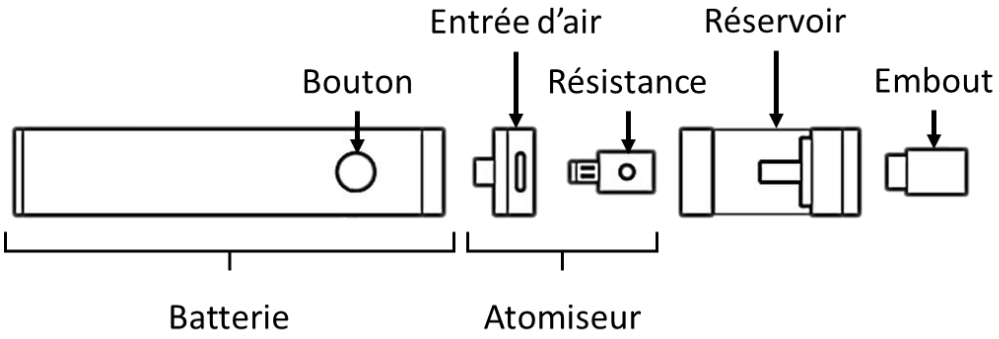


Figure 8. Schéma général d'une e-cig et de ses différents composants (d'après e-fumeur.com)

Dans les premiers modèles, la résistance chauffait automatiquement dès que l'utilisateur aspirait afin de mimer le fonctionnement d'une cigarette classique. Les nouveaux modèles sont quant à eux munis d'un bouton qui permet notamment à l'utilisateur de préchauffer la résistance pour qu'au moment de l'aspiration, l'aérosol généré soit suffisamment dense. Ces derniers modèles sont aujourd'hui majoritaires sur le marché.

2.1.4. Les différents modèles

Le marché de l'e-cig a bien évolué depuis la sortie des premiers modèles, en termes de design mais également de technologie. Les différents dispositifs sont souvent classés en 3 catégories : première, deuxième et troisième générations (Walley *et al.*, 2019).

1. *Première génération*

Les e-cig de première génération prennent le plus souvent l'apparence d'une cigarette, c'est pourquoi elles sont aussi appelées « *cig-a-like* » (Figure 9). Ces e-cig sont la plupart du temps jetables, mais peuvent aussi être rechargeables par le biais de cartouches pré-remplies d'e-liquide. Elles n'ont peu, voire pas de choix d'arômes, et leurs composants internes ne peuvent pas être modifiés.

Figure 9. E-cig de première génération ou « cig-a-like » (d'après www.stop-tabac.ch)

2. *Deuxième génération*

La deuxième génération d'e-cig se distingue par un design différent de la cigarette conventionnelle, plus coloré (Figure 10). Contrairement à la génération précédente, ces e-cig sont réutilisables. Elles sont constituées d'un réservoir de e-liquide rechargeable. Cette caractéristique permet d'élargir le champ d'arômes disponibles et d'en changer plus facilement. Elle permet aussi d'ajuster le taux de nicotine plus facilement et de manière plus précise.

Figure 10. Illustration de plusieurs modèles différents d'e-cig de deuxième génération (d'après U.S. Department of Health and Human Services)

3. *Troisième génération*

Les modèles de troisième génération sont aussi appelés « Tank », de par leur contenance plus importante en e-liquide, ou aussi « Mods », pour modifiables. Ces e-cigs ont des designs assez variés et leur taille est souvent supérieure à celle des e-cigs de deuxième génération (Figure 11). Leur caractéristique particulière est qu'elles possèdent une carte électronique reliée à leur batterie qui contrôle directement, sans changer de composant, le voltage (Volts) et la puissance (Watts). Ceci permet aux utilisateurs de modifier, la densité et la température de l'aérosol créé. Ces paramètres sont primordiaux dans l'utilisation des e-cig puisque qu'ils vont déterminer le « hit », c'est-à-dire l'effet que recherche un fumeur au niveau de la gorge, qui correspond à la délivrance de la nicotine lors d'une bouffée. C'est un paramètre difficile à évaluer puisque le hit recherché pour un utilisateur n'est pas forcément valable pour un autre. Pour pallier à ce problème, le vapoteur peut changer par exemple la valeur de sa résistance, en jouant sur la longueur, l'épaisseur et les métaux qui la composent.

Figure 11. Illustration de plusieurs modèles d'e-cig de troisième génération (d'après U.S. Department of Health and Human Services)

4. *Autres modèles*

Les e-cig ont également été déclinées sous d'autres formes permettant d'imiter d'autres produits dérivés du tabac. Parmi ces produits peuvent être cités les e-cigares, les e-shishas ou encore les e-pipes.

Suite à l'arrivée des e-cig de troisième génération qui peuvent paraître trop élaborées pour certains utilisateurs, une vague de dispositifs plus simples d'utilisation a fait son apparition plus récemment sur le marché, notamment avec la marque JUUL (Figure 12). Ces e-cig sont un retour à l'essentiel : elles sont rechargeables avec des « pods » qui contiennent du e-liquide. Elles sont plus petites et ont un design plus travaillé, plus moderne, ressemblant par exemple à des clefs USB. Ces e-cig, de par leur marketing essentiellement dirigé vers les jeunes, posent un problème car elles pourraient être une porte d'entrée à la consommation de nicotine.

Figure 12. E-cig de la marque JUUL et ses pods de recharge contenant le e-liquide.

2.1.5. Les e-liquides et leur composition

Le e-liquide est le consommable principal de l'e-cig. Il est chauffé jusqu'à son point de vaporisation pour générer un aérosol qui va permettre de délivrer la nicotine à l'utilisateur. Depuis 2016, une directive européenne indique que les flacons contenant de la nicotine ne peuvent pas dépasser un volume de 10 mL et que la concentration en nicotine ne doit pas excéder 20 mg/mL. Un e-liquide est composé généralement de propylène glycol et de glycérol en proportion variable et d'arômes très différents. Ils peuvent être supplémentés, ou non, de nicotine. De l'eau, de l'éthanol, et certains additifs peuvent également être retrouvés en quantités variables (Office Français de prévention du Tabagisme, 2013). C'est le mélange propylène glycol/glycérol qui permet de générer l'aérosol une fois la température de vaporisation atteinte. Le propylène glycol est également utilisé comme exhausteur d'arôme, alors que le glycérol est plutôt responsable de l'abondance et de la densité de la vapeur. En effet, selon la proportion des deux produits, la vapeur générée ne sera pas la même. Plus la teneur en propylène glycol est élevée, plus le goût sera prononcé, et plus celle en glycérol sera élevée, plus la vapeur sera

abondante. Sur le marché actuel, les e-liquides classiques commercialisés ont un ratio propylène glycol/glycérol compris entre 80/20 et 70/30 afin de garder un bon équilibre saveur/vapeur. Mais d'autres proportions existent, notamment des e-liquides à teneur élevée de glycérol qui permettent de faire beaucoup plus de vapeur. Enfin, il est aussi possible pour l'utilisateur d'acheter séparément les différents composants d'un e-liquide afin de faire le mélange lui-même.

En 2014, le nombre de e-liquides différents sur le marché mondial était estimé à 7764 (Zhu *et al.*, 2014). Cependant, un rapport récent de l'ANSES estime à plus de 25000 le nombre de e-liquides différents disponibles sur le marché sur la période 2019-2020, avec plus de 1200 substances utilisées comme ingrédient (ANSES, 2020). Ces données rendent compte de la difficulté d'évaluer la toxicité de chacun de ces e-liquides. En revanche, ce que l'on sait c'est que les différents composants pris individuellement ne semblent pas présenter de danger particulier. D'abord, le propylène glycol est utilisé depuis longtemps pour simuler la fumée dans les cinémas ou dans les concerts par exemple. Il est aussi utilisé comme humectant par l'industrie pharmaceutique, cosmétique ou encore l'industrie du tabac, empêchant par exemple les cigarettes classiques de se dessécher. Le propylène glycol et le glycérol font tous les deux parties de la liste des substances alimentaires GRAS (Generally Recognized As Safe) qui n'ont pas besoin d'évaluation avant mise sur le marché car elles sont considérées comme sans danger (FDA). Cette classification ne prend cependant pas en compte l'aérosolisation de ces composés ni l'exposition répétée sur le long terme par inhalation, ce qui pourrait modifier leurs effets sur l'organisme.

La nicotine retrouvée dans les e-liquides est le plus souvent extraite de plants de tabac. Sa concentration est contrôlée en France depuis l'ordonnance de 2016 (10 mL à 20 mg/mL maximum). Bien que la nicotine sous forme liquide présente un danger non négligeable d'intoxication cutanée ou par ingestion, sa toxicité directe par inhalation sous forme d'aérosol n'est pas encore clairement établie.

Concernant les arômes, il en existe une multitude sur le marché d'origine naturelle ou artificielle ; il est donc difficile d'analyser la toxicité de chacun. Les arômes les plus populaires en Europe sont d'abord les arômes au goût fruité, puis le goût tabac et en troisième le goût mentholé (Eurobaromètre, 2017). Ils sont souvent issus d'un mélange d'arômes utilisés dans l'industrie agroalimentaire, et sont donc sans danger dans le cas

d'une ingestion. Cependant, leurs effets par inhalation sont pour la plupart inconnus et leur innocuité reste donc à démontrer (Tierney *et al.*, 2016).

2.1.6. Composition des aérosols d'e-cig

De façon générale, l'e-cig apparaît comme moins nocive que la cigarette conventionnelle, notamment du fait de l'absence de combustion durant la génération de l'aérosol. L'analyse de la composition chimique des émissions constitue alors une étape préliminaire indispensable afin d'évaluer leur toxicité. En effet, si les différents composants d'un e-liquide sont relativement bien caractérisés lorsqu'ils sont en solution, leur transformation en aérosol peut générer des produits secondaires qui pourraient être dangereux pour l'utilisateur. La classification GRAS de la FDA ne s'applique justement pas à l'aérosolisation des substances, et il y a peu d'études sur le long terme analysant les effets d'une inhalation de propylène glycol ou de glycérol chez l'Homme. Cependant, il est admis que ces composés peuvent former des aldéhydes toxiques lorsqu'ils sont chauffés (Sleiman *et al.*, 2016). En plus de ces transformations chimiques, des composants de l'e-cig peuvent aussi être relargués dans les émissions exposant, par exemple, les voies respiratoires à des métaux potentiellement toxiques (Williams *et al.*, 2013, 2017). La composition finale de l'aérosol peut ainsi devenir très différente de celle du e-liquide de base et l'effet « cocktail » des différents composés primaires et/ou secondaires présents pourrait être nocif.

De nombreux articles ont fait état de la composition chimique des aérosols d'e-cig. Une revue récente a recensé une centaine d'articles sur le sujet (Ward *et al.*, 2020). Jusqu'à maintenant cinquante-six articles ont mesuré la présence de composés carbonylés, 7 pour les HAP, 19 pour les COV, 16 pour les métaux, 10 pour les ERO et les radicaux libres, 16 pour les nitrosamines. Globalement, la majorité des études retrouvent ces composés à des concentrations très inférieures à celles mesurées dans la fumée de cigarette. Mais certaines détectent des quantités de composés carbonylés plus importantes. Cependant, en 2018, une étude met en évidence les biais méthodologiques qui peuvent exister lors de la caractérisation des émissions à travers l'analyse de 32 articles mesurant la quantité en composés carbonylés dans les aérosols d'e-cig (Farsalinos and Gillman, 2018). En effet, cette analyse montre que certaines études, qui retrouvent des quantités de composés carbonylés plus importantes (Hutzler *et al.*, 2014; Sleiman *et al.*, 2016; Uchiyama *et al.*, 2016), ont généré les aérosols dans des conditions d'utilisation extrêmes appelées « *dry*

puff ». Ce phénomène arrive lorsque le profil de bouffée n'est pas adapté et que la mèche de coton n'a pas le temps d'amener le e-liquide par capillarité jusqu'à la résistance. Celle-ci n'est alors pas refroidie par le passage du e-liquide et peut atteindre des températures bien plus élevées que la normale (Geiss *et al.*, 2016). Cependant, les « *dry puffs* » sont aversives pour le vapoteur et ne représentent pas la réalité des expositions. Ceci montre alors l'importance du profil de bouffée et des paramètres utilisés dans les études de compositions des émissions d'e-cig. Contrairement à la cigarette, il n'existe pas de profil de bouffée standardisé, ce qui peut remettre en question la pertinence des résultats et rendre difficiles les comparaisons inter-laboratoires (Cheng, 2014). De plus, les conditions de collecte pour en étudier la composition chimique peuvent être différentes selon les laboratoires pour un même composé recherché. Pour les composés carbonylés, par exemple, la collecte peut se faire sur cartouche de silice imprégnée de 2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH), dans des barboteurs remplis d'une solution de DNPH ou encore sur des cartouches de charbon actif. Ces différences de méthodologies sont importantes à prendre en compte et montrent l'intérêt d'évaluer plusieurs modèles d'e-cig de la même façon afin de faciliter les comparaisons. Des méthodes ont déjà été développées au laboratoire et ont permis de quantifier des composés carbonylés, les HAP, certains COV et certains métaux dans les aérosols d'e-cig (Beauval *et al.*, 2016, 2017, 2019). Ces études ont montré notamment que les émissions d'e-cig de 2ème génération avaient des niveaux de HAP, de composés carbonylés et de métaux bien inférieurs à ceux de la fumée de cigarette. La dernière étude en date a notamment mis en évidence des différences de compositions en composés carbonylés émis par une e-cig de 3ème génération en fonction des profils de bouffée (durée, volume et fréquence) utilisés pour générer les aérosols d'e-cig. Elle confirme la nécessité de standardiser les profils de bouffée utilisés afin pouvoir comparer la composition des aérosols.

Enfin, les derniers modèles d'e-cig, de troisième génération ont une puissance réglable. Cependant, augmenter la puissance augmente aussi la température de chauffe du e-liquide. Certaines études montrent déjà une relation entre l'augmentation de température et la génération d'un plus grand nombre de composés toxiques (Geiss *et al.*, 2016; Gillman *et al.*, 2016; Korzun *et al.*, 2018, 2018; Salamanca *et al.*, 2017; Uchiyama *et al.*, 2020). Encore une fois, une étude provenant de notre laboratoire, en accord avec la littérature, a montré qu'augmenter la puissance délivrée par l'e-cig induisait une génération plus importante de composés carbonylés (Beauval *et al.*, 2019). Les

caractéristiques et la puissance grandissante des nouveaux modèles pourraient alors avoir des effets toxiques plus importants au niveau cellulaire et moléculaire.

Même si les différents composés sont retrouvés à des concentrations bien inférieures à celles retrouvées dans la cigarette classique, cela pourrait suffire à induire une toxicité au niveau des voies respiratoires. Il est alors nécessaire de mener des études toxicologiques pour évaluer le risque des émissions d'e-cig.

2.1.7. Etats des connaissances sur la toxicité *in vitro* de l'e-cig

2.1.7.1.Analyses toxicologiques sur cultures immergées

L'e-cig reste un sujet controversé puisque son rapport bénéfices/risques est encore mal identifié. Les faibles teneurs en produits toxiques dans les aérosols ne constituent pas un argument suffisant pour valider l'utilisation des e-cig en tant qu'aide au sevrage tabagique. Des études toxicologiques ont déjà été menées mais la nouveauté de ces dispositifs signifie aussi une absence de standardisation dans les protocoles de recherche. Alors que certains laboratoires exposent des cellules en diluant le e-liquide directement dans le milieu de culture, d'autres utilisent des extraits d'aérosol d'e-cig pour leurs études toxicologiques *in vitro*. Ces extraits d'aérosols sont d'abord générés avec une e-cig, puis solubilisés dans le milieu de culture cellulaire.

2.1.7.1.1. Cytotoxicité des e-liquides

Les études analysant la cytotoxicité des e-liquides sont résumées dans le Tableau 4. Une équipe a testé la toxicité de 36 e-liquides différents avec différents arômes et différentes concentrations de nicotine sur différents types cellulaires (Bahl *et al.*, 2012). Leurs résultats montrent que le e-liquide à l'arôme cannelle, par son dérivé secondaire le cinnamaldéhyde, est celui qui induit la toxicité cellulaire la plus importante. D'autres arômes ont également été montrés comme cytotoxiques tels que « chocolat noir suisse », « menthol arctique » ou « caramel au beurre salé ». La toxicité de l'arôme cannelle a été confirmée par une deuxième étude plus approfondie du même laboratoire qui a évalué 8 e-liquides à l'arôme cannelle de marque différente et montre une cytotoxicité importante (Behar *et al.*, 2014). Une exposition de cellules immortalisées de l'épithélium bronchique humain aux arômes « vanille » et « chocolat » montre une cytotoxicité et une diminution de la résistance transépithéliale (Sherwood and Boitano, 2016). Les arômes à base d'acétoïne, de diacétyle, de pentanedione, et de maltol induisent une augmentation de la

sécrétion d'IL-8 dans deux lignées cellulaire bronchiques humaines (BEAS-2B et H292) (Gerloff *et al.*, 2017).

Tableau 4. Résumé des études citées utilisant un mode de culture immergé et une exposition directe aux e-liquides

Etude	Modèle cellulaire	E-liquide	Principaux résultats
(Bahl *et al.*, 2012)	Culture primaire de cellules souches embryonnaires humaines, de cellules souches neurales murines et de fibroblastes pulmonaires humains	36 e-liquides de marques et d'arômes différents	- Cytotoxicité n'est pas dépendante de la nicotine mais des arômes présents dans le e-liquide
(Wu *et al.*, 2014)	Culture primaire de cellules trachéobronchiques humaines	E-liquide, arôme tabac, avec différentes concentrations de nicotine	- Pas de cytotoxicité - Diminution de l'activité antimicrobienne
(Behar *et al.*, 2014)	Culture primaire de cellules souches embryonnaires humaines et de fibroblastes pulmonaires humains	8 e-liquides à l'arôme cannelle de marque différente	- Cytotoxicité est proportionnelle à la quantité de cinnamaldéhyde et de 2-méthoxycinnamaldéhyde
(Sherwood and Boitano, 2016)	Lignée immortalisée de cellules de l'épithélium bronchique humain (16HBE14o)	Arômes dilués directement dans le milieu	- Cytotoxicité et diminution de la résistance trans-épithéliale après expositions aux arômes vanille ou chocolat
(Gerloff *et al.*, 2017)	Lignées cellulaires immortalisées d'épithélium bronchique humain (BEAS-2B), Lignée cancéreuse bronchique humaine (H292)	Arômes et nicotine dilués directement dans le milieu directement	- Pas de cytotoxicité - Acétoïne, diacétyl, pentanedione et maltol ont induit une augmentation de la sécrétion d'IL-8

Cependant, les utilisateurs d'e-cig ne sont pas en contact direct avec les e-liquides mais avec les aérosols générés. De ce fait, la toxicité mesurée dans les études précédemment citées ne reflète pas la réalité des expositions. En effet, le chauffage du e-liquide peut générer d'autres dérivés secondaires qui peuvent être plus toxiques. Il est nécessaire d'étudier la toxicité *in vitro* des aérosols générés.

2.1.7.1.2. Cytotoxicité des extraits solubilisés d'aérosol d'e-cig

Les études utilisant ce type de protocole ont la plupart du temps mis en évidence des effets toxiques liés à certains arômes. Sur les 21 e-liquides testés par Romagna *et al.* sur des fibroblastes murins, seul l'arôme café induisait une baisse de viabilité de 50 % (Romagna et al., 2013). De la même façon, une autre étude mesurant l'effet de 20 extraits

d'aérosols sur des cellules myocardiques montrait également que la cytotoxicité induite par 4 d'entre eux était liée aux arômes (Farsalinos *et al.*, 2013). Leslie *et al.* ont observé que les arômes fraise, cerise et tabac pouvaient également être cytotoxiques sur 7 types cellulaires d'origine pulmonaire (Leslie *et al.*, 2017). Enfin, Behar *et al.* ont mis en évidence qu'en exposant deux types de cellules pulmonaires à des extraits d'aérosols avec ou sans ces arômes, une cytotoxicité était observée uniquement en présence d'arômes (Behar *et al.*, 2018). Dans le même temps, certaines études ont également évalué l'impact cytotoxique de la concentration en nicotine dans les extraits d'aérosol. Les résultats révèlent que la toxicité observée est due en plus grande partie aux arômes présents qu'à la quantité de nicotine (Bengalli *et al.*, 2017; Farsalinos *et al.*, 2013; Higham, 2016; Leslie *et al.*, 2017). Misra *et al.* n'ont pas retrouvé de génotoxicité, de cytotoxicité ou même d'inflammation suite à l'exposition de cellules pulmonaires aux extraits d'aérosols d'e-cig (Misra *et al.*, 2014). Cependant, il a été montré, plus récemment, qu'avec ou sans nicotine, les extraits d'aérosols d'e-cig pouvaient induire la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires IL-8 et MMP-9 (Higham, 2016). En revanche, en comparant les effets cytotoxiques avec ceux provoqués par des extraits de fumée de cigarette, toutes les études s'accordent à dire que les extraits d'aérosol d'e-cig sont significativement moins toxiques (Bengalli *et al.*, 2017; Chun *et al.*, 2017; Farsalinos *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2016). Bien que les extraits d'aérosols solubilisés soient une solution pour faciliter les études de toxicité *in vitro* sur l'e-cig, ils ne permettent pas une exposition des cellules pulmonaires dans des conditions réalistes. En effet, il est nécessaire d'exposer les cellules directement aux aérosols d'e-cig pour analyser l'ensemble des potentiels effets cytotoxiques. Le Tableau 5 reprend l'ensemble des études citées précédemment.

Tableau 5. Résumé des études citées utilisant un mode de culture immergé et des extraits d'aérosols d'e-cig

Etude	Modèle cellulaire	E-cig	Principaux résultats
(Romagna *et al.*, 2013)	Lignée de fibroblastes murins (3T3)	510T, Omega Vape (2ème génération)	- Seul l'extrait d'e-liquide arôme café induit une cytotoxicité. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Farsalinos *et al.*, 2013)	Lignée myocardique de rat (H9c2)	eGO Joyetech (2ème génération)	- 4 e-liquides sur 20 testés ont des effets cytotoxiques (3 arômes tabac, un arôme « cookie »). - Cytotoxicité associée aux arômes mais pas à la concentration en nicotine.
(Leslie *et al.*, 2017)	Lignées cellulaires immortalisées d'épithélium bronchique humain (BEAS-2B, IB3-1, C38, CALU-3	Modèles non précisés (2ème génération)	- E-cig moins toxique que la cigarette. - Cytotoxicité associée aux arômes fruités mais pas à la concentration en nicotine.
(Behar *et al.*, 2018)	Lignée cancéreuse alvéolaire humaine (A549), culture primaire de fibroblastes pulmonaires humains (hPFs)	Innokin iClear16 (2ème génération), Innokin iTaste MVP 3.0 (3ème génération)	- Cytotoxicité sur les deux types cellulaires. - 12 des 39 arômes testés ont induit une cytotoxicité. - Extraits générés avec une batterie de 5V sont plus cytotoxiques que ceux avec une batterie de 2V.
(Higham, 2016)	Culture primaire de neutrophiles humains	3 marques d'e-cig : VIP, KIK et Puritane (1ère génération)	- Les extraits d'aérosols d'e-cig ont induit la sécrétion de MMP-9 et IL-8. - Activation de la voie p38/MAPK. - Les effets sont dus aux arômes plutôt qu'à la concentration en nicotine.
(Bengalli *et al.*, 2017)	Lignée cancéreuse alvéolaire humaine (A549)	iSimple Ribilio (2ème génération)	- La cytotoxicité observée est due aux arômes menthe et cannelle, mais pas à la nicotine.
(Misra *et al.*, 2014)	Lignée cancéreuse alvéolaire humaine (A549)	Blu e-cig (1ère génération)	- Extraits d'aérosol d'e-cig avec ou sans nicotine ni arômes n'ont pas induits de cytotoxicité. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Taylor *et al.*, 2016)	Lignée cancéreuse bronchique humaine (H292)	Marque VYPE (2ème génération)	- Pas de cytotoxicité observée après exposition aux extraits d'aérosols d'e-cig. - E-cig moins toxique que la cigarette.

2.1.7.2. Analyses toxicologiques sur cultures en interface air-liquide

Pour se rapprocher de la réalité des expositions aux aérosols d'e-cig, certaines d'études ont été réalisées sur des cultures en interface air-liquide (IAL) (Tableau 6). Ce type de culture permet de maintenir le pôle basal des cellules en contact avec le milieu de culture alors que le pôle apical est directement exposé à l'air ambiant. Lors des analyses toxicologiques, les aérosols générés sont ainsi directement en contact avec le tapis cellulaire (Figure 13). La culture cellulaire en IAL mime de façon plus fidèle les interactions entre l'aérosol et les cellules des voies respiratoires. En utilisant ce type d'exposition, Cervellati et al. ont montré que l'exposition aux émissions d'e-cig induisait la sécrétion des cytokines IL-1, et IL-8, IL-10 ou TNF-a dans la lignée cancéreuse pulmonaire humaine A549 (adénocarcinome pulmonaire) (Cervellati *et al.*, 2014). La sécrétion d'IL-6 a également été mise en évidence dans la lignée cancéreuse pulmonaire humaine H292 (cancer pulmonaire épidermoïde) (Lerner *et al.*, 2015). Deux autres études confirment la modulation de la réponse inflammatoire suite à l'exposition aux aérosols d'e-cig de cultures primaires de cellules bronchiques humaines (NHBE) (Iskandar *et al.*, 2016) ou de cellules immortalisées de l'épithélium bronchique humain (BEAS-2B) (Anthérieu *et al.*, 2017). Pourtant, contrairement à ce qui a été observé par Cervellati et al., ces modulations ne s'accompagnent pas d'une diminution de la viabilité cellulaire. Ces données concordent avec d'autres études qui n'observent que très peu de cytotoxicité sur un modèle de culture 3D d'épithélium trachéo-bronchique reconstitué (EpiAirway™) (Czekala, 2019; Neilson *et al.*, 2015). Quelques études montrent des résultats différents en mettant en évidence une mort cellulaire de cellules NHBE (Scheffler *et al.*, 2015) et de cellules A549 (Hwang *et al.*, 2016). Une autre équipe observe une baisse de l'activité métabolique et de la viabilité cellulaire des cellules H292 (Leigh *et al.*, 2016). Des analyses

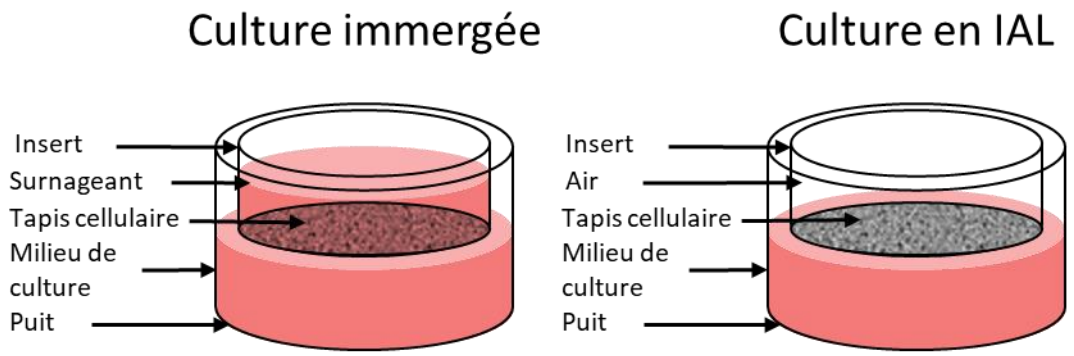


Figure 13. Schéma du mode de culture cellulaire immergée (à gauche) et en interface air-liquide (IAL) (à droite)

transcriptomiques ont déjà été effectuées dans le but d'identifier de potentielles modifications induites par les émissions d'e-cig. Une étude menée au laboratoire a montré qu'avec ou sans arôme, les aérosols n'induisaient quasiment pas de modifications d'expression génique sur les cellules BEAS-2B (Anthérieu *et al.*, 2017). Haswell *et al.* ont également retrouvé peu de modifications transcriptomiques sur un modèle 3D de culture primaire de cellules bronchiques (Haswell *et al.*, 2017). Une grande partie de ces études a été réalisée sur des modèles d'e-cig de deuxième génération de puissance fixe. Une étude a cependant comparé plusieurs e-cig de deuxième génération et de puissance différente et a observé que les effets cytotoxiques étaient plus importants lorsque la puissance était plus élevée (Leigh *et al.*, 2016). Comme précédemment, les études utilisant des cultures en IAL montrent que les aérosols d'e-cig sont moins nocifs que la fumée de cigarette classique en termes de viabilité cellulaire, d'inflammation, de stress oxydant et de modifications transcriptomiques (Anthérieu *et al.*, 2017; Azzopardi *et al.*, 2016; Iskandar *et al.*, 2016; Leigh *et al.*, 2016; Scheffler *et al.*, 2015).

La multiplicité des protocoles (profil de bouffée, e-cig, e-liquide, modèle cellulaire) rend difficile la comparaison et l'harmonisation de toutes les études disponibles. Cependant, les résultats sont pour la plupart concordants. Les émissions d'e-cig induisent peu, voire pas de diminution de la viabilité cellulaire. En revanche, un certain nombre d'étude démontre une modulation de l'inflammation et quelques-unes une augmentation du stress oxydant. De plus, même si les aérosols d'e-cig sont tout de même bien moins cytotoxiques que la fumée de cigarette, ils pourraient, à long terme, être impliqués dans l'apparition de processus pathologiques. Les études toxicologiques *in vitro* sont importantes pour faire des études de screening et des études mécanistiques sur des types cellulaires précis. Mais des études *in vivo* sont également nécessaires afin de déterminer les effets des émissions d'e-cig à plus long terme et sur un organisme entier.

Tableau 6. Résumé des études citées sur la cytotoxicité de l'e-cig utilisant un mode de culture en interface air-liquide. N.C. = Non Communiqué

Etude	Modèle cellulaire	E-cig	Profil de bouffée	Principaux résultats
(Cervellati *et al.*, 2014)	Lignée cancéreuse alvéolaire humaine (A549)	Modèle non précisé	Exposition de 50 minutes en continu	- Sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Lerner *et al.*, 2015)	Lignée cancéreuse bronchique humaine (H292)	Batterie eGO, clearomiseur Anyvape (2ème génération)	N.C./4/30 pendant 5, 10 ou 15 min	- Sécrétion d'IL-6 et IL-8 de façon dose-dépendante.
(Iskandar *et al.*, 2016)	Culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines (NHBE)	Modèle non précisé (2ème génération)	55/3/30 pendant 55 ou 115 min	- Pas de cytotoxicité mais sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. - Arôme semble avoir plus d'effet sur la cytotoxicité que la nicotine. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Anthérieu *et al.*, 2017)	Lignée immortalisée bronchique humaine (BEAS-2B)	Lounge Nhoss (2ème génération)	55/3/30 pendant 8 ou 48 min	- Pas de cytotoxicité, ni de stress oxydant. - Sécrétion d'IL-6. - Très peu de gènes dérégulés par rapport à la cigarette. - Ni la nicotine, ni l'arôme n'ont d'effets sur la toxicité de l'e-cig. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Neilson *et al.*, 2015)	Culture primaire d'épithélium trachéo-bronchique humain (EpiAirway)	NJOY (1ère génération)	80/3/30 jusqu'à 6 h	- Pas de cytotoxicité observée. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Czekala, 2019)	Culture primaire de l'épithélium trachéo-bronchique humain (EpiAirway)	Blu PLUS (2ème génération	55/3/30 jusqu'à 120 min	- Aucun effet sur la sécrétion de médiateurs de l'inflammation ou sur l'intégrité de l'ADN. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Scheffler *et al.*, 2015)	Culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines (NHBE)	Modèle non précisé	35/2/N.C. jusqu'à 200 bouffées	- L'e-cig génère 4,5 à 5 fois moins de stress oxydant que la cigarette. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Hwang *et al.*, 2016)	Lignée cancéreuse alvéolaire humaine (A549)	Modèles de 2ème génération	Aérosol généré en continue pendant 15 min	- Induction de mort cellulaire.
(Leigh *et al.*, 2018)	Lignée cancéreuse bronchique humaine (H292)	Blu (1ère génération), Blu Plus et eGO (2ème génération)	55/2/30 pendant 110 min	- Diminution de l'activité métabolique. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Haswell *et al.*, 2017)	Modèle 3D de cellules primaires épithéliales bronchiques humaines (MucilAir)	Vype ePen (2ème génération)	55/3/30 jusqu'à 60 min	- Peu de modifications transcriptomiques. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Azzopardi *et al.*, 2016)	Lignée cancéreuse bronchique humaine (H292)	Vype ePen et Vype eStick (2ème génération)	35/2/60 et 55/2/30 jusqu'à 60 min	- Les aérosols d'e-cig peuvent induire de la cytotoxicité à un profil de bouffée intense. - E-cig moins toxique que la cigarette.
(Bishop *et al.*, 2019)	Modèle 3D de cellules primaires épithéliales bronchiques humaines (MucilAir)	Vype eBox (3ème génération)	55/3/30 jusqu'à 60 min	- Mesure de la viabilité cellulaire, du battement des cils et de la résistance trans-épithéliale - E-cig a moins d'effets cytotoxiques que la cigarette

2.1.8. Etats des connaissances sur la toxicité *in vivo* de l'e-cig

2.1.8.1. Etudes in vivo par exposition « corps entier »

Il existe deux types d'approches pour exposer des animaux à un aérosol (Figure 14). La méthode d'exposition « corps entier », qui consiste à placer l'animal dans une chambre d'exposition dans laquelle l'aérosol est délivré. Cette méthode comporte cependant certains biais puisque les aérosols peuvent se déposer sur le pelage de l'animal. La toxicité ferait alors rentrer en jeu une exposition cutanée voire digestive lors de la toilette de l'animal. Pour pallier à cela, il est possible de mettre en place des expositions « nose-only ». Les animaux sont alors maintenus en contention afin de permettre une inhalation directe de l'aérosol par voie nasale. Cette méthode peut cependant entraîner un stress non négligeable dû à la contention qui doit être pris en considération (van Eijl *et al.*, 2006).

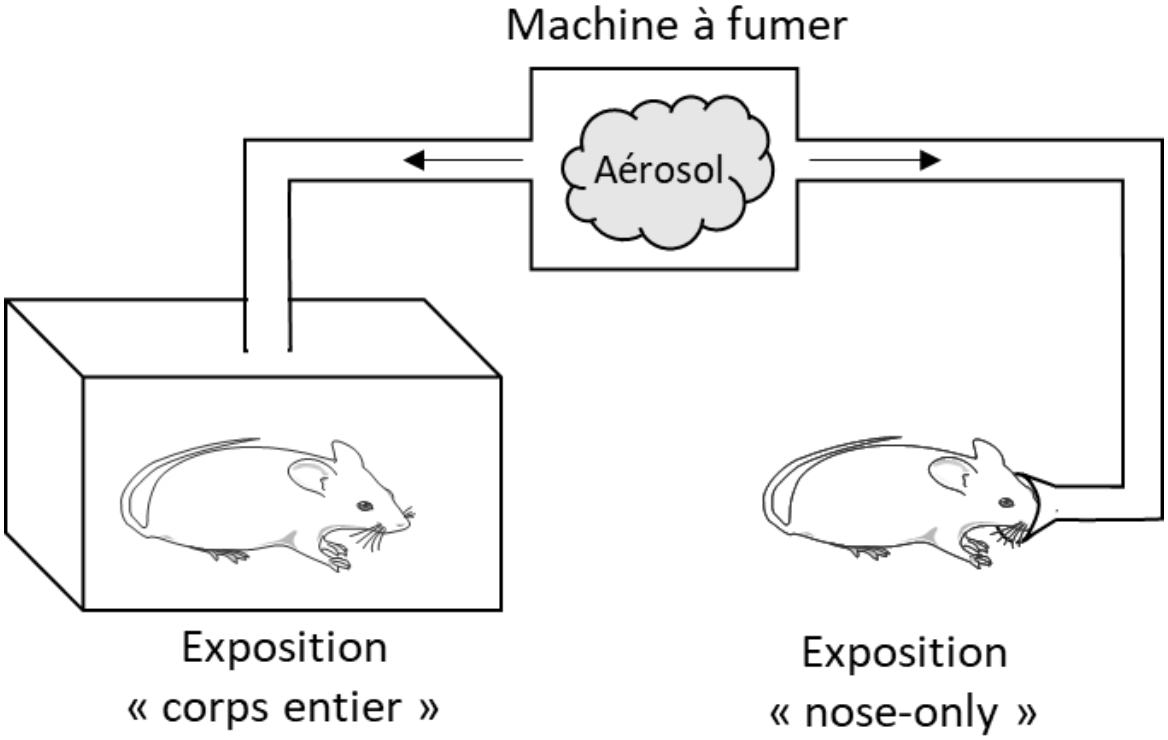


Figure 14. Schéma de l'exposition « corps entier » (à gauche) ou « nose-only » (à droite) à un aérosol.

La majorité des études décrites ont utilisé un mode d'exposition « corps entier » pour analyser l'impact des émissions d'e-cig (Tableau 7). La plupart de celles-ci ont été effectuées sur des souris, mais quelques-unes ont été réalisées chez le rat. Une exposition aux aérosols sur des rats Sprague Dawley pendant 4 semaines a été associée à une augmentation significative de l'activité d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques, responsable de la métabolisation des HAP, une réduction de la capacité antioxydante et des dommages à l'ADN (Canistro *et al.*, 2017). Une autre étude de 4 semaines sur des rats

Wistar a également montré une modification de la réponse anti-oxydante avec une augmentation de l'expression des enzymes superoxide dismutase et glutathion-S-transférase (El Golli *et al.*, 2016). Salturk *et al.* n'ont cependant pas trouvé de différence significative entre des rats exposés 1h/jour pendant 4 semaines et des rats contrôles (Salturk *et al.*, 2015). Chez la souris C57BL/6J, l'exposition à l'e-cig 5h/jour pendant 3 jours induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et réduit le taux de glutathion au niveau pulmonaire, témoignant d'un stress oxydant (Lerner *et al.*, 2015). Glynos *et al.* confirment également cette augmentation de l'inflammation et du stress oxydant pulmonaire chez des souris C57BL/6J exposées jusqu'à 4 semaines. Ils montrent aussi une augmentation de la sécrétion de mucus et une hyper réactivité bronchique, de même que des modifications de la fonction respiratoire dès 3 jours d'exposition (élasticité, compliance et résistance) (Glynos *et al.*, 2018). Sussan *et al.* ont exposé des souris C57BL/6J aux aérosols d'e-cig deux fois 1h30 par jour pendant 2 semaines. Cette étude montre que les souris exposées sont plus vulnérables aux infections virales et bactériennes du fait d'une réduction de la phagocytose des macrophages alvéolaires (Sussan *et al.*, 2015). Une diminution de l'efficacité de la clairance muco-ciliaire a été observée chez des souris C57BL/6J exposées 20 min/jour pendant 3 semaines mais pas chez celles exposées seulement 1 semaine (Laube *et al.*, 2017). Plus récemment, une équipe a exposé des souris FVB/N, une souche fortement sensible à l'induction de cancer par produits chimiques, pendant 54 semaines, à de longues sessions de 4 h/jour à raison de 5 jours/semaine en utilisant un e-liquide à 36 mg/mL de nicotine. Ces expositions intenses ont provoqué des adénocarcinomes au niveau pulmonaire dans 20% des souris et des hyperplasies au niveau rénal dans 60% des cas (Tang *et al.*, 2019).

Tableau 7. Résumé des études citées sur la toxicité in vivo de l'e-cig utilisant un protocole d'exposition corps entier.

Etude	Modèle animal	E-cig	Exposition	Principaux résultats
(Canistro *et al.*, 2017)	Rats Sprague Dawley	Modèle non précisé (3ème génération)	1 mL/jour d'e-liquide 5 jours/semaine pendant 4 semaines	- Augmentation de l'activité des enzymes de phase I, de la production d'ERO, de l'oxydation et des dommages à l'ADN.
(Salturk *et al.*, 2015)	Rats Wistar	eGO T (2ème génération)	1 h/jour pendant 4 semaines	- Etude histopathologique montre des hyperplasies et métaplasies après expositions à l'e-cig.
(Lerner *et al.*, 2015)	Souris C57BL/6J	Blu e-cig (1ère génération)	5 h/jour pendant 3 jours	- Exposition à l'e-cig induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. - Augmentation du stress oxydant.
(Glynos *et al.*, 2018)	Souris C57BL/6J	eRoll (Joye Technology)	4 expositions/jour de 7 minutes pendant 3 jours ou 4 semaines	- Augmentation de la sécrétion de mucus. - Hyperréactivité bronchique et altération de la fonction respiratoire. - Augmentation du stress oxydant.
(Sussan *et al.*, 2015)	Souris C57BL/6J	NJOY (1ère génération)	2 expositions de 1,5 h/jour pendant 2 semaines	- Augmentation de la vulnérabilité aux infections virales et bactériennes.
(Laube *et al.*, 2017)	Souris C57BL/6J	Joyetech 510-T (2ème génération	Exposition de 20 min/jour pendant 1 ou 3 semaines	- Diminution de la clairance mucociliaire chez les souris exposées 3 semaines.
(Tang *et al.*, 2019)	Souris FVB/N	*E-cig aerosol generator* (équivalent 2ème génération)	Exposition de 4 h/jour, 5 jours/semaine pendant 54 semaines	- Induction d'adénocarcinomes pulmonaires dans 20% des souris, et des hyperplasies rénales dans 60%.

2.1.8.2. Etudes in vivo par expositions « nose-only »

Une exposition « nose-only » des animaux semble plus pertinente pour évaluer les risques sanitaires liés à l'inhalation des aérosols d'e-cig. Quelques études utilisant ce mode d'exposition ont déjà été effectuées (Tableau 8). Hwang *et al.* ont observé des modifications de la sécrétion de médiateurs de l'inflammation au niveau pulmonaire et systémique chez des souris CD-1 exposées en « nose-only » 1h/jour pendant 4 semaines (Hwang *et al.*, 2016). Crotty Alexander *et al.* ont exposé des souris C57BL/6J et CD-1 1h/jour pendant 3 ou 6 mois et ont montré une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires au niveau systémique (Crotty Alexander *et al.*, 2018). Une étude menée sur des rats Spragues Dawley a retrouvé une augmentation du nombre de cellules de l'immunité au niveau des voies respiratoires (neutrophiles et macrophages alvéolaires) après 90 jours d'exposition, mais qui disparaissent après un recouvrement de 42 jours (Werley et al., 2016). Une autre étude a analysé le transcriptome de souris C57BL6/J exposées 4h/jour pendant 3 semaines à l'e-cig ou à la fumée de cigarette. Le nombre de gènes dérégulés est beaucoup plus important dans le cas d'une exposition à la fumée de cigarette. Les aérosols d'e-cig induisent en revanche assez peu de modifications,

et pas suffisamment pour conclure à une toxicité (Lee *et al.*, 2018). Les résultats les plus inquiétants sont ceux rapportés par Lee *et al.*. Ils ont montré que des expositions de 3h/jour pendant 12 semaines aux émisisons d'e-cig sur des souris FVB/N pouvaient induire des dommages au niveau de l'ADN pulmonaire, vésical et cardiaque. De plus, les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ont été retrouvées diminuées au niveau de ces tissus. Les auteurs émettent l'hypothèse que les nitrosamines dérivées de la nicotine seraient responsables de cet effet mutagène (Lee et al., 2017). Ces résultats *in vivo* ont beaucoup fait parler d'eux puisqu'ils suggèrent que l'e-cig pourrait avoir des effets cancérogènes. Cette étude suggère aussi que ces nouveaux dispositifs pourraient exercer un effet toxique sur d'autres organes que les poumons. Des effets pro-fibrotiques avaient également été mis en évidence au niveau cardiaque et rénal dans une précédente étude (Crotty Alexander *et al.*, 2018).

Tableau 8. Résumé des études citées sur la toxicité in vivo de l'e-cig utilisant un protocole d'exposition « nose-only ».

Etude	Modèle animal	E-cig	Profil de bouffée	Résultats principaux
(Hwang *et al.*, 2016)	Souris CD-1	Marque non précisée (2ème génération)	Exposition 1 h/jour pendant 4 semaines	- Augmentation de la réponse inflammatoire pulmonaire et systémique.
(Crotty Alexander *et al.*, 2018)	Souris C57BL/6J et CD-1	Marque non précisée (2ème génération)	Exposition 1 h/jour pendant 3 ou 6 mois	- Augmentation de la réponse inflammatoire pulmonaire et systémique. - Activation de la voie profibrotique retrouvée au niveau rénal, hépatique et cardiaque.
(Werley *et al.*, 2016)	Rats Sprague Dawley	MarkTen (1ère génération)	Expositions de 16, 48 ou 160 min/jour pendant 90 jours	- Augmentation du nombre de macrophages alvéolaires et de neutrophiles au niveau pulmonaire. - Disparition de ces altérations après 42 jours de recouvrement.
(Lee *et al.*, 2018)	Souris C57BL/6J	MarkTen (1ère génération)	Exposition 4 h/jour, 5 jours/semaine pendant 3 semaines	- Moins de gènes dérégulés par l'e-cig par rapport à la cigarette. - Pas de voie de signalisation dérégulée suite à l'exposition à l'e-cig.
(Lee et al., 2017)	Souris FVB/N	Njoy (2ème génération)	Exposition de 3 h/jour pendant 12 semaines	- Dommages à l'ADN pulmonaire, vésical et cardiaque. - Diminution des mécanismes de réparation de l'ADN.

Les études toxicologiques *in vitro* et *in vivo* évaluant l'impact de l'e-cig ont permis de mettre en évidence une modulation de la réponse inflammatoire et une dérégulation de la balance oxydants/antioxydants par les aérosols. Cependant beaucoup de ces études correspondent à des expositions aiguës ou subchroniques, et ne témoignent pas

d'éventuelles lésions pouvant apparaître suite à des expositions chroniques susceptibles de conduire à des pathologies plus ou moins graves. De plus, les différences de protocoles d'expositions en termes de durée, de fréquence, de modèles d'e-cig et de profil de bouffée rendent difficile la comparaison et l'uniformisation des résultats retrouvés. En effet, certaines méthodes d'exposition correspondent à des conditions assez extrêmes d'utilisation de l'e-cig qui ne seraient pas pertinentes dans le cas d'une utilisation conventionnelle. De plus, la plupart des études disponibles utilise des modèles d'e-cig de deuxième génération, alors que les modèles prépondérants sur le marché aujourd'hui sont ceux de troisième génération. Au vu de leur technologie plus poussée permettant de générer des aérosols plus denses et plus concentrées en composés nocifs il est alors important d'évaluer leur toxicité de façon plus précise. Enfin, pour faciliter la comparaison entre les différents dispositifs disponibles, mais aussi par rapport à la cigarette classique, il semble important de standardiser les méthodes d'expositions et d'utiliser les mêmes paramètres d'analyse.

2.1.9. Effets de l'e-cig sur la santé humaine

Les effets de l'e-cig sur la santé humaine sont encore largement inconnus. Ces dispositifs sont encore trop récents pour disposer de données de toxicité à long terme d'une utilisation régulière, d'autant plus que beaucoup d'études reposent sur le fait que ce sont des fumeurs ou anciens fumeurs qui se mettent à l'e-cig. De ce fait, bien que la plupart de celles-ci montrent une amélioration des marqueurs de toxicité, il est difficile de conclure sur leur innocuité totale.

Une première étude en 2012 a montré une augmentation de la résistance des voies aériennes, et une réduction de l'oxyde nitrique (NO) exhalé, marqueur d'inflammation pulmonaire, après 5 minutes de vapotage chez 30 fumeurs (Vardavas *et al.*, 2012). Ces altérations ont été confirmées avec plusieurs modèles d'e-cig, avec ou sans nicotine (DeMarini, 2004). La réduction du NO exhalé a également été observée chez des individus non-fumeurs après 6 mois d'utilisation d'e-cig (Meo *et al.*, 2019). Cette dernière étude met également en évidence des altérations de la fonction pulmonaire suggérant une augmentation de l'obstruction des voies aériennes. Bien que le nombre de participants soit assez faible (n=30), la durée de l'étude de 6 mois permet d'observer des effets liés à une exposition prolongée. Une exposition à l'e-cig a également été liée à une augmentation de l'inflammation et du stress oxydant chez des individus non-fumeurs dont le sang a été

prélevé à intervalles réguliers 6h après une session de vapotage (Chatterjee *et al.*, 2019). L'étude la plus longue à ce jour a suivi pendant 42 mois (3 ans et demi) neuf utilisateurs d'e-cig n'ayant jamais été fumeurs (Polosa *et al.*, 2017). Sur tous les paramètres étudiés (pression sanguine, fréquence cardiaque, poids, fonction pulmonaire, symptômes d'affections des voies respiratoires, oxyde nitrique exhalé et monoxyde de carbone exhalé), aucun n'est significativement modifié par rapport aux douze individus du groupe contrôle (non-fumeurs et non-vapoteurs).

Dans le but d'évaluer l'impact respiratoire de l'e-cig, il est également intéressant de déterminer si la transition d'un fumeur vers le vapotage pourrait être bénéfique pour sa santé. Walele *et al.*, ont mené une étude dans ce sens, en suivant pendant deux ans des anciens fumeurs passés à l'e-cig. (Walele *et al.*, 2018). Les auteurs n'ont pas constaté de signes cliniques de toxicité pulmonaire particuliers. Barna *et al.* ont évalué la différence d'impact respiratoire entre la cigarette et l'e-cig en regardant directement les effets sur les membranes alvéolo-capillaires. Les résultats montrent que le passage à l'e-cig est bien bénéfique pour le fumeur (Barna *et al.*, 2019). Il a également été mis en évidence qu'après 3 ans d'utilisation d'e-cig, des anciens fumeurs atteints de BPCO montraient une amélioration de leur condition physique, mesurée par le test de marche de 6 minutes, et une diminution moindre de leur capacité respiratoire comparée à ceux qui ont continué de consommer la cigarette (Polosa *et al.*, 2017, 2018).

Ces données cliniques, bien qu'encore peu nombreuses, rejoignent les études chimiques des aérosols et les études toxicologiques *in vitro* et *in vivo*. Elles suggèrent que la vapeur d'e-cig serait moins toxiques que la fumée de cigarette classique, et qu'elle permettrait d'inverser certains effets délétères induits par le tabac. Cependant, les études citées précédemment ne garantissent pas l'innocuité des e-cig suite à une utilisation de plusieurs années, voire dizaine d'années. Une exposition chronique prolongée à ces aérosols pourrait être associée à d'autres pathologies que celles observées chez les fumeurs. De plus, les modèles d'e-cig utilisés sont souvent de deuxième voire de première génération. Ainsi, les modèles de troisième génération ayant une température de chauffe du e-liquide plus importante pourrait avoir une toxicité à long terme différente que celle observée pour les autres modèles d'e-cig.

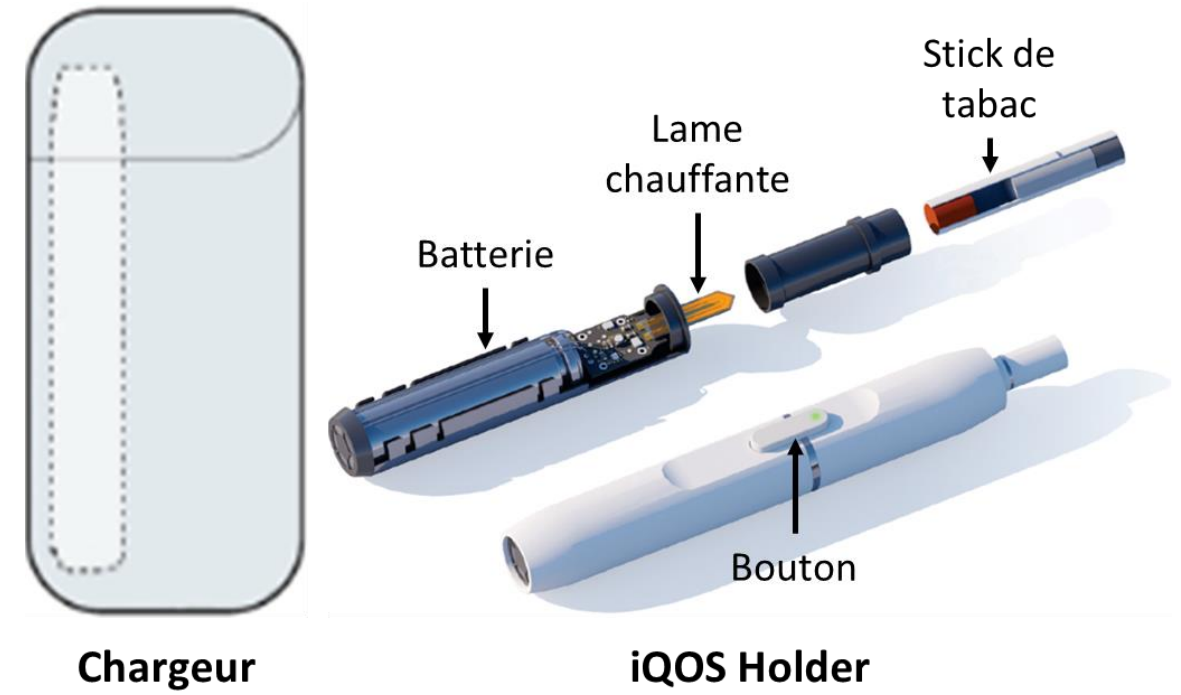
2.2. Le tabac chauffé

2.2.1. Généralités

Le tabac chauffé a été introduit pour la première fois au Etats-Unis en 1988 mais n'ayant pas été populaire tout de suite, il a rapidement été retiré du marché. Plus récemment, en voyant le succès grandissant de l'e-cig, l'industrie du tabac a décidé de retenter une commercialisation. C'est en 2014 que Philip Morris International (PMI) met en vente son premier modèle de tabac chauffé, l'« iQOS ». D'autres industries du tabac ont développé à leur tour leur propre dispositif : « Glo » pour la British American Tobacco, « Ploom TECH » pour la Japan Tobacco et plus récemment « PAX » par PAX labs, les créateurs de la marque d'e-cig JUUL. Tous ces dispositifs reposent sur un principe qui permet de générer un aérosol sans processus de combustion directement à partir de feuilles de tabac. Le produit le plus répandu actuellement est l'iQOS, sorti d'abord au Japon, en Italie puis en France depuis 2017 ; il est maintenant disponible dans plus de 40 pays dans le monde. La vente aux Etats-Unis a été récemment autorisée en octobre 2019 par la FDA dans la catégorie de « produit du tabac à risque modifié ». La prévalence de l'utilisation de l'iQOS ne cesse d'augmenter depuis sa mise en vente dans les pays pilotes. Elle est, par exemple, passée de 0,6 % en 2016 à 3,6 % en 2017 au Japon (Tabuchi *et al.*, 2018). Les parts de marché ont été multipliées par 5 de 2016 à 2017 en Italie (Liu *et al.*, 2018). Le tabac chauffé étant encore très récent en France, les données de prévalence ne sont pas encore disponibles. Le tabac chauffé représentait en 2017 13 % du chiffre d'affaire de PMI, et l'objectif est d'augmenter ce chiffre à 38 % d'ici 2025, en le substituant à la vente de cigarettes classiques.

2.2.2. Principe de fonctionnement

Comme précisé précédemment, il existe plusieurs marques de produits de tabac chauffé. Le modèle iQOS de PMI est le plus répandu et celui qui sera utilisé dans notre étude toxicologique. Ce système électronique est composé d'un élément appelé « *holder* » qui chauffe des bâtonnets de tabac et d'une batterie portable pour recharger ce dernier. Les bâtonnets ou sticks de tabac sont les consommables de l'iQOS et sont appelés « heets » (Figure 15). Ils sont composés de feuilles de tabac broyées et imprégnées de glycérine permettant, selon le fabricant, la production d'un aérosol sans combustion (Smith *et al.*, 2016). Ces sticks sont insérés sur une résistance en forme de lame qui chauffe jusqu'à 350°C (Davis *et al.*, 2019) pour une durée de 6 minutes, ou pour l'équivalent de 14 bouffées. Après chaque utilisation, le stick doit être enlevé et le *holder* rechargé. La batterie peut recharger le *holder* une vingtaine de fois avant de devoir être elle-même rechargée. A noter que cette description est valable pour le modèle d'iQOS version 2.2 ; il existe des modèles améliorés qui permettent de consommer plus de heets avant la



recharge (iQOS duo ou multi).

Figure 15. Illustration de l'iQOS, produit de tabac chauffé commercialisé par Philip Morris International (d'après TechInsights et Philip Morris International).

Le dispositif Glo fonctionne d'une manière similaire avec une résistance chauffante et un bâtonnet de tabac appelé « Ken Neostiks » (Figure 16). La résistance chauffe jusqu'à 250°C pour une durée de 3 minutes. A la différence de l'iQOS, ce dispositif peut être réutilisé jusqu'à 30 cycles avant d'être rechargé (Forster *et al.*, 2018).

Figure 16. Illustration d'un appareil Glo de la British American Tobacco et son consommable Ken Neostick (d'après BAT)

Enfin le dispositif Ploom fonctionne d'une manière un peu différente (Figure 17). L'appareil est composé d'une batterie, d'une cartouche contenant un mélange de propylène glycol, de glycérol et de triacétine, et d'une capsule de tabac granulé. Lors d'une bouffée, le liquide contenu dans la cartouche est chauffé afin de générer un aérosol sans nicotine. Cet aérosol en passant à travers la capsule chauffe le tabac puis est inhalé. Le tabac est ainsi chauffé indirectement par l'aérosol à une température d'environ 30°C, lui permettant de libérer son arôme et de la nicotine (Takahashi *et al.*, 2018).

Figure 17. Appareil Ploom Tech de Japan Tobacco International (JTI) et ses capsules de tabac (d'après JTI)

2.2.3. Composition des sticks d'iQOS

Les heets de l'iQOS sont disponibles en plusieurs arômes codés par couleur : « bronze » pour un goût cacao, « sienna » pour un goût boisé, « amber » pour un goût noisette, « yellow » pour un goût épicé et « turquoise » pour un goût mentholé. Leur composition a été détaillée par le fabricant (Smith *et al.*, 2016). Le tabac contenu dans les sticks est d'abord broyé puis reconstitué en feuille après l'ajout d'eau, de glycérol, de propylène glycol, de gomme de guar et de fibres de cellulose. Selon le fabricant, les heets contiennent moins de tabac que les cigarettes classiques : environ 320 mg contre 550-700 mg. Deux études indépendantes ont montré qu'ils contenaient 20 à 30 % de nicotine en moins par bouffée (Bekki *et al.*, 2017 ; *Farsalinos et al.*, 2018). Les consommables de l'iQOS sont constitués de deux filtres, le premier permettant de refroidir l'aérosol, composé de film polymère plastique, et le deuxième composé d'acétate de cellulose qui, selon le fabricant, mime la sensation d'une cigarette classique. Enfin, le tabac est séparé des deux filtres par un tube d'acétate, destiné à empêcher la chaleur de faire fondre les filtres en question (Figure 18). Cependant, Davis *et al.* ont montré que la chaleur de la lame était suffisante pour faire fondre le premier filtre en polymère plastique (Davis *et al.*, 2019).

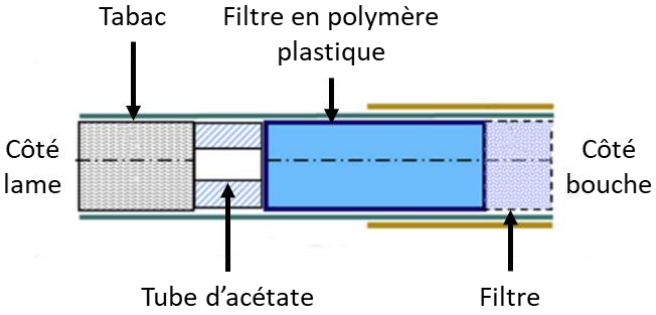


Figure 18. Schéma de la composition d'un "heets" ou stick de tabac, consommable de l'iQOS (d'après Smith et al.*, 2016)*

2.2.4. Composition des aérosols d'iQOS

Les aérosols d'iQOS sont composés à 75-85% d'eau alors que la fumée de cigarette classique l'est à 17-27%. Globalement, les composés chimiques les plus retrouvés dans les émissions de tabac chauffé sont le propylène glycol, le glycérol et l'acétol (Li *et al.*, 2018; Uchiyama *et al.*, 2018). Concernant les substances toxiques, PMI a publié plusieurs études évaluant la composition des aérosols des produits du tabac chauffé. Pour résumer, ces différentes études affirment que, du fait de l'absence de combustion, les émissions contiennent environ 90 à 95 % de moins de composés toxiques que la fumée de cigarette (Schaller *et al.*, 2016a). Ces données ont été confirmées par quelques études

indépendantes. Li *et al.* ont mesuré une diminution de 90% de la plupart des composés toxiques (Li *et al.*, 2019b). Mallock *et al.* ont également mesuré des concentrations d'aldéhydes plus faibles (entre 80 et 95%) comparé à la fumée de cigarette (Mallock *et al.*, 2019). Cependant, ces réductions ne signifient pas que les émissions sont totalement exemptes d'effets toxiques. Bien que controversés par leur méthode d'analyse, Auer *et al.* ont montré des concentrations plus élevées de composés organiques volatiles, de HAP et de monoxyde de carbone que les autres données de littérature (Auer *et al.*, 2017). Une autre étude a aussi montré que, malgré l'absence de combustion, l'iQOS émet des quantités non négligeables de composés carbonylés (Ruprecht *et al.*, 2017). Concernant la nicotine, quelques études ont déjà montré que les concentrations retrouvées dans les aérosols de tabac chauffé représentaient 70 à 80% de celles mesurées dans la fumée de cigarette (Auer *et al.*, 2017; Brossard *et al.*, 2017; Jaccard *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019b; Mallock *et al.*, 2019). De par son positionnement sur le marché, le tabac chauffé est en concurrence avec l'e-cig pour aider à la diminution de la consommation de la cigarette conventionnelle. La comparaison de ces dispositifs est alors une étape primordiale dans l'avancée des connaissances sur leur toxicité. Des travaux dans ce sens commencent à voir le jour dans la littérature. Farsalinos *et al.* ont notamment montré que les émissions de tabac chauffé contenaient moins de composés carbonylés que celles de la cigarette classique, mais plus que celles de l'e-cig (Farsalinos *et al.*, 2018b). Leigh *et al.* ont retrouvé des concentrations en nitrosamines inférieures dans les émissions d'iQOS que dans la fumée de cigarette, mais plus importantes que dans celles de l'e-cig (Leigh *et al.*, 2018). Enfin, des taux importants d'espèces réactives de l'oxygène ont été mesurés dans les aérosols de tabac chauffé, cependant, ils sont inférieurs de 85% par rapport à ceux retrouvés dans la fumée de la cigarette (Salman *et al.*, 2019).

2.2.5. Analyses toxicologiques de l'iQOS

2.2.5.1. Toxicité in vitro de l'iQOS

Les analyses toxicologiques *in vitro* du tabac chauffé proviennent majoritairement de l'industrie du tabac (Tableau 9). La plupart de ces études compare les effets cytotoxiques des émissions d'iQOS avec ceux de la fumée de cigarette. En 2016, Philip Morris sort une série de 8 études destinées à évaluer la toxicité de leur dispositif. Parmi elles, une étude *in vitro* affirme que, par rapport aux émissions de tabac classique, la cytotoxicité des émissions d'iQOS est diminuée de 90% (Schaller *et al.*, 2016a). Les expositions ont été réalisées, comme pour l'e-cig, soit sur des cellules immergées, en mélangeant au préalable

un extrait d'aérosol solubilisé au milieu de culture, soit sur des cellules cultivées en IAL. Concernant les travaux utilisant des extraits d'aérosol d'iQOS, deux études montrent que les aérosols d'iQOS ont moins d'effets néfastes que la cigarette sur des cultures primaires de cellules endothéliales. La première révèle, à l'aide d'analyses transcriptomiques, que les voies de signalisation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, de l'autophagie sont moins impactées avec les aérosols d'iQOS qu'avec ceux de cigarettes (Poussin *et al.*, 2016). La deuxième montre une cytotoxicité et une inflammation dose-dépendante après exposition au tabac chauffé et à la cigarette. Cependant, les paramètres étudiés (intégrité du tapis cellulaire et sécrétion de cytokines) sont moins affectés par l'iQOS (van der Toorn *et al.*, 2018). Iskandar *et al.* ont directement exposé des cellules épithéliales bronchiques et un modèle 3D de cellules d'épithélium nasal aux aérosols d'iQOS. Les auteurs ont analysé un grand nombre de paramètres : la viabilité cellulaire, la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et les modifications d'expressions géniques. Pour les deux modèles cellulaires, les effets cytotoxiques étaient plus importants après une exposition à la fumée de cigarette qu'après une exposition aux émissions de tabac chauffé. (Iskandar *et al.*, 2017a, 2017b). Cette diminution des effets cytotoxiques a été observée dans d'autres études financées également par l'industrie du tabac (Malinska *et al.*, 2018; van der Toorn *et al.*, 2018; Zanetti, 2017). Actuellement, encore peu d'études indépendantes évaluant la cytotoxicité du tabac chauffés sont publiées. Leigh *et al.* ont mesuré la viabilité cellulaire et la sécrétion de médiateurs de l'inflammation sur des cellules épithéliales bronchiques (H292) après une exposition à la fumée de cigarette, aux émissions d'iQOS ou d'e-cig. Ils montrent que le tabac chauffé est moins toxique que la cigarette classique, mais plus que l'e-cig (Leigh *et al.*, 2018).

Tableau 9. Résumé des études citées sur la toxicité in vitro du tabac chauffé.

Etude	Financement	Modèle cellulaire	Exposition	Principaux résultats
(Schaller *et al.*, 2016a)	PMI	Lignée de fibroblastes murins (Balb/c 3T3)	Extraits d'aérosols d'iQOS	- Absence de mutagénicité suite à l'exposition à l'iQOS. - Cytotoxicité diminuée de 90% par rapport à celle de la cigarette.
(Poussin *et al.*, 2016)	PMI	Co-culture de cellules primaires endothéliales (HCAECS) et d'une lignée cancéreuse de monocytes humains (MM6)	Extraits d'aérosols d'iQOS	- Cytotoxicité inférieure à celle de la cigarette.
(van der Toorn *et al.*, 2018)	PMI	Cellules primaires endothéliales humaines (HCAES) et d'une lignée cancéreuse de monocytes humains (THP-1)	Extraits d'aérosols d'iQOS	- Cytotoxicité et inflammation inférieures à celles induites par la cigarette.
(Iskandar *et al.*, 2017a)	PMI	Cultures primaires de cellules de l'épithélium bronchique humain (EpiAirway, MucilAir)	Culture en interface air-liquide	- Altérations de miARN, sécrétion de médiateurs de l'inflammation inférieure à celles induites par la fumée de cigarette.
		Modèle de culture primaire 3D d'épithélium nasal (SmallAir)	Culture en interface air-liquide	Par rapport à la cigarette, les aérosols d'iQOS induisent moins de : - cytotoxicité - sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires - altérations de la morphologie tissulaire. - altérations de la fonction ciliaire. - altérations transcriptomiques et miARN.
(Zanetti, 2017)	PMI	Culture primaire de cellules de l'épithélium gingival (Epi-Gingival)	Culture en interface air-liquide	- Cytotoxicité et sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires inférieures à celles de la cigarette.
(Malinska *et al.*, 2018)	PMI	Lignée immortalisée de l'épithélium bronchique humain (BEAS-2B)	Culture en interface air-liquide	- Phosphorylation oxydative, altération de l'expression des gènes et des protéines impliqués dans la réponse au stress oxydant inférieures à la cigarette.
(van der Toorn *et al.*, 2018)	PMI	Lignée immortalisée de l'épithélium bronchique humain (BEAS-2B)	Culture en interface air-liquide	- Exposition à long terme aux aérosols d'iQOS (12 semaines) induit moins d'altérations liées à la cancérogénèse pulmonaire qu'une exposition à la cigarette.
(Leigh *et al.*, 2018)	Indépendant	Lignée cancéreuse de l'épithélium bronchique humain (H292)	Culture en interface air-liquide	- Cytotoxicité inférieure à celle de la cigarette mais plus élevée que celle l'e-cig.

2.2.5.2. Toxicité in vivo de l'iQOS

L'industrie du tabac a également déjà effectué quelques études sur des modèles *in vivo* (Tableau 10). La plupart de ces études ont été réalisées sur des souris ApoE$^{-/-}$. Ces souris qui n'expriment pas l'apolipoprotéine E peuvent développer une athérosclérose précoce dès leurs premières semaines de vie. Ce modèle est couramment utilisé pour étudier les pathologies cardiovasculaires associées à la cigarette classique. Leur profil pro-inflammatoire est également idéal pour étudier le développement de maladies pulmonaires telles que la BPCO ou l'emphysème. Une exposition au tabac chauffé a donc

permis à PMI d'évaluer les dangers associés à son utilisation. Les études menées sur des expositions de 8 mois montrent qu'à la différence de la fumée de cigarette, les émissions d'iQOS ne sont pas impliquées dans la dérégulation de gènes du cytosquelette, de la fonction contractile ou de la réponse inflammatoire (Szostak *et al.*, 2017). D'autres études portant sur les effets hépatiques, pulmonaires et sur le métabolisme lipidique suggèrent également que le tabac chauffé est bien moins toxique que la cigarette classique (Lo Sasso et al., 2016; Phillips et al., 2016 ; Titz et al., 2016). Wong *et al.* ont également observé chez des rats exposés pendant 90 jours que la toxicité au niveau des voies respiratoires est bien moindre après exposition au tabac chauffé qu'après exposition à la cigarette (Wong, 2016). Une revue indépendante met en évidence une potentielle hépatotoxicité avec une augmentation du taux d'alanine aminotransférase retrouvée chez des rats exposés à l'iQOS et qui n'a pas été observée avec le tabac classique (Chun *et al.*, 2018).

Tableau 10. Résumé des études citées sur la toxicité in vivo du tabac chauffé.

Etude	Financement	Modèle animal	Profil de bouffée	Exposition	Principaux résultats
(Szostak *et al.*, 2017)	PMI	Souris ApoE -/-	Exposition "corps entier"	Exposition de 3 h/jour, 5 jours/semaine jusqu'à 8 mois	- Pas d'effets sur les gènes impliqués dans la réponse inflammatoire.
(Lo Sasso *et al.*, 2016)	PMI	Souris ApoE -/-	Exposition "corps entier"	Exposition de 3 h/jour, 5 jours/semaine jusqu'à 8 mois	- Effets hépatotoxiques réduits comparés à ceux de la cigarette.
(Phillips *et al.*, 2016)	PMI	Souris ApoE -/-	Exposition "corps entier"	Exposition de 3 h/jour, 5 jours/semaine jusqu'à 8 mois	- Absence d'inflammation pulmonaire et d'emphysème, contrairement à la cigarette.
(Titz *et al.*, 2016)	PMI	Souris ApoE -/- et C57BL/6J	Exposition "corps entier"	Exposition de 3 h/jour, 5 jours/semaine jusqu'à 8 mois	- Pas d'altérations du métabolisme lipidique contrairement à la cigarette.
(Wong, 2016)	PMI	Rats Sprague Dawley	Exposition "nose-only"	Exposition de 6 h/jour, 5 jours/semaine pendant 90 jours	- Moins d'inflammation, d'altérations histologiques, de modifications transcriptomiques au niveau pulmonaire comparés à la cigarette.
(Oviedo *et al.*, 2016)	PMI	Rats Sprague Dawley	Exposition "nose-only"	Exposition de 6 h/jour, 5 jours/semaine pendant 90 jours	- Moins d'inflammation, d'altérations protéiques au niveau pulmonaire qu'avec la cigarette.
(Nabavizadeh *et al.*, 2018)	Indépendant	Rats Sprague Dawley	Exposition "nose-only"	Exposition à un seul stick de tabac d'iQOS	- Altération de la fonction endothéliale de façon comparable à la cigarette
(Chun *et al.*, 2018)	Indépendant	Rats Sprague Dawley	Exposition « nose-only »	Exposition de 6 h/jour, 5 jours/semaine pendant 90 jours	- En se basant sur les résultats de Wong, 2016 : Corrélation entre l'augmentation d'alanine aminotransférase et une potentielle hépatotoxicité

Ces différentes études issues de financements de l'industrie du tabac suggèrent que les effets toxiques *in vivo* de l'iQOS sont bien moins importants que ceux induits par la cigarette. Une étude *in vivo* indépendante montre que des rats exposés au tabac chauffé ont les mêmes effets délétères au niveau vasculaire que ceux exposés à la fumée de cigarette, à savoir une diminution de l'élasticité artérielle, suggérant que l'exposition à l'iQOS n'éviterait pas les risques cardiovasculaires induits par la cigarette (Nabavizadeh *et al.*, 2018).

2.2.6. Effets du tabac chauffé sur la santé humaine

PMI a également mené et financé un certain nombre d'investigations pour étudier les effets de l'iQOS sur la santé humaine dans le but de montrer la réduction des risques par rapport à la cigarette classique. Haziza *et al.* ont mesuré 15 biomarqueurs d'expositions aux produits toxiques retrouvés dans la fumée de cigarette. Ils ont montré que les fumeurs étant passés à l'iQOS présentent des niveaux de biomarqueurs d'exposition diminués par rapport à ceux qui fument encore la cigarette (Haziza *et al.*, 2016a). Une autre étude a comparé un arrêt de la cigarette sans aide et un arrêt avec une transition vers le tabac chauffé. Les auteurs ont estimé que la réduction de l'exposition à certains composés toxiques était similaire entre les deux conditions (Lüdicke *et al.*, 2018a). Ludicke *et al.*, dans une deuxième étude, ont également montré que la réduction des marqueurs de risques cliniques associés au tabagisme (stress oxydant, activité des plaquettes, métabolisme lipidique, fonction pulmonaire) était similaire entre un arrêt total du tabac et une transition vers l'iQOS (Lüdicke *et al.*, 2018b). Afin de conforter l'idée que l'iQOS pourrait être utilisée pour aider à l'arrêt de la cigarette, des études ont montré que la pharmacocinétique de la nicotine délivrée par l'iQOS était proche de celle observée pour la cigarette (Brossard *et al.*, 2017; Picavet *et al.*, 2016). Ainsi, la réduction de l'envie de fumer serait comparable entre les deux dispositifs, bien que l'iQOS soit un peu moins satisfaisante (Haziza *et al.*, 2016b).

Deux études indépendantes ont réévalué les données fournies par PMI à la FDA pour obtenir l'autorisation de la mise sur le marché de l'iQOS. La première estime que les preuves apportées ne sont pas suffisantes pour affirmer que le passage de la cigarette à l'iQOS réduit l'inflammation ou améliore les fonctions pulmonaires (Moazed *et al.*, 2018). La deuxième étude a réanalysé la différence au niveau des biomarqueurs de toxicité utilisés par PMI pour comparer les utilisateurs d'iQOS et les fumeurs. Sur 24

biomarqueurs, 23 ne seraient pas significativement différents par rapport à ce qui est observé chez des fumeurs dans le cas d'une étude menée aux Etats-Unis, et 10 sur 13 ne le seraient pas non plus pour une étude effectuée au Japon (Glantz, 2018). Ces études mettent en évidence des biais méthodologiques et remettent en cause les bénéfices sur la santé de passer de la cigarette classique à l'iQOS. Ces données interrogent donc sur l'intérêt de ce dispositif quant à son utilisation comme alternative à la cigarette et rappellent la nécessité d'effectuer des études indépendantes. D'autant plus que deux cas de pneumonie à éosinophiles ont été rapportés au Japon chez des consommateurs quotidiens d'iQOS âgés de 16 et 20 ans (Aokage *et al.*, 2019; Kamada *et al.*, 2016). Une autre étude menée au Japon, a révélé que 12% des personnes interrogées sur un panel de 8000 individus se sont plaintes d'une exposition passive à l'iQOS. Parmi elles, 37% ont rapporté avoir ressenti un effet parmi les symptômes suivants : gorge sèche, douleur aux yeux, nausée. Ces données suggèrent qu'une exposition passive aux émissions d'iQOS pourrait poser un problème sanitaire, comme pour la cigarette (Tabuchi *et al.*, 2018). En utilisant les données disponibles en termes d'émissions de substances toxiques et cancérogènes, une étude indépendante a estimé que le risque de cancer associé à la consommation de tabac chauffé était réduit comparé à celui associé au tabagisme. Cependant, le risque associé au vapotage a été évalué encore plus faible (Stephens, 2018). Adriaens *et al.* ont mesuré une augmentation du monoxyde de carbone exhalé beaucoup moins importante chez les consommateurs d'iQOS que chez les fumeurs ; aucune augmentation n'a été détectée chez les vapoteurs. Les auteurs rapportent cependant qu'en terme de « satisfaction », les utilisateurs préfèrent l'iQOS à l'e-cig (Adriaens *et al.*, 2018).

En conclusion, la consommation de tabac chauffé est encore relativement récente, c'est pourquoi les études indépendantes évaluant sa toxicité chez l'Homme sont encore trop peu nombreuses. Les quelques études fournies par le fabricant ont été remises en question soulignant la nécessité d'apporter des réponses quant à son utilisation en tant qu'aide à l'arrêt de la consommation de cigarettes. Un autre point important à soulever est la comparaison avec l'e-cig. Le but de la consommation d'iQOS étant également de contribuer à l'arrêt de la cigarette, il est important de mettre en regard la toxicité potentielle de ces deux dispositifs. Les premiers résultats suggèrent que l'e-cig serait moins dangereuse que le tabac chauffé, mais le rapport bénéfices/risques de ces deux produits n'est pas encore clairement identifié.

Problématique et objectifs du projet de thèse

Problématique et objectifs du projet de thèse

Le tabagisme constitue indiscutablement un risque majeur pour la santé publique. Il est responsable de plus de 80 % des cancers du poumon et représente un facteur de risques pour de nombreuses maladies respiratoires et cardiovasculaires. La seule solution efficace pour lutter contre les méfaits du tabagisme est l'arrêt de la cigarette. Cependant, à cause de la nicotine, le sevrage est complexe et difficile pour les fumeurs chroniques. Il existe des dispositifs médicaux qui peuvent aider au sevrage tabagique, appelés également substituts nicotiniques qui permettent de réduire progressivement l'apport en nicotine tout en évitant les substances toxiques présentes dans la fumée de cigarette. Ces dix dernières années, une nouvelle alternative est arrivée sur le marché : l'e-cig. Ce dispositif permet de mimer la gestuelle d'un fumeur avec l'inhalation de « vapeur » véhiculant une quantité de nicotine qui peut être contrôlée par l'utilisateur.

Bien que, par l'absence de combustion, l'e-cig soit généralement perçue comme moins nocive que la cigarette, l'innocuité des émissions générées par l'e-cig fait encore débat. En effet, la nouveauté de ce dispositif signifie aussi un manque de recul sur son impact sanitaire à long terme. De plus, alors que les effets des premiers modèles d'e-cig (1ère et 2ème générations) sont de plus en plus documentés, les études sur les modèles les plus récents, dits de 3ème génération, sont encore assez peu nombreuses. Ces derniers, avec leur puissance modulable, peuvent générer une vapeur plus dense et induire la production de dérivés secondaires plus toxiques, qui pourrait produire des effets délétères plus importants.

En parallèle, les industries du tabac ont développé un nouveau système qui permet de générer décrit sans combustion un aérosol à partir de tabac : le tabac chauffé. L'iQOS, commercialisé par PMI, est le produit le plus répandu actuellement ; il est arrivé en France en 2017. Les émissions de ce dispositif ont été caractérisées dans la littérature scientifique dans des travaux essentiellement financés par PMI. Bien que ces travaux affirment que la toxicité de l'iQOS serait bien moindre que celle de la cigarette classique, il y a un réel besoin d'études venant de laboratoires indépendants pour confirmer ou infirmer ces données toxicologiques.

C'est dans ce contexte de l'augmentation de l'usage de systèmes électroniques de délivrance de nicotine que se situe mon projet de thèse. Il a eu pour but d'évaluer la toxicité de l'e-cig et du tabac chauffé et de la comparer à celle de la cigarette classique.

Mon projet de thèse se décline en trois parties : (1) une analyse de la composition chimique des émissions des différents dispositifs, (2) une analyse de leur toxicité *in vitro* et (3) une analyse de leur toxicité à long terme *in vivo*. L'ensemble des objectifs est résumé dans la Figure 19.

(1) Le premier volet de mes travaux consistera à comparer la composition chimique, en termes de composés carbonylés, de HAP et de nicotine, des émissions d'une e-cig de 2ème génération (modèle Lounge), d'une e-cig de 3ème génération (modèle Modbox) réglée à une puissance faible (18 W) ou forte (30 W), d'un dispositif de tabac chauffé (l'iQOS) et de la cigarette.

(2) Le deuxième volet de mon projet permettra d'évaluer et de comparer la toxicité des émissions de tous les dispositifs sur une lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine (BEAS-2B) cultivée à l'interface air-liquide. Cette évaluation sera basée sur différents paramètres biologiques : la viabilité cellulaire, la sécrétion des médiateurs de l'inflammation, le stress oxydant et l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et dans le stress oxydant.

(3) Enfin, le dernier volet s'inscrit dans le projet RESPIRE, financé par l'Institut National du Cancer et mené par l'ULR 4483 – IMPECS en collaboration avec le laboratoire de toxicologie génétique de l'Institut Pasteur de Lille et les équipes Inserm UMR1019 et UMR1277. Il a pour but d'analyser l'impact respiratoire sur un modèle murin d'une exposition aiguë (1 semaine), subchronique (3 mois) et chronique (6 mois) des émissions d'une e-cig de 3ème génération (modèle Modbox) réglée à deux puissances (faible et forte) et de le comparer à celui de la cigarette. En particulier, les objectifs de ce projet sont de caractériser l'impact des expositions aux aérosols d'e-cig (i) sur la fonction respiratoire des souris, l'inflammation, le stress oxydant, la fonction mitochondriale et le remodelage des tissus pulmonaires, (ii) les effets génétiques (lésions primaires de l'ADN et mutations) et épigénétiques (modifications des histones, méthylation de l'ADN et expression des miARN) et (iii) les effets transcriptomiques. Ma part de travail dans ce projet a consisté dans un premier temps à identifier les effets des émissions d'e-cig sur les altérations génétiques (tests des comètes, des micronoyaux et du Pig-A) et épigénétiques (méthylation globale de l'ADN, activité d'enzymes impliquées dans la modification des histones et expression pulmonaire de 754 miARN). Dans un second temps, l'évaluation des mécanismes impliqués dans la pathogénicité potentielle des émissions d'e-cig a été

réalisée à l'aide d'analyses transcriptomiques pangénomiques permettant de comparer les profils d'expression génique après expositions aux aérosols d'e-cig ou à la fumée de cigarette.

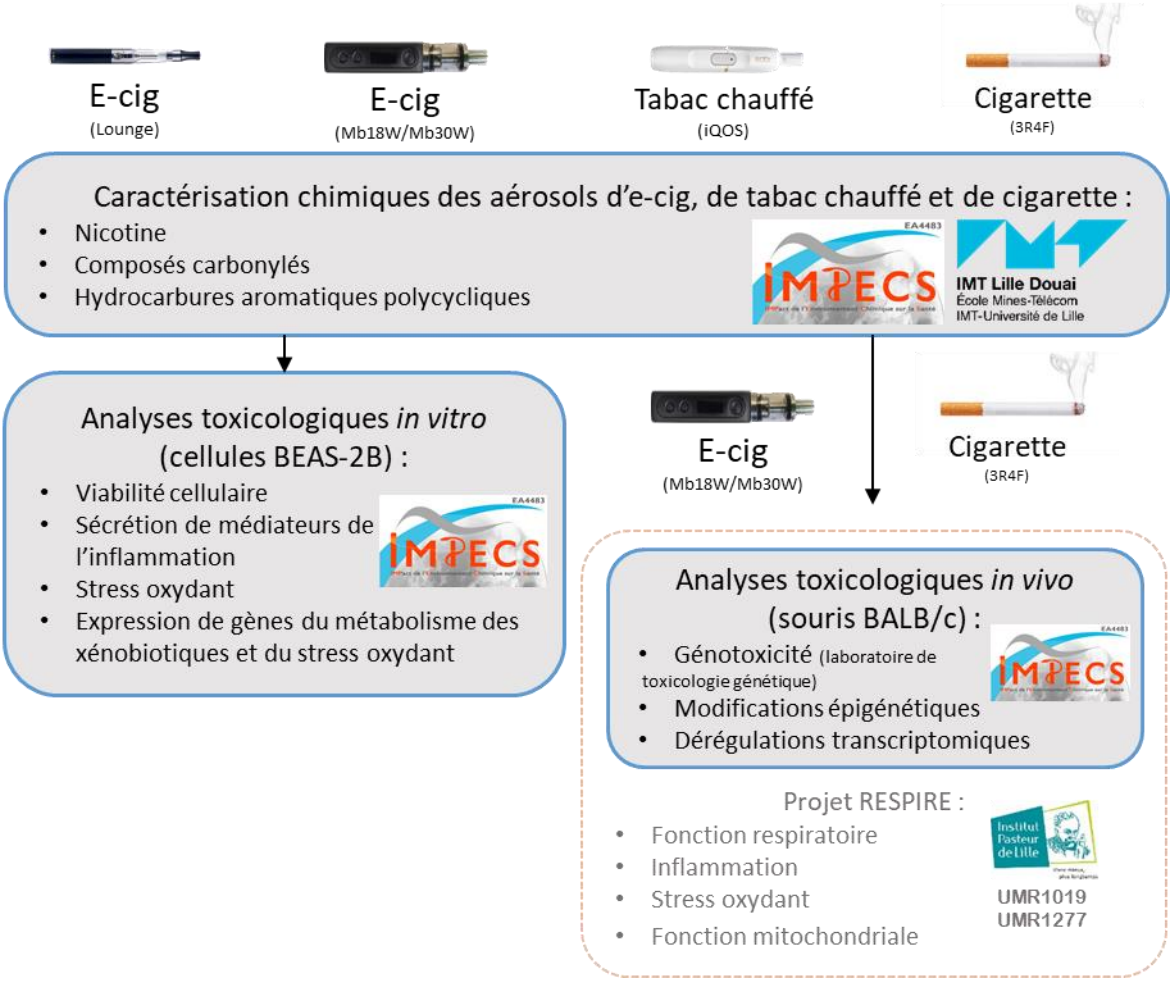


Figure 19. Objectifs du projet de thèse. Les traits pleins bleus représentent les objectifs de thèse et objectifs du projet RESPIRE en traits pointillés oranges.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1. Dispositifs utilisés et génération des aérosols

1.1. Cigarettes

Les cigarettes utilisées dans cette étude sont les cigarettes 3R4F, fournies par l'Université du Kentucky (Lexington, KY, Etats-Unis). Ces cigarettes sont standardisées et sont largement utilisées dans la recherche sur le tabac afin d'uniformiser les études menées à la fois par les laboratoires académiques et l'industrie du tabac. La physico-chimie de leurs émissions a été caractérisée à de nombreuses reprises dans la littérature (Eldridge *et al.*, 2015).

1.2. Cigarettes électroniques et e-liquide

Dans cette étude, deux types d'e-cig de la marque NHOSS® (Innova, Bondues, France) ont été utilisés. D'une part, le modèle de deuxième génération « Lounge » qui délivre une puissance de 4,6 W avec une résistance de 2,8 Ω composée de nickel et de chrome, alimentée par un voltage de 3,6 V. D'autres part, le modèle de troisième génération « Modbox » qui délivre une puissance variable en modulant le voltage fourni par la batterie. Pour nos expériences, nous avons choisi deux réglages de puissance : une « faible puissance » à 18 W, et une « forte puissance » à 30 W. La résistance choisie était de 0,5 Ω et composée de kanthal (alliage de fer, de chrome et d'aluminium), permettant d'utiliser les deux puissances en restant dans les recommandations du fabricant (de 15 à 30 W).

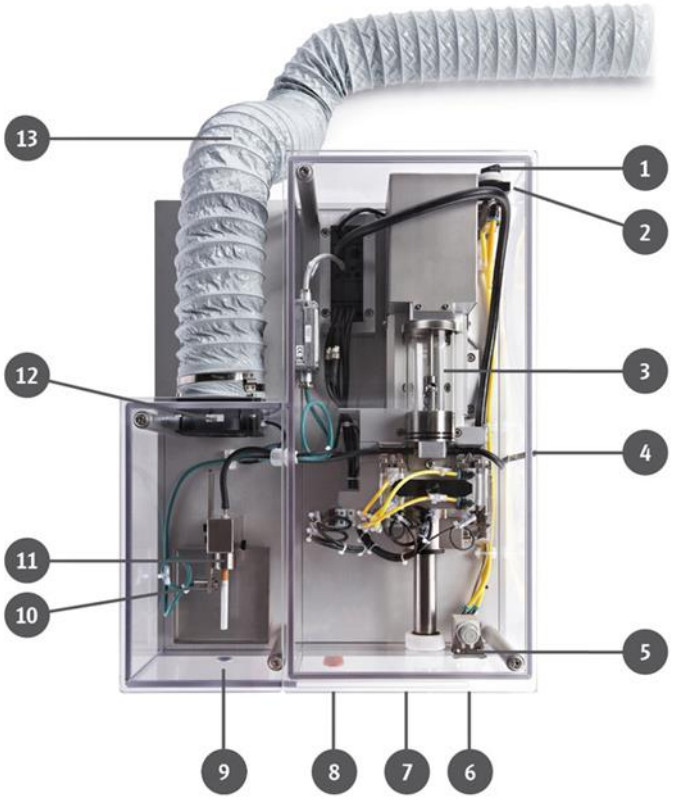
Le choix du e-liquide s'est porté sur un des liquides les plus vendus de la marque NHOSS. Selon le fabricant, il est composé de 65% de propylène glycol et de 35% de glycérine, d'arômes alimentaires pour lui donner un goût « tabac blond » et de nicotine à la concentration de 16mg/mL.

1.3. Tabac chauffé

Le produit du tabac chauffé utilisé était le modèle iQOS 2.4, fabriqué par Philip Morris International (Neuchâtel, Suisse). Les sticks de tabac utilisés étaient du type « ambre », décrit par PMI comme le plus proche du goût des cigarettes Marlboro Red. L'iQOS est prévue pour fonctionner pendant 6 minutes ou 12 bouffées après activation d'un bouton pressoir. Après chaque session de 6 minutes, le dispositif était rechargé. Il était nettoyé tous les 20 sticks, suivant les recommandations du fournisseur.

1.4. Génération des aérosols

Les aérosols des différents dispositifs ont été générés grâce à une machine à fumer Vitrocell® VC1 (Vitrocell, Waldkirch, Allemagne). La machine était entièrement nettoyée après chaque expérience. De plus, afin de prévenir des risques de contamination chimique, l'ensemble des tuyaux constituant la machine étaient spécifiques au dispositif utilisé (e-cig, iQOS ou 3R4F) (Figure 20).



1. Interrupteur de mise en tension
2. Entrée de l'air comprimé
3. Piston
4. Sortie des aérosols
5. Manomètre
6. Bouton OFF
7. Bouton ON
8. Bouton d'arrêt d'urgence
9. Bouton pour démarrer l'expérience
10. Senseur de cigarette allumée
11. Support pour cigarette
12. Ventilateur d'extraction
13. Tube d'extraction

Figure 20. Machine à fumer Vitrocell VC1

Afin de pouvoir comparer les différents dispositifs, un profil de bouffée unique a été utilisé pour l'ensemble des modèles testés : le profil Health Canada Intense (HCI). Celui-ci se définit par un volume de bouffée de 55 mL et d'une aspiration de 2 secondes toutes les 30 secondes. A noter que pour respecter les recommandations du profil HCI, le filtre de la cigarette 3R4F a été recouvert d'un ruban adhésif sur toute sa circonférence, permettant de bloquer d'éventuelles entrées d'air et mimant les doigts du fumeur. Pour le modèle Lounge, l'iQOS et la 3R4F, l'aspiration de la machine à fumer suffisait à générer l'aérosol. En revanche, pour le modèle Modbox, un déclenchement manuel sur le bouton pressoir

était nécessaire avant chaque bouffée, la résistance était préchauffée 1 seconde avant le début de la bouffée selon la méthode recommandée par la CORESTA (CRM n°81, 2015).

Dans ces conditions, une cigarette 3R4F était consommée entièrement en 10 bouffées, soit 5 minutes, et un stick d'iQOS était limité à 12 bouffées maximum, soit 6 minutes.

2. Caractérisation chimique des aérosols

2.1. Composés carbonylés

2.1.1. Collecte des aérosols

Les composés carbonylés ont été prélevés à la sortie de la machine à fumer sur deux cartouches Sep-Pak DNPH-Silica Plus Short Cartridge (Waters, Guyancourt, France) disposées en série. La deuxième cartouche dite « de garde » servait à collecter les composés qui n'auraient pas été retenus par la première. Le piégeage des composés carbonylés s'effectue par adsorption sur de la 2,4dinitrophénylhydrazine (DNPH) qui forme alors des dérivés hydrazones différents en fonction du composé piégé (Figure 21).

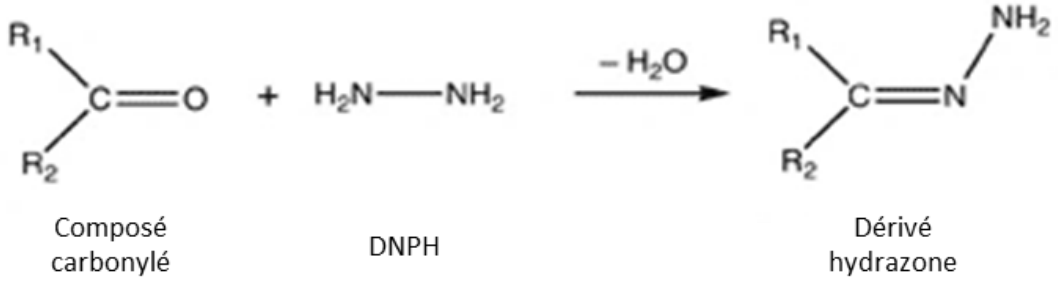


Figure 21. Illustration du devenir des composés carbonylés en présence de DNPH.

Pour les aérosols d'e-cig et d'iQOS, les cartouches utilisées contenaient 350 mg d'adsorbant alors que celles utilisées pour les aérosols de 3R4F en contenaient 700 mg. Une cartouche de plus grande capacité était nécessaire pour la cigarette car les données de littérature indiquaient une quantité de composés carbonylés supérieures à la capacité d'absorption des cartouches de 350 mg dans une seule bouffée (Eldridge *et al.*, 2015). Un blanc a été réalisé en faisant fonctionner la machine à fumer sans e-cig, iQOS ou 3R4F et en récupérant l'air à la sortie de la même façon que pour les dispositifs testés. Pour prendre en compte une éventuelle pollution de l'air ambiant, la valeur du blanc a été

retirée à chaque échantillon. Chaque prélèvement a été réalisé quatre fois et a été conservé à -20°C avant d'être analysé (Figure 22).

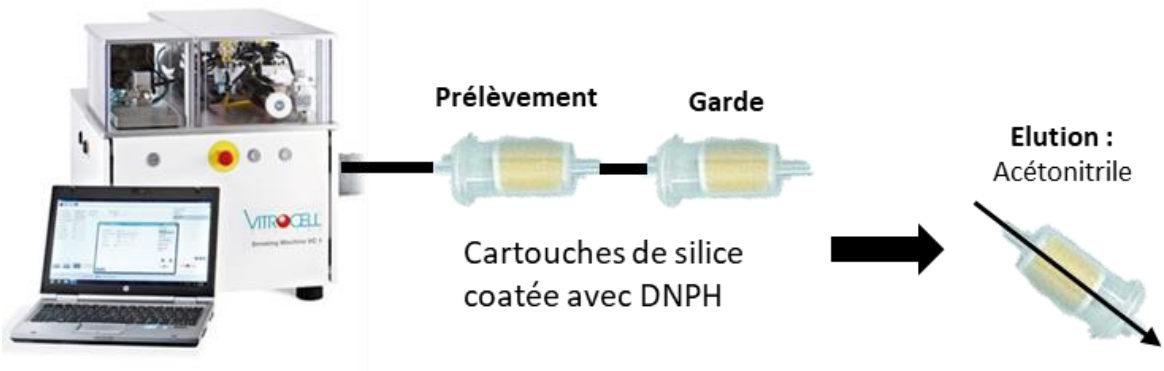


Figure 22. Schéma du montage expérimental pour la collection des composés carbonylés

2.1.2. Analyse des composés carbonylés

Les cartouches de DNPH de 350mg et 700mg ont été éluées respectivement avec 3 et 6 mL d'acétonitrile. Le volume mort de chaque cartouche a été pris en compte en pesant l'acétonitrile élué. Les éluâts des deux cartouches ont été rassemblés puis 2 µL ont été injectés dans un chromatographe à ultra-haute performance (UHPLC) Dionex UltiMate 3000 UHPLC System (Thermo Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis) couplé à un détecteur ultraviolet (UV/vis). La chromatographie liquide a été réalisée à une température de 28°C à un flux constant de 0,4mL/min d'un gradient d'acétonitrile et d'eau pendant 15 minutes. L'analyse a été effectuée dans une colonne Acclaim Carbonyl C18 RSCL 150mm x 2.1 mm x 5 µM (Thermo Fisher Scientific). L'acquisition a été réalisée à une longueur d'onde de 360 nm. La surveillance des bonnes conditions d'analyses et l'interprétation des chromatogrammes a été réalisée à l'aide du logiciel Chromeleon 7.0 Data Acquisition System for LC (Thermo Scientific). Des solutions de standards de concentration connue en composés carbonylés étaient passées régulièrement dans l'HPLC pour vérifier le bon déroulement de l'analyse. Le protocole utilisé a permis la détection de 19 composés carbonylés avec une limite de quantification allant 6 à 15 ng/mL (Tableau S 1).

2.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques

2.2.1. Collecte des aérosols

Les prélèvements de HAP ont été réalisés en sortie de la machine à fumer à l'aide de barboteurs frittés placés en série. Les aérosols ont été piégés dans 50 mL et 25 mL de méthanol contenus respectivement dans le premier et le deuxième barboteur maintenus

à -40°C grâce à un bain d'éthanol refroidi par ajout régulier de glace carbonique. Comme pour les composés carbonylés, le deuxième barboteur dit « de garde » servait à collecter les HAP qui n'auraient pas été piégés dans le premier. Un blanc a été réalisé en réalisant les prélèvements pendant que la machine fonctionnait normalement sans e-cig, iQOS ou cigarette. Pour prendre en compte une éventuelle pollution de l'air ambiant, la valeur du blanc a été retiré à chaque échantillon. Chaque prélèvement a été réalisé quatre fois et a ensuite été conservé à -20°C avant d'être analysé (Figure 23).

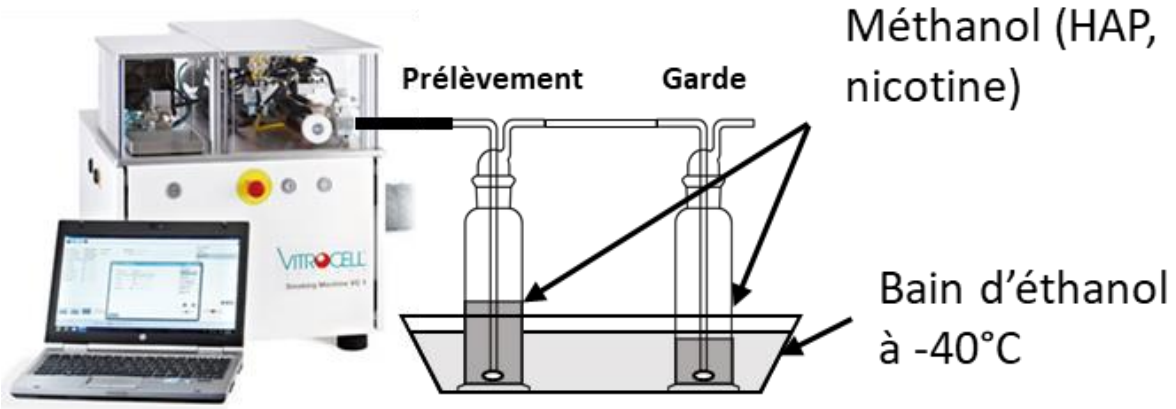


Figure 23. Schéma du montage expérimental pour la collection des hydrocarbures aromatiques polycycliques et de la nicotine.

2.2.2. Analyse des HAP

Les prélèvements ont été maintenus dans un bain à 45°C et concentrés à l'aide d'un évaporateur sous flux d'azote Zymark TurboVap LV (Caliper Life Sciences, Roissy Charles de Gaulle, France) pour faire évaporer le méthanol et pour atteindre un volume final de l'ordre du millilitre. Les échantillons ont été ensuite déposés sur un filtre en fibres de quartz. Au préalable, ces filtres avaient été calcinés à 500°C pendant 16 h pour éliminer toute trace de composés organiques résiduels.

Une fois les prélèvements concentrés et déposés sur le filtre, la matière organique a été extraite par liquide pressurisé à l'aide du dispositif Accelerated Solvent Extractor® (ASE) 200 de Dionex (Sunnyvale, Californie, États-Unis). Cette méthode permet d'augmenter l'efficacité d'extraction en se plaçant à des conditions de températures et de pressions élevées.

Les HAP présents sur le filtre sont extraits dans l'acétonitrile et reconcentrés par évaporation dans un bain à 60°C pour atteindre de nouveau un volume final de l'ordre du millilitre. Les solutions obtenues ont ensuite été filtrées puis injectées dans une HPLC Alliance 2695 couplée à un détecteur UV à barrette de diodes (Waters 2996) et un

fluorimètre à longueurs d'ondes multiples (Waters 2475). La chromatographie a été réalisée dans une colonne EC 250/2 Nucleosil 100-5 C18 PAH (Macherey Nagel, Hoerdt, France) spécifique pour des séparations des HAP. Des solutions de standards de concentration connue en HAP étaient injectées régulièrement dans l'HPLC pour vérifier le bon déroulement de l'analyse. Chaque composé mesuré avait un couple d'excitation/lecture optimal déjà mis au point permettant d'analyser la présence de 23 HAP avec des limites de quantification allant de 1 à 39 pg/mL (Tableau S 2).

2.3. Nicotine

La nicotine et le HAP contenus dans les aérosols ont été collectés simultanément dans les mêmes barboteurs (Figure 23). Chaque prélèvement a été réalisé quatre fois. Les extraits méthanoliques ont été dilués 40 fois dans l'eau. Afin de vérifier le bon déroulement de l'analyse, les échantillons ont été supplémentés avec de la D4-nicotine comme standard interne. Dix microlitres d'échantillons ont été injectés sur une colonne Acquity UPLCr HSS T3 1.8µm (Waters) puis analysé à l'aide d'un spectromètre de masse à triple quadripole. L'analyse s'est déroulée à 50°C dans un gradient d'acétonitrile et d'eau. La détection a été réalisée par électro-nébulisation.

3. Expérimentations *in vitro*

3.1. Modèle et méthode de culture cellulaire

Les expériences *in vitro* ont été réalisées sur la lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine BEAS-2B (ATCC® CRL9609™). Les cellules ont été cultivées dans un milieu sans sérum, le LHC-9 (Life Technologies, Courtabœuf, France), complété par des antibiotiques (pénicilline et streptomycine) à hauteur de 1%. Les cellules ont été ensemencées dans des flasques CellBIND de 75cm^2 (Corning, Amsterdam, Pays-Bas) puis maintenues dans une étuve à 37°C dans une atmosphère avec 5% de CO_2 et 85% d'humidité. Les cellules ont été repiquées lorsqu'elles atteignaient 80% de confluence au maximum puis ensemencées toujours au même nombre de 18 000 cellule/cm^2, dans des inserts de polyesters de 4,67 cm^2 avec des pores de 0,4µm (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et recouverts au préalable de collagène de type I (0,03 mg/mL). Les cellules ont d'abord été cultivées en immersion, c'est-à-dire avec 1 mL de milieu dans l'insert et 2 mL de milieu de culture dans le puits. Lorsque les cellules étaient confluentes, le milieu dans l'insert a été retiré pour ne laisser que le pôle basal des cellules en contact

avec le milieu. Le pôle apical est alors directement en contact avec l'air, permettant la culture en IAL (Figure 13). Les cellules restaient dans cette configuration pendant 24 h avant les expositions.

3.2. Exposition des cellules

Pour les expositions, les inserts de cellules étaient placés dans un module d'exposition Vitrocell 6/4 CF. Ce module permet d'exposer trois inserts simultanément et de les garder dans un environnement contrôlé, stérile et à 37°C (Figure 24). Elles étaient alors exposées à différentes doses d'aérosols non dilués d'e-cig, d'iQOS, et de 3R4F, définies par le nombre de bouffées générées par la machine à fumer. Les cellules contrôles n'ont pas été exposées et laissées dans l'incubateur. Il avait été montré au laboratoire lors d'expériences préliminaires qu'il n'y avait aucune différence de viabilité entre des cellules exposées à de l'air stérile dans le module d'exposition et des cellules laissées dans l'incubateur (Anthérieu *et al.*, 2017). Chaque exposition a été réalisée trois fois avec des cultures cellulaires de passages différents.

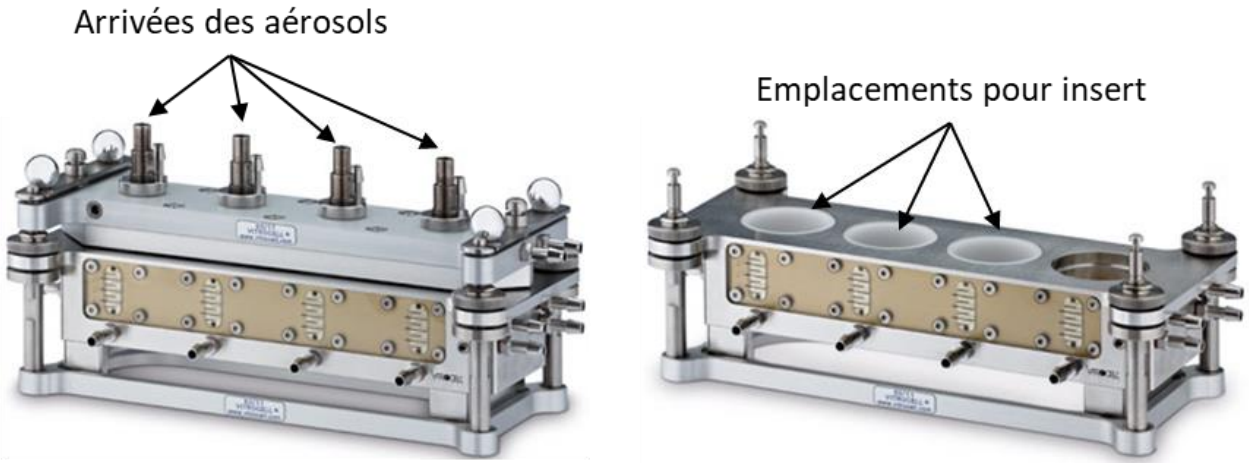


Figure 24. Illustration du module Vitrocell 6/4 CF utilisé pour les expositions in vitro, fermé hermétiquement à gauche et ouvert à droite. Le quatrième emplacement du module d'exposition peut accueillir une microbalance.

Pour refléter la circulation des aérosols dans les voies respiratoires et éviter la stagnation des émissions générées par la machine à fumer, une aspiration active a été mise en place en aval des inserts. Avant chaque expérience, l'aspiration et le débit d'air circulant dans le module d'exposition étaient mesurés pour s'assurer qu'ils étaient identiques pour tous les inserts et pour toutes les expériences menées.

La Figure 25 résume le design expérimental des expérimentations *in vitro*. Chaque analyse est expliquée en détails dans la partie correspondante.

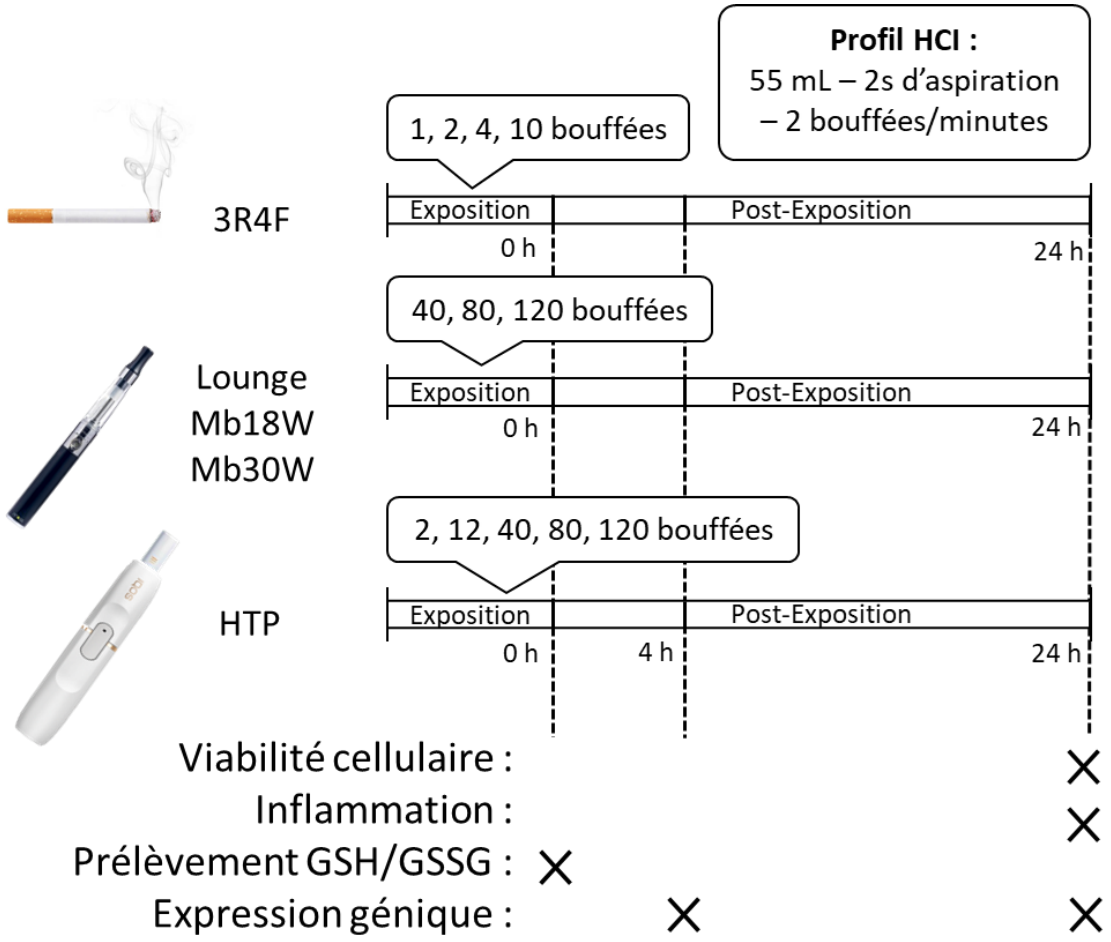


Figure 25. Schéma expérimental des expériences in vitro.

3.3. Analyse de la viabilité cellulaire

Les cellules BEAS-2B ont été exposés aux aérosols non dilués des différents dispositifs testés : 40, 80 et 120 bouffées pour l'e-cig, 2, 12, 40, 80 et 120 bouffées pour le tabac chauffé et 1, 2, 4 et 10 bouffées pour la cigarette 3R4F. Une fois exposées, les cellules ont été replacées dans l'incubateur et la viabilité cellulaire a été mesurée 24 h après les expositions à l'aide du kit CellTiter-Glo Luminescent (Promega, Charbonnières, France). Ce kit consiste à mesurer la concentration de l'ATP intracellulaire par chimiluminescence grâce à l'oxydation de la luciférine en présente d'ATP. La luminescence mesurée à la fin de la réaction est ainsi proportionnelle au contenu de la cellule en ATP, ce qui reflète l'activité métabolique de la cellule et par extension la viabilité cellulaire. Le taux d'ATP des cellules exposées est exprimé en pourcentage du taux retrouvé dans les cellules contrôles, dont la valeur a été arbitrairement fixée à 100%.

3.4. Mesure des médiateurs de l'inflammation

Les cellules BEAS-2B ont été exposées aux aérosols non dilués des différents dispositifs testés : 40 et 120 bouffées pour l'e-cig, 2, 12 et 40 bouffées pour le tabac chauffé, et 1 et 2 bouffées pour la cigarette 3R4F. Une fois exposées, les cellules ont été replacées dans l'incubateur et les milieux de culture ont été récupérés 24h après, puis conservés à -80°C. Les concentrations de dix médiateurs de l'inflammation sécrétés ont été mesurées : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor (GM-CSF), Growth Regulated Oncogene α (GRO-α), Interleukine 1β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8), Interleukine 13 (IL-13), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1), Macrophage Inflammatory Protein 1-α (MIP- α), Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES) et *Tumor Necrosis Factor - α*. Le dosage de ces protéines a été réalisé grâce au kit MilliPlex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck Millipore, Molsheim, France). Ce kit utilise la technologie Luminex® xMAP® (Luminex Corp., Austin, Texas, Etats-Unis) qui permet de doser un grand nombre d'analytes avec un volume faible d'échantillon. Cette technologie se base sur des microbilles de polystyrène sur lesquelles sont présents des anticorps spécifiques qui reconnaissent la protéine d'intérêt. Une fois l'analyte capturé, les billes sont comptées à l'aide d'anticorps de détection fluorescents. La lecture de fluorescence a été réalisée sur le Luminex Magpix® et les données ont été traitées par le logiciel Milliplex® Analyst 5.1 Software (Merck Millopre). La capacité des cellules BEAS-2B à sécréter les médiateurs de l'inflammation d'intérêt avait été préalablement testée après un traitement au lipopolysaccharide à 50 µg/mL pendant 24h.

3.5. Analyse du glutathion

Les concentrations en glutathion oxydé et total ont été mesurées dans les cellules BEAS-2B exposées aux aérosols non dilués pendant 40 et 120 bouffées pour l'e-cig, 2, 12 et 40 bouffées pour le tabac chauffé, et 1 et 2 bouffées pour la cigarette 3R4F. Le glutathion a été quantifié directement après les expositions aux différents aérosols. Les cellules ont été lysées dans un tampon RIPA (KCL à 142 mM, $MgCl_2$ à 5 mM, EDTA à 1 mM, glycérol à 5%, SDS à 0,1%, NP40 à 1% et HEPES à 20 mM dans de l'eau ultrapure) dans lequel a été ajouté des inhibiteurs de protéases et de phosphatases MS-SAFE (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri). Pour arrêter les réactions d'oxydo-réduction du glutathion immédiatement après les expositions, de l'acide métaphosphorique à 10% a été rajouté

dans les lysats, puis les échantillons ont été stockés à -80°C. Le kit GSH/GSGG-Glo™ (Promega) a été utilisé pour mesurer les concentrations en glutathion. Ce kit permet de doser le glutathion total et le glutathion oxydé par chimiluminescence. Le glutathion réduit (GSH) est ensuite déduit par la soustraction du glutathion total par le glutathion oxydé (GSSG). Les ratios GSSG/GSH ont ensuite été calculés pour chaque échantillon. Enfin, les résultats sont exprimés en fonction du ratio GSSG/GSH des cellules contrôles qui a été arbitrairement fixé à 1.

3.6. Extraction des ARN

Les ARN des cellules BEAS-2B ont été extraits en utilisant le kit RNeasy plus mini kit (Qiagen, Courtabœuf, France). Les cellules ont été lysées dans un tampon fourni par le kit supplémenté par du β-mercaptoéthanol suivant les recommandations du fournisseur. Les ARN ont ensuite été extraits par un automate Qiacube (Qiagen) avec le protocole fourni par le fabricant, puis quantifiés par analyse spectrophotométrique sur un lecteur Spark (Tecan, Männedrof, Suisse).

3.7. Analyse de l'expression des gènes

Les ARN extraits ont été rétro-transcris en ADNc grâce au kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Californie, Etats-Unis). L'expression génique de 12 gènes a été analysées par qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) en temp réel à l'aide du Thermocycler StepOnePlus (Applied Biosystems) en utilisant des Taqman assays et le tampon Taqman Fast Advanced Mix (Applied Bioystems). Les Taqman assays utilisées étaient les suivants : Hs99999901_m1 pour *18S* ; Hs00907314_m1 pour *AHR* ; Hs_01054797_m1 pour *CYP1A1* ; Hs_00164383_m1 pour *CYP1B1* ; Hs03044634_m1 pour *CYP2B6* ; Hs_00975961_m1 pour *NRF2* ; Hs01110250_m1 pour *HMOX1* ; Hs01045993_m1 pour *NQO1* ; Hs00174131_m1 pour *IL-6* ; Hs00174097_m1 pour *IL-1β* ; Hs00234140_m1 pour *MCP1* ; Hs00236937_m1 pour *GRO-α*. Après exposition à 120 bouffées pour l'e-cig, 12 bouffées pour le tabac chauffé et 1 bouffée pour la cigarette, l'expression génique de ces gènes d'intérêt a été analysée 4h ou 24h après la fin des expositions.

Les courbes d'amplification ont été analysées dans le cloud Thermo Fisher en utilisant la méthode comparative des cycles seuils. Les résultats ont été normalisés grâce au gène de ménage *18S*. Les expressions ont été rapportées en comparaison des niveaux

d'expression retrouvés dans les cellules contrôles dont les valeurs ont été arbitrairement fixées à 1.

3.8. Analyses statistiques

Pour les expériences *in vitro*, toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec un test non-paramétrique de Mann-Whitney à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., Californie, Etats-Unis). Les résultats étaient considérés comme significatifs lorsque p était inférieur à 0,05.

4. Expérimentations *in vivo*

4.1. Souris et design expérimental des expérimentations *in vivo*.

Les expériences ont été menées sur des souris mâles BALB/c âgées de 6 semaines au début des expositions. Cette lignée de souris est décrite comme relativement sensible à l'induction chimique de cancers pulmonaires (Meuwissen, 2005). Les animaux ont été hébergés dans l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Trois séries d'exposition ont été réalisées : des expositions aiguës de 4 jours et

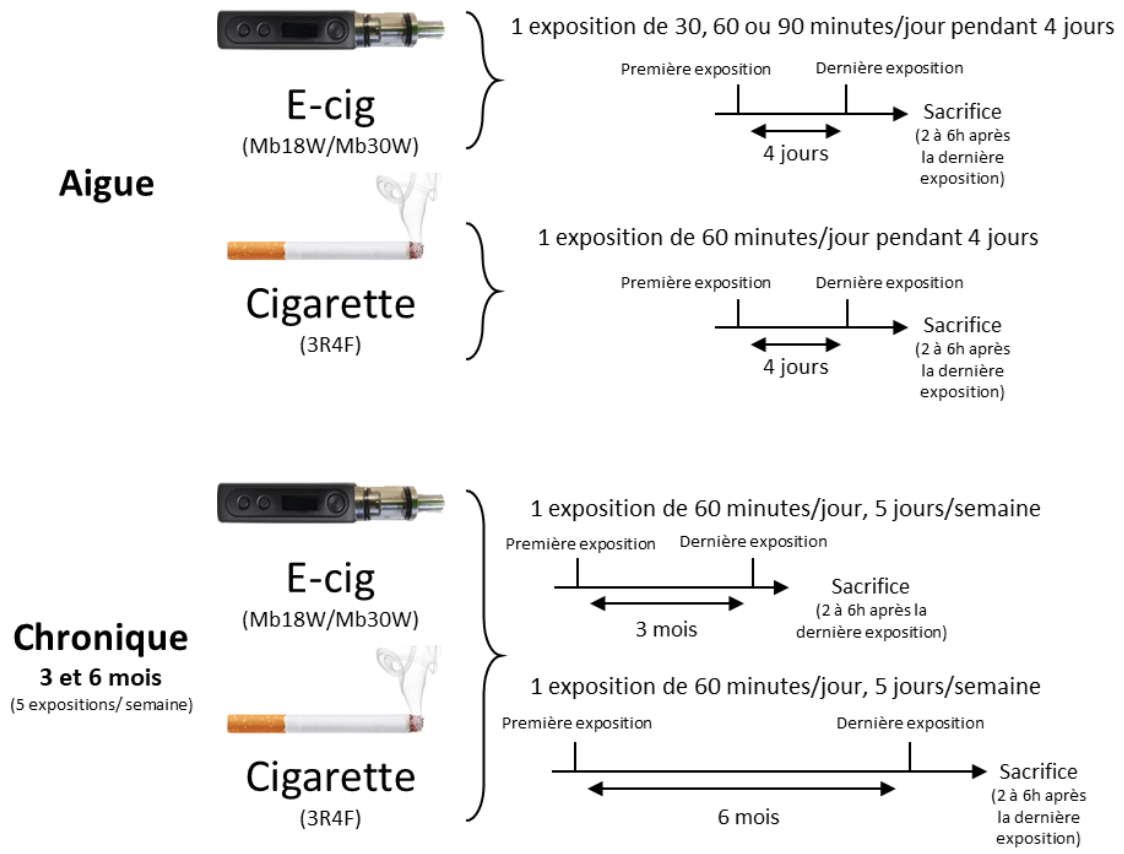


Figure 26. Schéma expérimental des expositions in vivo.

des expositions chroniques de 3 mois et de 6 mois. Les expositions aiguës ont consisté en 4 jours d'exposition consécutifs, soit pendant 30, 60 ou 90 minutes aux aérosols de l'e-cig Modbox réglé à 18 W ou à 30 W, soit pendant 60 minutes aux aérosols de cigarette 3R4F. Les expositions chroniques ont consisté à des expositions de 60 minutes aux aérosols de l'e-cig Modbox réglé à 18 W ou à 30 W, ou aux émissions de cigarette 3R4F, 5 fois par semaine pendant 3 ou 6 mois. Les souris contrôles ont été placées dans les mêmes conditions que les souris exposées mais sans exposition à une quelconque émission. La Figure 26 présente le schéma expérimental des expositions *in vivo*.

4.2. Machine à fumer et modules d'exposition

Les expositions ont été réalisées avec des systèmes *inExpose* commercialisés par Emka SCIREQ® (Montréal, Québec, Canada). Deux équipements différents ont été utilisés indépendamment selon la nature des expositions. Le premier est un système permettant d'allumer automatiquement les cigarettes 3R4F les unes après les autres (Figure 27A). Il est relié à une chambre de dilution puis à une tour d'exposition. Le deuxième est composé d'un appareillage permettant le déclenchement automatique de l'e-cig Modbox pour enchaîner les bouffées (Figure 27B). Il est relié à une chambre de condensation, à une chambre de dilution et enfin à une tour d'exposition. La tour d'exposition permet d'exposer simultanément 24 animaux en « nose-only » à l'aide d'un filet de contention qui maintient la tête des animaux au niveau de l'arrivée des émissions d'e-cig ou de cigarette (Figure 27C). Les 24 animaux ont été ensuite divisés en 3 lots de 8 souris. Un lot dédié aux analyses histologiques, un lot dédié aux analyses de la fonction respiratoire et un lot dédié à nos analyses transcriptomiques et épigénétiques. Le profil de bouffée HCI a été utilisé pour tous les dispositifs testés comme pour les expériences *in vitro*. L'équipement déclenchant automatiquement l'e-cig était configuré pour appuyer sur le bouton poussoir une seconde pour faire préchauffer la résistance avant le début de la bouffée.

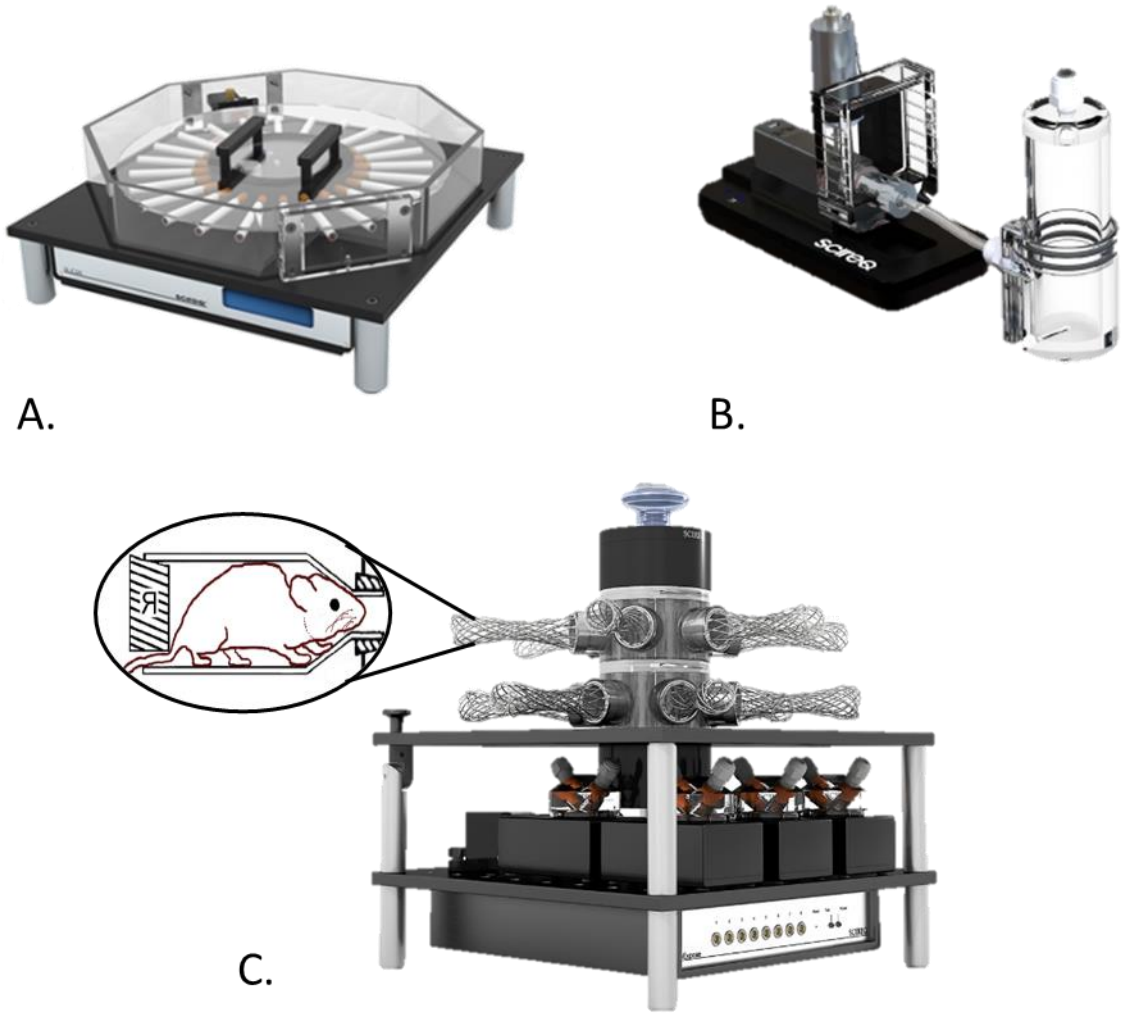


Figure 27. Illustration du système inExpose avec le système pour cigarette (A), e-cig (B) et le module d'exposition (C).

4.3. Sacrifices et recueils des échantillons

Les souris ont été sacrifiées par anesthésie léthale avec un mélange kétamine/xylazine. L'ordre des sacrifices a été randomisé pour éviter les effets du cycle circadien. Le sang a été prélevé par ponction intracardiaque et une partie a été réservée pour réaliser les tests du *Pig A*. L'autre a été centrifugée à 1200 g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les cellules sanguines. Le surnageant a ensuite été centrifugé à 16000 g pendant 5 minutes à 4°C pour éliminer d'éventuels débris cellulaires. Le plasma obtenu a été conservé à -80°C. Ensuite les poumons ont été prélevés et divisés en trois parties : la première partie, réservée aux extractions d'acide nucléiques, a été conservés dans le RNA Later™ (Thermo Fisher Scientific), conservés à 4°C 48 h, puis stockés à -20°C, selon les instructions du fabricant ; la deuxième partie destinée aux extractions protéiques a été congelée à sec dans de l'azote liquide puis conservée à -80°C ; la troisième partie a été

conservée à 4°C dans du PBS pour réaliser les analyses de génotoxicité. Le foie a également été prélevé et divisé de la même façon en trois morceaux. Enfin, les fémurs des souris ont été récupérés pour extraire la moelle osseuse afin de réaliser le test du micronoyau. L'ensemble de ces sacrifices ont été réalisées sur 8 souris par condition.

4.4. Analyse de la génotoxicité

L'évaluation du potentiel génotoxique *in vivo* des émissions d'e-cig et de 3R4F a été réalisée par le laboratoire de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille. Les prélèvements biologiques destinés à chaque test ont été récupérés 2 à 6 heures après la dernière exposition (OCDE n°489 et n°474). Le test des comètes, visant à mettre en évidence les altérations primaires de l'ADN a été réalisé sur les poumons et le foie des souris exposées pendant 4 jours, 3 mois et 6 mois aux différentes émissions. Le test du micronoyau a été réalisé sur moelle osseuse pour évaluer les aberrations chromosomiques après les expositions chroniques (3 et 6 mois). Le test du *Pig-A* qui permet d'identifier d'éventuelles mutations géniques a été réalisés sur le sang des souris exposées pendant 3 et 6 mois. La réalisation des tests ainsi que l'interprétation des données ont été faites conformément aux lignes directrices de l'OCDE n°489 et n°474 pour les tests des comètes et du micronoyau, respectivement, et aux recommandations internationales pour le test du *Pig-A*.

4.4.1. Test des comètes

Des cellules ont été isolées par digestion enzymatique avec de la collagénase à partir de poumons fraîchement prélevés. Les cellules recueillies ont été incluses dans un gel d'agarose déposé sur une lame de microscope. Les microgels obtenus ont été soumis aux étapes de lyse des membranes cellulaires et nucléaires, de dénaturation de l'ADN puis d'électrophorèse à l'abri de la lumière. Les lames ont été ensuite déshydratées puis colorées par un agent intercalant fluorescent (iodure de propidium) avant l'analyse et la quantification de la fragmentation de l'ADN. Les images de 50 noyaux sélectionnés aléatoirement ont été analysées pour chaque lame étudiée. Pour chaque animal, au moins 3 lames ont été analysées, soit 150 noyaux. Les résultats sont alors exprimés en pourcentage de fragments d'ADN dans la queue de la comète.

4.4.2. Test des micronoyaux

Le test du micronoyau consiste à détecter des anomalies de migration de fragments chromosomiques ou de chromosomes entiers lors de l'anaphase qui ne sont pas retenus

dans le noyau des cellules filles. Ils apparaissent alors sous forme de corps de Howell-Jolly ou « micronoyau ». Ce test permet de mettre en évidence le retard mitotique, l'apoptose, les cassures chromosomiques, la perte d'un ou plusieurs chromosomes et la non-disjonction des chromosomes. Il a été réalisé de façon standard (OCDE 474) à partir de la moelle osseuse des souris exposées aux différents dispositifs. Après le traitement des souris, les fémurs ont été récupérés pour extraire la moelle osseuse dans du sérum de veau fœtal. Les culots de centrifugation ont été homogénéisés, déposés sur des lames et colorés. La fréquence des érythrocytes polychromatiques avec un ou plusieurs micronoyaux a été déterminée en comptant au moins 2000 de ces cellules par animal.

4.4.3. Test du Pig-A

Le test du Pig-A est un test de mutation génique *in vivo* réalisé par cytométrie en flux. Le gène du Pig-A est impliqué dans la synthèse du récepteur membranaire phosphatidyl-inositol glycane (PIG), nécessaire à l'ancrage membranaire de plusieurs protéines des cellules sanguines, notamment le CD59. Ce dernier est couplé à un fluorophore et est étudié dans deux populations de cellules : les érythrocytes totaux (RBC) et les réticulocytes circulants (RET) contenant encore de l'ARN. Le gène Pig-A étant situé sur le chromosome X, une mutation de la seule copie fonctionnelle présente chez les mâles conduit à une protéine non fonctionnelle. Les cellules seront alors déficientes en marqueurs de surface CD59. La fréquence de cellules CD59- pourra être alors directement liée à la fréquence de mutations induites par le composé d'intérêt. Le test Pig-A a été réalisé sur le sang des souris exposées. Après séparation des différentes populations sanguines, les érythrocytes totaux sont isolés puis marqués avec l'anticorps anti-CD59 murin couplé à la phycoérythrine. Les réticulocyte circulants contenant encore de l'ARN sont différenciés par un marquage au Syto 13. Les deux populations ont été discriminées et comptées par cytométrie en flux pour déterminer la fréquence de mutation.

4.5. Extraction de l'ADN pulmonaire

Les ADN pulmonaires ont été extraits à partir de tissus pulmonaires conservés dans le RNAlater™. Pour chaque poumon, 15 à 25 mg de tissu ont été homogénéisés avec le Gentlemacs Dissociator (Miltenyi Biotec). Les ADN totaux ont ensuite été extraits à l'aide de l'automate Qiacube (Qiagen) en suivant les instructions du kit QiaAmp DNA mini (Qiagen). Ce protocole contient une étape de digestion à la protéinase K qui permet

d'optimiser le rendement d'extraction et de purifier des acides nucléiques. Les ADN totaux ont ensuite été dosés par analyse spectrophotométrique sur le lecteur Spark (Tecan).

4.6. Dosage de la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OHdG) pulmonaire

La concentration de 8-OHdG est un biomarqueur couramment utilisé pour détecter le niveau de stress oxydant. Les échantillons d'ADN ont été prétraités par une digestion à la nucléase P1 en utilisant les réactifs du kit Wako 8-OHdG Assay Preparation (Wako, Tokyo, Japon). Les concentrations en 8-OHdG ont été dosées sur les ADN digérés à l'aide du kit Oxiselect Oxydative DNA Damage (Cell Biolabs Inc., Californie, Etats-Unis) en suivant les recommandations du fabricant. Il s'agit d'un test ELISA compétitif qui permet de quantifier la concentration en 8-OHdG par absorbance à 450nm.

4.7. Analyse de la méthylation globale de l'ADN pulmonaire

La méthylation globale de l'ADN a été analysée à partir des ADN extraits comme décrit précédemment, en utilisant le kit Global DNA Methylation LINE-1 (Active Motif, La Hulpe, Belgique). Ce kit permet de quantifier le taux de 5-méthylcytosine au sein des motifs LINE-1 de l'ADN. Cinq cents nanogrammes d'ADN ont été digérés par l'enzyme de restriction *Mse*I pour produire des fragments de 290 paires de base contenant un motif LINE-1 correspondant à 10 résidus CpG. Cinquante nanogrammes d'ADN ainsi fragmentés ont été déposés sur une plaque de microtitration pour quantifier par méthode ELISA la méthylation de l'ADN à l'aide d'anticorps anti-5-méthylcytosine. La lecture des résultats a été réalisée par mesure de l'absorbance à 450 nm sur le spectrophotomètre Spark (Tecan) avec une longueur d'onde de référence à 655nm.

4.8. Extraction protéique

Les protéines pulmonaires ont été extraites à partir du tissu pulmonaire des souris exposées. Vingt-cinq à trente-cinq milligrammes de tissu ont été broyés et homogénéisés dans un tampon RIPA supplémenté d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases à l'aide du Gentlemacs Dissociator (Miltenyi Biotec). Les protéines ont été ensuite dosés à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific)

4.9. Dosage de l'enzyme HDAC

L'activité des histones désacétylases a été mesurée par fluorescence à partir d'extraits de protéines total (environ 25 µg) à l'aide du kit HDAC Assay (Active Motif). Le

principe de ce kit est d'ajouter un substrat en présence d'extraits protéiques pulmonaires qui contient un résidu lysine acétylé et qui relargue un fluorophore lorsqu'il est désacétylé par l'enzyme HDAC. Des contrôles positifs et un inhibiteur spécifique des HDAC ont été fournis dans le kit afin de vérifier le bon fonctionnement de l'expérimentation. La lecture en fluorescence a été réalisé à 360nm pour l'émission et à 460nm pour l'excitation à l'aide du lecteur Spark (Tecan).

4.10. Dosage de l'enzyme HAT

L'activité des histones acétyltransférases a été mesuré par fluorescence à partir de protéines totales de poumon des souris exposées à l'aide du kit HAT Assay (Active Motif). Le principe de ce kit est d'ajouter de l'acétylcoenzyme-A (acétyl-CoA) et des substrats d'histone H3 aux échantillons. Pendant la réaction, les enzymes HAT présentes dans les échantillons transfèrent le groupement de l'acétyl-CoA sur les histones H3 générant des CoA-SH. Ce sont les groupements thiol qui sont mesurés pour témoigner de l'activité des HAT. Des contrôles positifs et un inhibiteur spécifique des HAT ont été utilisés pour vérifier le bon déroulement de l'expérimentation. La lecture en fluorescence a été réalisé à 360 nm pour l'émission et à 460 nm pour l'excitation à l'aide du lecteur Spark (Tecan).

4.11. Extraction des ARN pulmonaires

Les ARN pulmonaires ont été extraits à partir des poumons conservés dans le RNAlater™. Quinze à vingt-cinq milligrammes de tissus pulmonaires ont été broyés dans 700µL de QIAzol (Qiagen) à l'aide du système Gentlemacs Dissociator (Miltenyi Biotec, Paris, France). Après homogénéisation des tissus, l'ajout de chloroforme a permis d'isoler les acides nucléiques des protéines dénaturées. Le mélange a été centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 12 000 G puis la phase aqueuse a été récupérée pour purifier les ARN à l'aide de l'automate Qiacube (Qiagen) en suivant les recommandations du kit miRNeasy plus mini (Qiagen) qui permet d'extraire les ARN et les miARN. Une digestion à la DNase I a été effectué dans le but d'éliminer d'éventuelles traces d'ADN génomiques résiduelles. Les ARN ainsi extraits ont ensuite été quantifiés par analyse spectrophotométrique sur le lecteur Spark (Tecan).

4.12. MicroArrays

Les expériences de microarray ont été réalisées par la plateforme de génomique fonctionnelle de l'Université de Lille (Centre de Biologie Pathologie du CHU de Lille) à

l'aide de micropuces 8x60k OneColor (Agilent Technologies) couplées à des oligonucléotides de 60-mer couvrant l'ensemble du génome de la souris. Le marquage, l'hybridation, et la détection des ARNc ont été réalisés selon les instructions du fabricant (Agilent Technologies). Pour chaque micropuce, les ARNc couplés à la Cyanine 3 ont été synthétisés par le Kit Low input QuickAmp à partir de 50ng d'ARN total. Des ARN Spike-In ont été rajoutés à chaque tube et utilisés comme contrôles positifs de l'étape de marquage et de l'amplification. Les ARNc marqués ont été purifiés et 600ng de chaque ARNc ont ensuite été hybridés avec les micropuces en suivant les instructions du fabricant. Après lavage, les micropuces ont été scannées et les données ont été ensuite exportées par le logiciel « Agilent Feature Extraction Software© » (FE version 10.7.3.1).

L'interprétation des résultats a ensuite été réalisée en sélectionnant les ARNm dont l'expression était au moins significativement 1,5 fois supérieure ou 1,5 fois inférieure à celle des souris contrôles non exposées ($p<0,05$). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le package « *linear models for microarray data* » (limma) pour R, en utilisant le « *moderated t statistics* » avec des données normalisées. L'analyse fonctionnelle des ARN pulmonaires dérégulés sélectionnés a été réalisée grâce à l'utilisation du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen). Ce logiciel croise les données de la littérature avec les gènes retrouvés dérégulés pour prédire les voies de signalisation ou fonctions biologiques qui pourraient être affectées. Il peut également estimer l'état d'activation de ces voies dérégulées grâce au z-score : un z-score positif signifie qu'une voie est activée et un z-score négatif signifie qu'une voie est inhibée.

4.13. OpenArrays

Le design expérimental des analyses de l'expression des miARN au niveau pulmonaire est résumé dans la Figure 28. La transcription inverse des miARN a été effectuée à partir de 100 ng d'ARN total à l'aide du kit Megaplex™ RT Primers (ThermoFisher). Une étape de préamplification a été réalisée à l'aide du kit Megaplex™ PreAmp (ThermoFisher). Enfin, les ADNc préamplifiés ont été dilués au 40ème dans un tampon Tris EDTA à pH 8,0 (Ambion) selon les recommandations du fabricant. Les ADNc préamplifiés ont été déposés sur les lames OpenArrays grâce au robot Accufill (Applied Biosystems). Après les réactions d'amplification, l'analyse de l'expression des miARN a été ensuite réalisée par OpenArrays avec le système QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems). Cette technique consiste à réaliser des RT-PCR quantitatives à très haut-

débit avec la technologie Taqman. Les lames Taqman OpenArray Rodent miRNA (Applied Biosystems) utilisées ont permis de quantifier simultanément l'expression de 754 miARN. L'analyse informatique a été effectuée en sélectionnant les miARN dont l'expression était au moins significativement 1,5 fois supérieure ou 1,5 fois inférieure à celle des souris contrôle non exposées ($p < 0,05$, test de student, n=8 souris par condition).

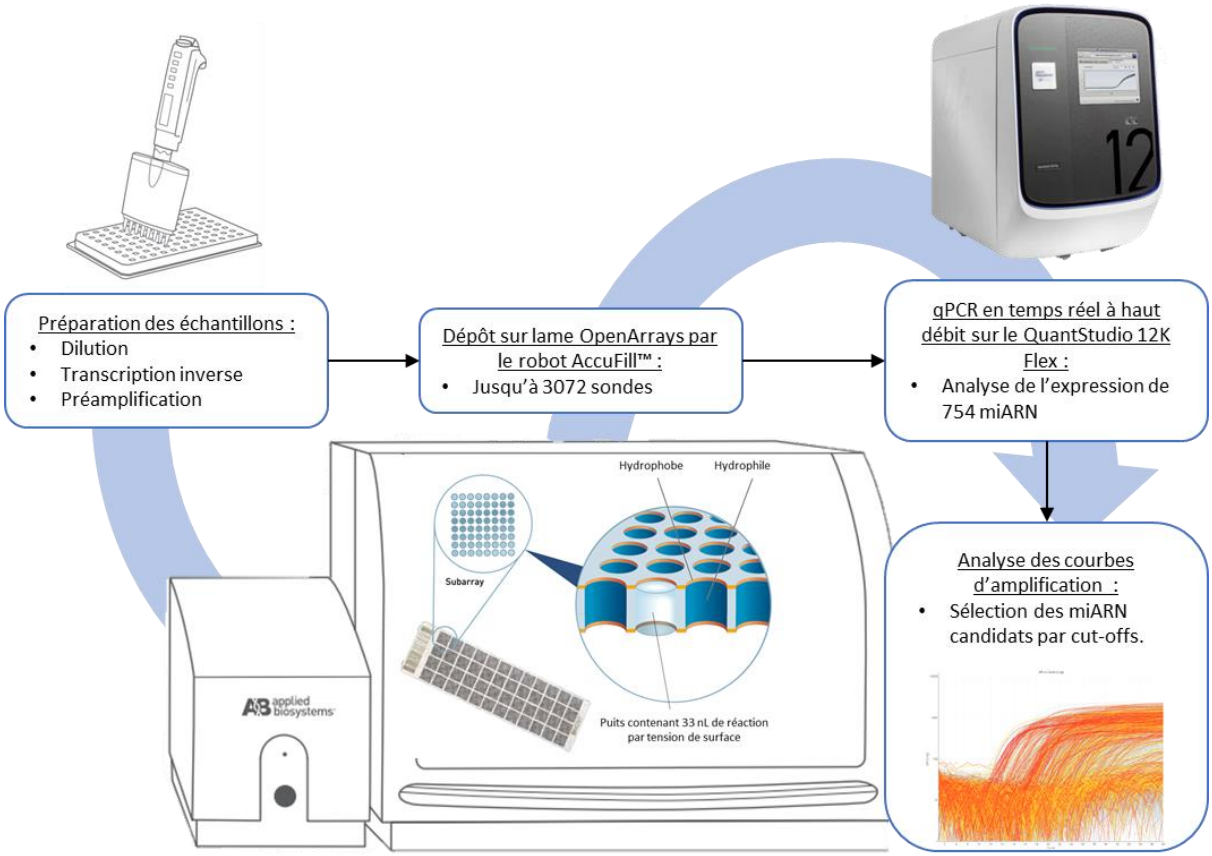


Figure 28. Schéma expérimental de l'analyse des miARN par la technologie OpenArrays.

4.14. Analyses statistiques

Pour les expériences de dosage de la 8-OHdG, de génotoxicité, de méthylation globale de l'ADN et de modification des histones réalisées *in vivo*, les analyses statistiques ont été effectuées avec un test non-paramétrique de Mann-Whitney à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., Californie, Etats-Unis). Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque p était inférieur à 0,05 (n=8 souris par condition).

Résultats et discussions

Caractérisation chimique des émissions d'e-cig, de tabac chauffé et de cigarette

Résultats et discussions

1. Caractérisation chimique des émissions d'e-cig, de tabac chauffé et de cigarette

A ce jour, un grand nombre d'études propose de caractériser les émissions d'e-cig. Mais les méthodologies utilisées sont très différentes et les protocoles d'exposition sont parfois non représentatifs d'une utilisation réelle. De plus, il y a un manque de données sur les aérosols d'e-cig de dernière génération qui sont aujourd'hui majoritaires sur le marché de l'e-cig. D'autre part, les données de caractérisation chimique des émissions de tabac chauffé sont encore peu nombreuses et surtout, le peu d'études publiées ont été réalisées ou financées par l'industrie du tabac.

L'objectif des fournisseurs d'e-cig et de tabac chauffé est de placer leurs produits sur le marché en tant qu'alternatives plus saines à la cigarette. Il semble alors crucial de comparer la toxicité de ces deux dispositifs concurrents qui proposent de délivrer de la nicotine avec des principes totalement différents. Or, alors que les comparaisons entre l'iQOS et la cigarette classique sont décrites dans la littérature, celles entre l'iQOS et l'e-cig sont plus rares. La comparaison entre ces deux dispositifs pourrait participer à la clarification du rapport bénéfices/risques de leur utilisation et faciliter leur positionnement dans la lutte contre le tabagisme. La première partie de ce travail a donc consisté à caractériser et à comparer chimiquement les aérosols des 3 e-cig testées (Lounge et Modbox réglée à 18 W (Mb18W) ou à 30 W (Mb30W)), du tabac chauffé (HTP, système iQOS de PMI)) et de la cigarette (cigarette de référence 3R4F). Le dosage de la nicotine, des composés carbonylés et des HAP a été réalisé sur des émissions générées par la machine à fumer VitroCell VC1 en utilisant le profil de bouffée HCI (55 mL de bouffée pendant 2 secondes toutes les 30 secondes).

1.1. Températures des aérosols générés

Avant de récolter les émissions des différents dispositifs, la température des aérosols générés a été mesurée au niveau de la sortie de chacun des dispositifs étudiés. Cette mesure était nécessaire, notamment pour les e-cig, afin de vérifier que les réglages et le profil de bouffée généraient des aérosols dans des conditions réalistes de température. La température a été relevée par une sonde pendant la durée complète de la consommation d'un stick de tabac chauffé (12 bouffées), d'une cigarette (10 bouffées) et pendant la durée

maximale d'utilisation de l'e-cig durant les expérimentations *in vitro* (120 bouffées) (Figure 29).

Concernant l'e-cig, la température mesurée à la sortie diffère selon le modèle. En effet, alors que les aérosols du modèle Lounge sont émis à température ambiante (entre 23 et 26°C), celles de la Mb18W atteignent rapidement 31°C et stagnent à cette température jusqu'à la fin de l'expérience (120 bouffées). C'est le modèle à la plus forte puissance, la Mb30W qui génère les émissions les plus chaudes puisqu'elles sont à plus de 30°C dès les premières bouffées pour atteindre un maximum de 50°C après 120 bouffées, soit 60 minutes d'utilisation. Comme ce qui a été observé pour la Lounge, les émissions de tabac (HTP) chauffé et de cigarette mesurées en aval des filtres sont à température ambiante.

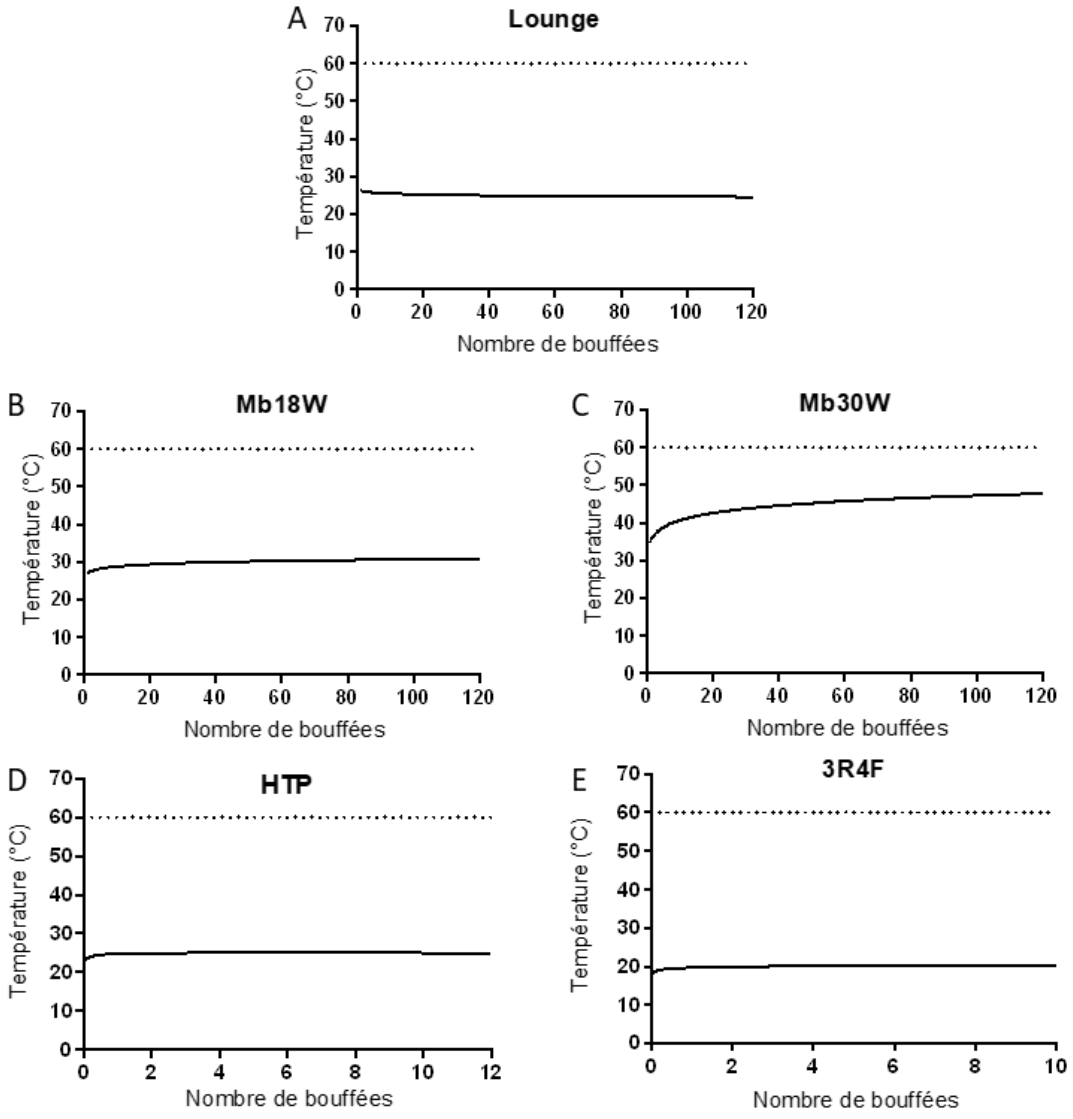


Figure 29. Températures (en °C) des aérosols générés par 3 modèles d'e-cig (Lounge, Mb18W, Mb30W), de HTP ou de 3R4F en fonction du nombre de bouffée.

1.2. Analyse de la nicotine

La capacité du tabac chauffé et de l'e-cig à remplacer la cigarette est liée aux quantités de nicotine qui pourront être délivrées à l'utilisateur. Les données de littérature suggèrent en effet que ce dernier auto-régule sa consommation en fonction de la satisfaction que lui apporte le dispositif en termes de quantité de nicotine (Farsalinos *et al.*, 2018a; Woodward and Tunstall-Pedoe, 1993). C'est pourquoi ces quantités ont été mesurés dans les émissions des 3 modèles d'e-cig (Lounge, Mb18W et Mb30W) utilisant un e-liquide à 16 mg/mL de nicotine, du tabac chauffé (HTP) et de la cigarette 3R4F. La quantité de nicotine retrouvée dans les aérosols est rapportée dans la Figure 30.

Avec le profil de bouffée utilisé, le HTP émet environ 30 % de moins de nicotine que la cigarette (63 µg/bouffée contre 95 µg/bouffée). Concernant les e-cig, c'est le modèle de deuxième génération Lounge qui émet le moins de nicotine (8 µg/bouffée) comparé à tous les autres dispositifs testés. Le modèle de troisième génération montre quant à lui une relation entre le réglage de la puissance et la quantité de nicotine retrouvée dans les émissions. En effet, il émet 60 µg/bouffée lorsqu'il est réglé à 18 W et 137 µg/bouffée lorsqu'il est réglé à 30 W. La quantité de nicotine émise est donc très variable entre les dispositifs testés (de 8µg à 137µg/bouffée) malgré un profil de bouffée identique. Or, la nicotine est un facteur qui influence la prise de bouffée d'un fumeur, il sera alors important de prendre en compte ce paramètre pour les autres analyses.

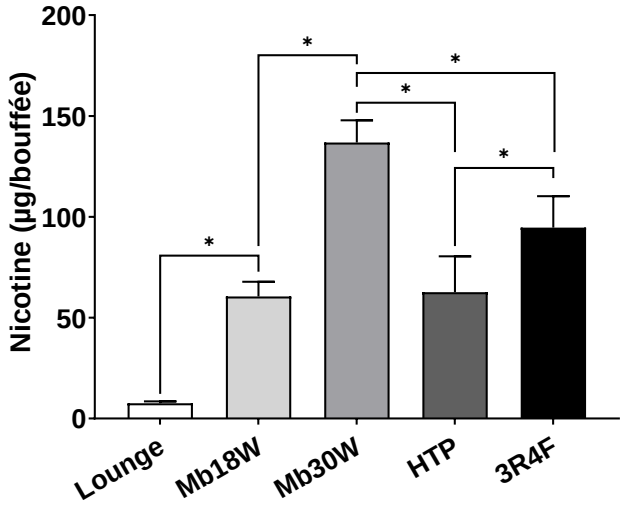


*Figure 30. Quantité de nicotine (en µg/bouffée) dans les aérosols d'e-cig (Lounge, Mb18W et Mb30W), de HTP et de 3R4F. Les données représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes. * p < 0,05*

1.3. Analyse des composés carbonylés

Un total de 20 composés carbonylés a été dosé dans les émissions des 3 modèles d'e-cig (Lounge, Mb18W ou Mb30W), de HTP et de cigarette. Ce dosage est effectué à l'aide de cartouches imprégnées de DNPH qui peuvent capturer une certaine quantité de

composés carbonylés. De précédents résultats obtenus au laboratoire ont montré qu'une cartouche pouvait être utilisée pour un maximum de 20 bouffées d'aérosols d'e-cig avant d'être saturée (Beauval *et al.*, 2017). Or, les tests *in vitro* se déroulent jusqu'à 60 minutes, à raison de 2 bouffées par minute, soit 120 bouffées au total. Des tests ont alors été réalisés pour déterminer s'il y avait une différence dans la génération de composés carbonylés en fonction du temps de fonctionnement de l'e-cig. Des prélèvements de 20 bouffées ont été effectués toutes les 10 minutes pendant une heure pour le modèle d'e-cig de troisième génération. Les quantités totales en composés carbonylés par tranche de 10 minutes (ou 20 bouffées) sont représentées dans la Figure 31.

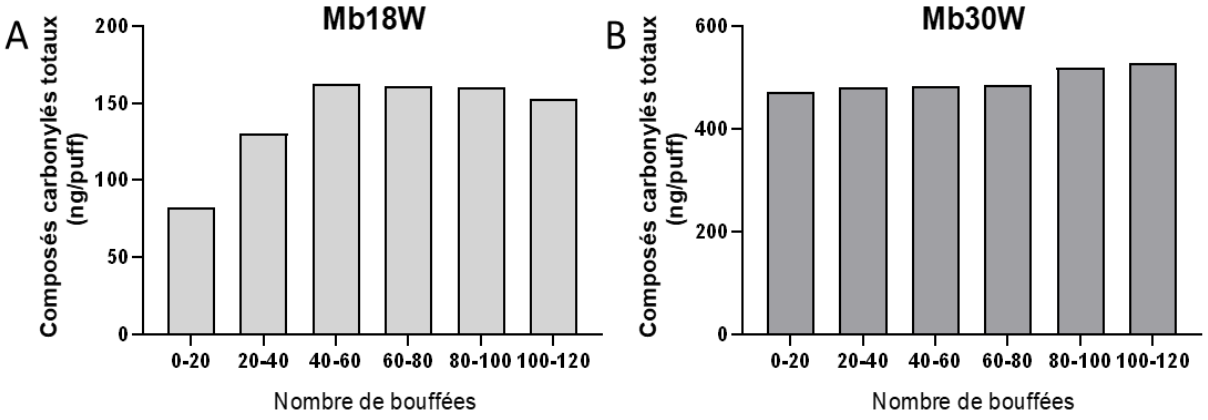


Figure 31. Quantité de composés carbonylés (en ng/bouffée) dans les émissions de Mb18W et Mb30W en fonction de la durée d'utilisation exprimée en bouffée.

Les tests réalisés révèlent qu'il y a une tendance à l'augmentation de la génération de composés carbonylés au cours du temps. Au vu de ces résultats, les prélèvements suivants ont été récolté durant les 10 dernières minutes d'une e-cig fonctionnant pendant 60 minutes pour ne pas sous-estimer la génération de composés carbonylés. Concernant le tabac chauffé, des tests d'optimisation du protocole ont été réalisés et ont permis de montrer que les cartouches pouvaient contenir jusqu'4 bouffées avant d'être saturées. Enfin, en se basant sur les données disponibles dans la littérature (Eldridge *et al.*, 2015), une seule bouffée de cigarette 3R4F a été prélevée par cartouche de DNPH pour les analyses finales.

Les dosages finaux des composés carbonylés ont ainsi été réalisés 4 fois indépendamment et les résultats sont présentés en ng/bouffée dans le Tableau 11. Au total, 15 composés carbonylés ont été mesurés à des quantités de 2 à 15 fois supérieures dans la fumée de cigarette que dans les aérosols de HTP. Deux composés sont notables

dans les aérosols de HTP. L'hexanal, qui est plus concentré dans les aérosols de HTP que dans ceux de 3R4F (22,1 contre 10,4 ng/bouffée) et le benzaldéhyde, qui a été retrouvé à des quantités similaires entre les deux dispositifs (58,9 ng/bouffée pour le HTP et 63,6 ng/bouffée pour la 3R4F). En revanche, tous les composés ont été mesurés à des quantités très inférieures dans les aérosols d'e-cig par rapport à celles des produits du tabac (HTP et 3R4F), sauf deux, le m-tolualdéhyde et le 2,5-diméthylbenzaldéhyde qui ont été détectés à de faibles quantités uniquement dans les émissions des 3 modèles d'e-cig (≈ 1 ng/bouffée).

Tableau 11. Concentrations en 19 composés carbonylés (en ng/bouffée) dans les émissions d'e-cig (Lounge, Mb18W et Mb30W), de tabac chauffé (HTP) et de cigarette (3R4F). Les données sont représentées en moyenne ± écart-type de 4 mesures indépendantes. « ~ » correspond aux valeurs sous la limite de détection (LOD).

Composés carbonylés	Lounge	Mb18W	Mb30W	HTP	3R4F
Formaldéhyde	6 ± 0,7	25,8 ± 2,9	64,5 ± 23,7	156,9 ± 9,5	255,5 ± 60,8
Acétaldéhyde	32,9 ± 5,4	63 ± 10,4	161 ± 46,4	26687,7 ± 657,9	166345,0 ± 59540,1
Propanone	3,9 ± 2,7	13,8 ± 3	28,5 ± 8,2	3132,3 ± 149,2	36075,8 ± 7896,6
Propanal	2,2 ± 0,8	8,4 ± 2,4	23,2 ± 5,6	1400,1 ± 205,8	6924,8 ± 1688,2
Méthyl vinyl kétone	0,2 ± 0,1	6,4 ± 4,2	6,4 ± 2,1	443,2 ± 42,2	1341,2 ± 219,3
Crotonaldéhyde	2,4 ± 0,2	16,1 ± 3,3	38,8 ± 8,2	140 ± 10,3	1697,4 ± 794,5
Méthyl éthyl kétone	0,8 ± 1,7	34,7 ± 23,6	23,5 ± 9,6	625,6 ± 27	9005,2 ± 1097,8
Méthylpropénal	~ ± ~	~ ± ~	~ ± ~	334,8 ± 20,6	842,4 ± 350,7
Butanal	0,1 ± 0,1	2 ± 0,1	2,4 ± 0,1	985,9 ± 94,8	3654 ± 1055,1
Benzaldéhyde	0,5 ± 0,1	2,5 ± 0,4	3,2 ± 0,2	58,9 ± 2,9	63,6 ± 59,3
Isopentanal	0,7 ± 0,1	8 ± 1,1	11,5 ± 0,7	391,3 ± 37,7	2084,9 ± 599
Pentanal	0,5 ± 1,1	1 ± 0,2	0,4 ± 0,1	25,2 ± 1,4	172,1 ± 50,5
Glyoxal	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0	0,7 ± 0	40,7 ± 9,3	308,2 ± 92
o-tolualdéhyde	0,7 ± 0,2	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,6	6,3 ± 0,4	29 ± 2,8
m-tolualdéhyde	~ ± ~	1 ± 0,7	1,1 ± 0,8	~ ± ~	~ ± ~
p-tolualdéhyde	1,7 ± 0,4	0,9 ± 0,7	0,6 ± 0,7	115 ± 26,4	291,8 ± 195,9
Méthylglyoxal	25,2 ± 3,1	12,2 ± 1,1	44,1 ± 10,9	490,1 ± 69,8	982 ± 249
Hexanal	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	22,2 ± 11,9	10,5 ± 12,1
2,5 diMlbenzaldéhyde	~ ± ~	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	~ ± ~	~ ± ~
Total	**79 ± 10,7**	**201,5 ± 48,5**	**415,2 ± 63,6**	**35056,1 ± 824,9**	**230083,5 ± 70153,5**

La Figure 32 représente la somme des 19 composés carbonylés retrouvés dans les émissions d'e-cig (Lounge, Mb18W et Mb30W), de HTP et de 3R4F et les pourcentages de réduction comparés à la 3R4F, le HTP et la Mb30W. Les données montrent qu'il y a considérablement moins de composés carbonylés dans les émissions de HTP (35 µg/bouffée) que dans les fumées de 3R4F (230 µg/bouffée). En effet, le tabac chauffé émet 84,7 % de composés carbonylés en moins que la cigarette 3R4F. Par ailleurs, les quantités de composés carbonylés retrouvées dans les aérosols d'e-cig sont très inférieures à celles mesurées dans les émissions de HTP, quel que soit le modèle, avec une réduction d'au moins 98,5 %. Par rapport à la 3R4F, le taux de réduction est d'au moins 99,5 % pour l'e-

cig. Au sein des modèles d'e-cig, c'est la Lounge qui génère le moins de composés carbonylés (0,079 µg/bouffée), puis la Mb18W (0,201 µg/bouffée) et enfin la Mb30W (0,415 µg/bouffée). Par rapport à la Mb30W, le pourcentage de réduction correspond à 51,4 % pour les aérosols de Mb18W et à 82,3 % pour celles de la Lounge.

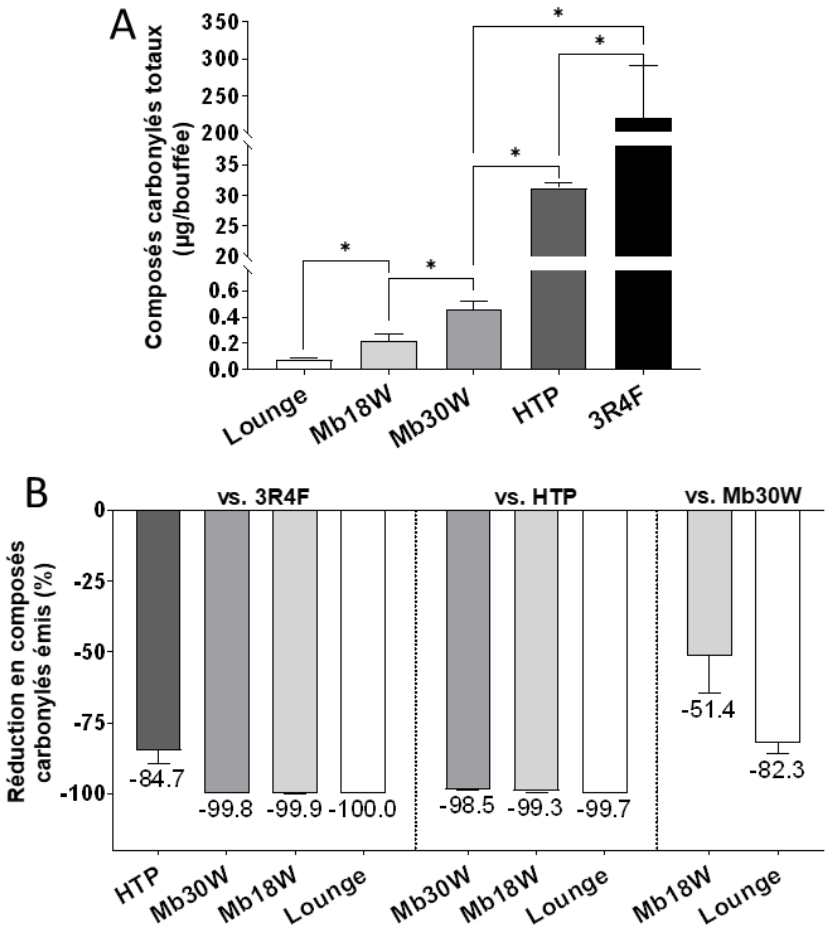


*Figure 32. (A) Quantité totale de composés carbonylés (en µg/bouffée) dans les émissions d'e-cig (Lounge, Mb18W ou Mb30W), de HTP ou de 3R4F. Les données représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes. * p < 0,05. (B) Réductions (en %) en émission de composés carbonylés en comparaison à celles de 3R4F, de HTP ou de Mb30W.*

1.4. Analyse des HAP

La présence de 23 HAP a été analysées dans les aérosols des 3 modèles d'e-cig (Lounge, Mb18W ou Mb30W), de HTP et de cigarette 3R4F et les résultats sont rapportés en pg/bouffée dans le Tableau 12. Sur ces 23 HAP analysés, 21 ont été retrouvés dans des quantités de 2 à 676 fois inférieures dans les aérosols du tabac chauffé que dans ceux de la cigarette. Seul le benzo(c)phénanthrène est plus concentré dans les aérosols de HTP (10,2 pg/bouffée) par rapport aux autres dispositifs. Le cyclopenta(c,d)pyrène n'a quant à lui été retrouvé dans aucun aérosol. Les aérosols d'e-cig contiennent pour la majorité

des HAP moins concentrés que les aérosols de HTP. Il n'y a que le naphtalène qui est retrouvé à des quantités similaires entre les deux dispositifs.

Tableau 12. Concentrations en HAP (en pg/bouffée) dans les émissions d'e-cig (Lounge, Mb18W et Mb30W), de tabac chauffé (HTP) et de cigarette (3R4F). Les données sont représentées en moyenne ± écart-type de 4 mesures indépendantes. « ~ » correspond aux valeurs sous la limite de détection (LOD)

HAP	Lounge	Mb18W	Mb30W	HTP	3R4F
Naphtalène	61,5 ± 9,5	75,9 ± 5,6	92,2 ± 6,2	71,2 ± 38,9	3598,6 ± 735,4
Acénapthène	0,2 ± 0,1	2,6 ± 1,1	5 ± 1,4	12,5 ± 13,7	1318,2 ± 397,5
Fluorène	6,7 ± 3,3	6,8 ± 1,6	5 ± 1,4	26 ± 22,5	1976,7 ± 387,7
Phénanthrène	7,2 ± 0,7	25,2 ± 8,2	22,8 ± 3,5	55,9 ± 34,7	2829,4 ± 533,3
Anthracène	0,6 ± 0,1	1,7 ± 0,5	2,9 ± 3,8	4,7 ± 2,3	1356,2 ± 266,8
Fluoranthène	9,2 ± 1,4	20,1 ± 11,8	11,5 ± 11,9	130,9 ± 79	1463,5 ± 288,8
Pyrène	17,9 ± 4,3	30,9 ± 9,2	30,9 ± 10,9	153 ± 98,6	1752,4 ± 304,5
Benzo(c)phenanthrène	1,9 ± 0,7	4,6 ± 2,2	3,2 ± 4,4	10,3 ± 6,9	1,5 ± 0,6
Cyclopenta(c,d)pyrène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Benzo(a)anthracène	0,2 ± 0	2,6 ± 0,9	3,2 ± 4	43,8 ± 23,4	542,5 ± 150,1
Chrysène	0,4 ± 0,3	1,6 ± 0,3	2,5 ± 4,1	26,4 ± 13,9	471,7 ± 72,5
5-méthylchrysène	1,5 ± 0,4	1 ± 0,7	0,6 ± 0,4	1,7 ± 1	1130,6 ± 294
Benzo(e)pyrène	2 ± 0,3	6,1 ± 2,5	5,4 ± 3,6	22,9 ± 17,1	1343,9 ± 303,1
Benzo(b)fluoranthène	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,3	4,2 ± 7,1	18,9 ± 8,9	359 ± 125,6
Benzo(k)fluoranthène	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,4 ± 2,2	18,4 ± 11,1	99,6 ± 28,1
Benzo(a)pyrène	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,3	25,6 ± 13,9	457,6 ± 114,5
Dibenzo(a,l)pyrène	0,1 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0	0,3 ± 0,2	0,6 ± 0,2
Dibenzo(a,h)anthracène	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,3	0,8 ± 0,5	38,4 ± 11,9
Benzo(g,h,i)pérylène	1,5 ± 0,7	0,9 ± 0,3	4,8 ± 3,2	16,6 ± 8,9	276,2 ± 56
Indeno(1,2,3-c,d)pyrène	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0	1,5 ± 2	6,6 ± 5,6	214 ± 81,5
Dibenzo(a,e)pyrène	0,1 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,4	0,5 ± 0,3	92,4 ± 43,5
Anthanthrène	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	11,7 ± 6,7	233,9 ± 52,6
Coronène	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2	2,8 ± 1	5,5 ± 1,9	25,6 ± 5,4
Total	**112,7 ± 16,1**	**183,2 ± 29,7**	**201,7 ± 57,9**	**664,4 ± 389,8**	**19582,3 ± 400,1**

La Figure 33 représente la somme de tous les HAP retrouvés dans les émissions d'e-cig (Lounge, Mb18W ou Mb30W), de HTP et de 3R4F, et les pourcentages de réduction de concentration par rapport à la 3R4F, au HTP et à la Mb30W. De manière similaire à ce qui a été observé pour les composés carbonylés, les données montrent que le HTP émet 96,2 % de HAP en moins que la cigarette 3R4F (0,7 ng/bouffée contre 19,6 ng/puff) et que l'e-cig émet entre 64,9 et 78,2 % de HAP en moins que le HTP (entre 0,1 et 0,2 ng/bouffée). Contrairement à ce qui a été observé pour les composés carbonylés, la différence observée entre les deux modèles de troisième génération réglés à une puissance différente n'est plus significative. Cependant le modèle Lounge, de deuxième génération, émet tout de même ≈ 40 % de HAP en moins que la Mb18W ou la Mb30W.

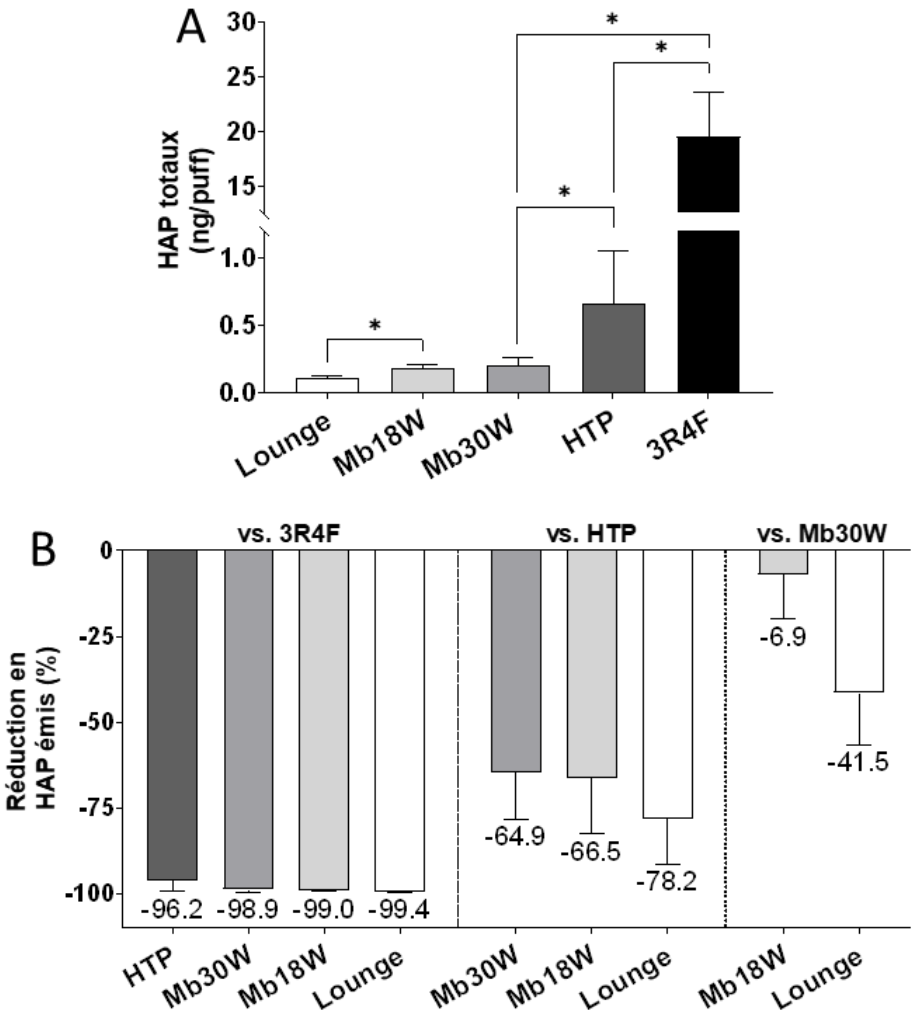


*Figure 33. (A) Quantité totale de composés carbonylés (en ng/bouffée) dans les émissions d'e-cig (Lounge, Mb18W ou Mb30W), de HTP ou de 3R4F. Les données représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes. * p < 0,05. (B) Réductions (en %) en émission de HAP en comparaison à celles de 3R4F, de HTP ou de Mb30W.*

1.5. Normalisation par la quantité de nicotine

Les quantités de composés carbonylés et de HAP ont d'abord été présentées en masse par bouffée, ce qui a permis de comparer les dispositifs entre eux. Cependant, les utilisateurs ne consomment pas forcément une cigarette, le tabac chauffé ou l'e-cig de la même manière. En effet, ils vont ajuster le nombre, le volume et la fréquence des bouffées en fonction de leur besoin en nicotine. Pour tenter de prendre ce paramètre en considération, les quantités des différents composés toxiques mesurés ont été rapportées à la quantité de nicotine retrouvée dans les aérosols correspondants. Les résultats détaillés de cette normalisation sont rapportés en annexe dans le Tableau S 1 pour les composés carbonylés et Tableau S 2 pour les HAP.

Ces données sont résumées dans la Figure 34 rapportant la quantité totale de composés carbonylés ou de HAP normalisés avec la quantité de nicotine (A et B) et les pourcentages de réduction associées (C et D). La comparaison de ces résultats montre que le classement des dispositifs en fonction de la quantité de composés carbonylés émis ne change pas. En effet, le HTP émet 76,9 % de composés carbonylés en moins (497 ng/µg de nicotine) que la cigarette 3R4F (2308 ng/µg de nicotine). Les 3 modèles d'e-cig émettent au moins 97,9 % de composés carbonylés en moins (<10 ng/µg de nicotine) que le HTP. Cependant, au sein des modèles d'e-cig, c'est la Lounge qui émet le plus de composés (10,5 ng/µg de nicotine) par rapport au modèle de troisième génération. De plus, la différence entre la Mb18W et la Mb30W n'apparaît plus après normalisation avec la nicotine (3,6 et 3,4 ng/µg de nicotine, respectivement). De la même façon, après normalisation avec la nicotine, la quantification des HAP révèle que la Lounge émet plus de composés par µg de nicotine que les e-cig Mb18W et Mb30W (15 contre 3 et 1,5 pg/µg de nicotine, respectivement) et même plus que le HTP (10,6 pg/µg de nicotine). C'est en revanche toujours la cigarette 3R4F qui génère le plus de HAP par µg de nicotine (207 pg/µg de nicotine). Le HTP montre tout de même une réduction des émissions en HAP de 94,3 % par rapport à la cigarette, la lounge de 92,5 % et les modèles Modbox d'au moins 98,5 %.

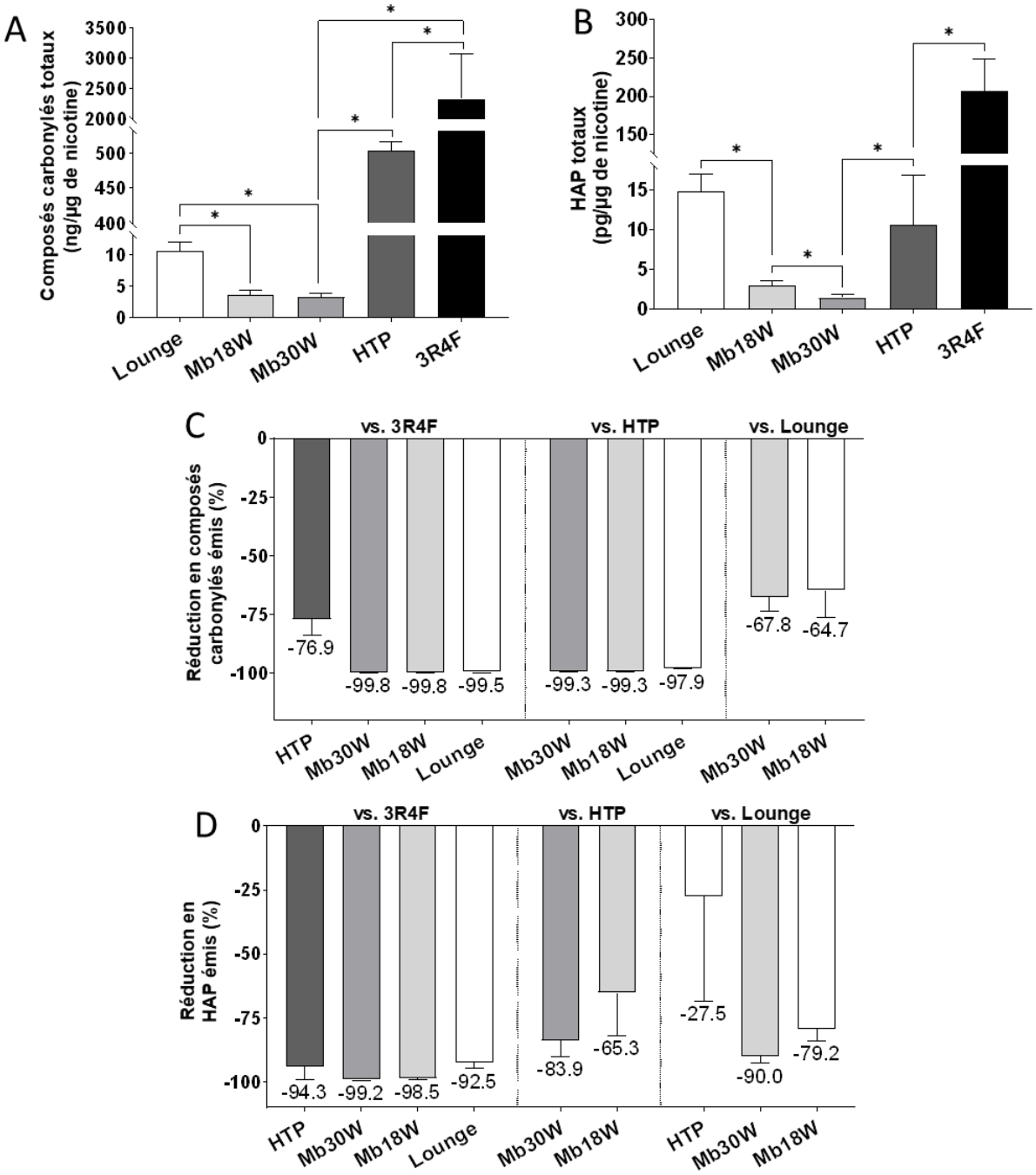


*Figure 34. Quantités totales de composés carbonylés (A) ou de HAP (B) rapportées à la quantité de nicotine (en masse/µg de nicotine) dans les émissions d'e-cig (Lounge, Mb18W ou Mb30W), de HTP ou de 3R4F et réductions (en %) en émission de composés carbonylés (C) ou de HAP (D) en comparaison à celles de 3R4F, de HTP ou de Lounge. * p < 0,05.*

1.6. Discussion

Dans un premier temps, il était nécessaire de vérifier que nos conditions expérimentales d'utilisation des e-cig étaient représentatives d'une utilisation normale. En effet, en fonction du profil de bouffée et des réglages de l'e-cig, il est possible de générer

des « dry puffs ». Dans ce cas, la mèche de coton brûle, ce qui provoque une sensation très aversive pour l'utilisateur. Nous avons fait essayer nos conditions d'expérimentation à des vapoteurs réguliers pour confirmer l'absence de « dry puffs ». De plus, la température des aérosols en sortie d'e-cig a été mesurée pour l'ensemble des dispositifs utilisés. Les filtres du stick de tabac chauffé et de la cigarette permettent de redescendre la température des émissions au niveau de la température ambiante. Pour l'e-cig, les modèles Lounge et Modbox réglés à 18 W n'augmentent que très légèrement la température des aérosols à la sortie des dispositifs. Cependant, le modèle Modbox réglé à 30 W délivre un aérosol pouvant atteindre 50°C. Les recommandations de l'AFNOR suggèrent que les émissions sont aversives pour l'utilisateur à partir de 60°C (Association française de normalisation, 2016). Ces données justifient alors nos conditions d'expérimentations.

Les composés carbonylés sont principalement générés suite à la pyrolyse à haute température des hydrates de carbone présents dans le tabac (jusqu'à 900°C) (Seeman *et al.*, 2002). C'est dans la fumée de cigarette 3R4F qu'a été mesurée la plus grande quantité de composés carbonylés. L'acétaldéhyde et l'acétone sont les deux composés majoritaires dans la fumée de cigarette, comme rapporté dans la littérature (Eldridge *et al.*, 2015). L'acroléine est un composé fréquemment retrouvé dans la fumée de cigarette. Cependant, elle n'a pas pu être quantifiée dans notre étude. En effet, bien que les recommandations de l'ANSES conseillent l'utilisation de cartouches imprégnées de DNPH pour la doser, comme celles que nous avons utilisées, deux études suggèrent que si le temps entre le prélèvement et la désorption des composés est trop long (plus de 6h), l'acroléine peut se di- et trimériser (Herrington and Hays, 2012; Ho, 2011). Dans notre cas, la désorption des cartouches étant réalisée sur un site très éloigné de celui où les prélèvements sont réalisés, nous n'avons pu réaliser ces deux étapes sur la même journée et avons choisi de ne pas prendre en compte les résultats obtenus pour ce composé. Pour le dispositif de tabac chauffé utilisé dans notre étude, l'iQOS, la génération des aérosols s'effectue à une température maximale de 350°C grâce aux sticks de tabac imprégné de propylène glycol. Le marketing relatif à ces dispositifs met en avant l'absence de combustion qui permettrait de réduire l'exposition des utilisateurs aux substances cancérogènes produites par celle-ci (Schaller *et al.*, 2016a). Les quantités de composés carbonylés mesurées confirment cette hypothèse et montrent une diminution de 90 % par rapport à celles retrouvées dans la fumée de cigarette. Ces données sont en accord avec les études

menées par PMI (Schaller *et al.*, 2016a, 2016b) et deux études indépendantes (Farsalinos *et al.*, 2018b; Li *et al.*, 2019b). Cependant, la présence de certains composés carbonylés cancérogènes tels que l'acétaldéhyde et le formaldéhyde a pu être mise en évidence. La présence d'acétaldéhyde témoigne d'une potentielle pyrolyse ou d'une dégradation thermique des constituants des feuilles de tabac présentes dans les sticks (Auer *et al.*, 2017). Les quantités de formaldéhyde retrouvées étaient légèrement inférieures à celles retrouvées dans la littérature. Les analyses chromatographiques effectuées montraient un deuxième composé très proche du formaldéhyde, qui a pu gêner l'interprétation et mener à une mauvaise estimation de sa quantité. Cet artefact pourrait être dû à la présence de formaldéhyde cyanhydrine provenant de la pyrolyse du filtre en acide polylactique présent dans le stick de tabac, comme cela a été mis en évidence dans une autre étude (Davis *et al.*, 2019). Concernant les modèles d'e-cig, une faible quantité de composés carbonylés a été retrouvée dans les émissions. Ces quantités étaient très inférieures à celles retrouvées dans les émissions de tabac chauffé (84,7 % de réduction) et, de ce fait, encore plus inférieures à celles de la fumée de cigarette (plus de 99 % de réduction). Pour ces dispositifs, la majeure partie des composés carbonylés provient de la dégradation thermique du glycérol et du propylène glycol retrouvés dans les e-liquides (Uchiyama *et al.*, 2020). Notre étude a pu mettre en évidence un lien entre la puissance délivrée par l'e-cig et la quantité de composés carbonylés générés. En effet, le modèle Modbox réglé à 30 W génère plus de composés que celui réglé à 18 W qui, lui-même, génère plus de composés carbonylés que le modèle Lounge d'une puissance de 4,6 W. Une puissance délivrée plus importante, pour une même résistance, augmente la température de chauffe ainsi que le volume consommé de e-liquide, et impacte la quantité de composés carbonylés retrouvés dans les émissions d'e-cig. Le lien entre ces différents paramètres a déjà été rapporté dans plusieurs publications qui relèvent, par ailleurs, des quantités de formaldéhyde supérieures à celles observées dans notre étude (Goniewicz *et al.*, 2014; Hutzler *et al.*, 2014; Sleiman *et al.*, 2016; Talih *et al.*, 2016). Cependant, ces études ont été remises en question à cause de leur méthodologie. En effet, la génération des émissions a été réalisée dans des conditions extrêmes et non représentatives de l'utilisation normale d'une e-cig (Farsalinos, 2017; Farsalinos *et al.*, 2015). Les mesures de température réalisées dans notre étude nous permettent d'affirmer que les réglages des e-cig et du profil de bouffée restaient réalistes et permettaient d'éviter le phénomène de « dry puffs » décrit précédemment.

L'analyse des HAP des émissions des différents dispositifs a montré que l'e-cig générait moins de composés que la cigarette (plus de 99 % en moins). Les HAP de la fumée de cigarette sont des composés issus de processus de combustion incomplète du tabac à des températures supérieures à 500°C (Evans *et al.*, 1993). Mais des études plus récentes ont montré que la formation de HAP à partir de tabac pouvait avoir lieu à des températures inférieures, à partir de 350°C (McGrath *et al.*, 2007) . Les quantités retrouvées dans les émissions d'e-cig, de l'ordre du dixième de ng/bouffée confirment l'absence de ce processus de combustion. Bien que la nicotine dans certains e-liquides soit parfois extraite à partir de feuilles de tabac, les e-liquides ne contiennent généralement pas les éléments du tabac pouvant être précurseurs de HAP. Cependant, les HAP retrouvés dans les émissions pourraient provenir du e-liquide directement dans lequel nous avons déjà mesuré des traces de HAP (Beauval *et al.*, 2017). De plus, le point d'ébullition du e-liquide, qui est la température nécessaire à atteindre pour générer un aérosol, se situe entre 188,6 °C et 292 °C. Ce point d'ébullition varie selon la proportion de propylène glycol et de glycérol, et peut encore diminuer avec l'ajout d'additif comme de l'eau ou de l'éthanol (Duell *et al.*, 2018). Par comparaison, la température de combustion d'une cigarette peut atteindre jusqu'à 900 °C au niveau du foyer (Baker, 1974). De plus, à la différence de ce qui a été observé pour les composés carbonylés, la quantité de HAP générée par les différents modèles d'e-cig n'a pas été liée à la puissance délivrée par celle-ci. Ces résultats indiquent que même à forte puissance, la température de chauffe du e-liquide n'est pas suffisante pour générer des HAP en quantité importante. Le dispositif de tabac chauffé, quant à lui, chauffe à une température de 350°C (Auer *et al.*, 2017). Les quantités de HAP que nous avons mesurées dans les émissions de tabac chauffé étaient bien inférieures à celles retrouvées dans la fumée de cigarette (96 % en moins) et en accord avec les données avancées par PMI et une étude indépendante (Li *et al.*, 2019b). Les sticks du dispositifs iQOS contiennent des produits dérivés du tabac et renferment donc les précurseurs nécessaires pour générer des HAP. De plus, une équipe a montré qu'un processus de pyrolyse pouvait avoir lieu dans le stick de tabac et pourrait augmenter la quantité de composés toxiques dans les émissions (Davis *et al.*, 2019). Le benzo[a]pyrène, cancérogène avéré pour l'Homme, est un bon indicateur de la potentielle toxicité des émissions (Vu *et al.*, 2015). Ce composé a été retrouvé en plus faible quantité dans les émissions de tabac chauffé par rapport à la fumée de cigarette (25,6 pg contre 457,6

pg/bouffée, respectivement), mais en plus grande quantité par rapport aux émissions d'e-cig (entre 0,6 et 1,1 pg/bouffée).

Pour que le tabac chauffé et l'e-cig puissent être une alternative à la cigarette, il faut qu'ils délivrent à minima une quantité de nicotine suffisante pour que l'utilisateur puisse l'inhaler et s'en satisfaire (Farsalinos *et al.*, 2018a). C'est pourquoi la quantité de nicotine a été mesurée dans les émissions de chaque dispositif avec un même profil de bouffée. C'est pour le modèle d'e-cig Lounge, de deuxième génération, que le taux de nicotine mesuré était le plus faible, alors que pour le modèle Modbox, de troisième génération, la quantité délivrée était bien plus importante. Ces résultats confirment qu'en augmentant le réglage de la puissance, le volume de e-liquide consommé et par conséquent le taux de nicotine dans les aérosols sont augmentés (Talih *et al.*, 2016). Concernant les émissions de tabac chauffé, les taux de nicotine mesurés étaient environ 30 % inférieurs à ceux observés dans la fumée de cigarette, comme décrit dans la littérature (Belushkin *et al.*, 2020; Farsalinos *et al.*, 2018a; Li *et al.*, 2019b; Schaller *et al.*, 2016a). Ce paramètre est important à prendre en compte puisqu'il est admis que les fumeurs s'auto-régulent en fonction de la quantité de nicotine inhalée. C'est-à-dire qu'avec une cigarette qui délivre moins de nicotine, un fumeur aura tendance à fumer plus agressivement (Woodward and Tunstall-Pedoe, 1993). Ainsi, une quantité plus faible de nicotine dans les émissions d'e-cig ou de tabac chauffé pourrait induire une compensation et une augmentation du nombre de bouffée et/ou de leur fréquence.

Pour essayer de prendre en compte ces différents profils de consommation, les quantités en composés carbonylés et HAP, initialement présentées en masse par bouffée, ont été normalisées par rapport à la quantité de nicotine respective de chaque émission. Les résultats ainsi normalisés ne changent pas le classement entre les dispositifs : l'e-cig émet moins de composés toxiques que le tabac chauffé qui, lui-même, en émet moins que la cigarette. Cependant, la normalisation des quantités par la nicotine change le classement entre les modèles d'e-cig puisque, avec ce mode de calcul, c'est le modèle Lounge qui émet le plus de composés potentiellement toxiques. Cela s'explique par le fait que ce modèle génère très peu de nicotine par rapport à celui de troisième génération. Ces données soulignent qu'en fonction de la façon d'exprimer les résultats, leur interprétation peut être différente. A ce jour, il n'existe pas de façon universelle d'exprimer des résultats de composés émis dans les aérosols. En effet, dans la littérature,

ce type de données est exprimé en quantité par bouffée (Beauval *et al.*, 2019), en quantité par millilitres de bouffée (Beauval *et al.*, 2017), par cigarette ou par stick de tabac chauffé (Li *et al.*, 2019b), par quantité de nicotine (Farsalinos *et al.*, 2018a) ou par volume d'e-liquide consommé (Beauval *et al.*, 2016). Cette multitude d'unités rend plus difficile la comparaison entre les données de la littérature. De plus, il existe également plusieurs méthodes de génération et de collection des émissions qui pourraient également influer sur la façon dont les composés sont capturés et quantifiés (Farsalinos and Gillman, 2018). A cela s'ajoute la diversité des e-liquides et des dispositifs, qui amplifie la variabilité des résultats retrouvés dans la littérature. Il semble ainsi nécessaire d'harmoniser les protocoles, que ce soit en termes de méthodologie, d'analyse ou encore d'interprétation des résultats. Notre étude offre l'opportunité de caractériser la composition des émissions d'e-cig et du tabac chauffé recueillies et analyser avec un protocole commun. Nos données permettent alors de générer des résultats plus aisément comparables entre les dispositifs.

Globalement, les données obtenues montrent que les émissions de tabac chauffé contiennent moins de composés toxiques que celles de la cigarette classique, mais plus que celles de l'e-cig. Cependant, la présence, même en bien plus faible quantité, de HAP et de composés carbonylés, n'exclut pas une absence de toxicité car il n'existe pas de seuil pour lesquels ces composés seraient sans danger. Il est alors nécessaire de mener des études toxicologiques afin d'évaluer l'impact réel de ces émissions.

Comparaison de la toxicité *in vitro* des émissions d'e-cig, de tabac chauffé et de cigarette

2. Comparaison de la toxicité *in vitro* des émissions d'e-cig, de tabac chauffé et de cigarette

Les réductions observées en termes de composés toxiques testés dans les émissions de tabac chauffé et d'e-cig ne peuvent évidemment pas être interprétées comme une réduction proportionnelle des risques pour les fumeurs souhaitant arrêter la cigarette en utilisant ces nouveaux dispositifs de délivrance de nicotine. Peu d'études disponibles à ce jour se proposent d'étudier et de comparer la cytotoxicité à la fois de l'e-cig, du tabac chauffé et de la cigarette. Or, le tabac chauffé et l'e-cig sont tous les deux des dispositifs alternatifs à la cigarette dont la toxicité est encore à étudier. Les protocoles d'exposition retrouvés dans la littérature sont divers : utilisation de cultures immergées ou de cultures en interface air-liquide, exposition aux e-liquides, aux aérosols solubilisés, ou directement aux aérosols (Tableau 4, Tableau 5, Tableau 6, Tableau 9). C'est pourquoi mon travail de thèse propose d'étudier la toxicité des émissions d'e-cig et du tabac chauffé et de la comparer à celle de la cigarette en utilisant des conditions d'exposition identiques. De plus, les aérosols ont été générés en utilisant le même profil de bouffée que lors des prélèvements réalisés pour la caractérisation chimique des aérosols. Des cellules immortalisées de l'épithélium bronchique humain (BEAS-2B) cultivées à l'interface air-liquide ont été exposées aux émissions non diluées de 3 modèles d'e-cig (Lounge, Mb18W, Mb30W), de HTP et de cigarette 3R4F. Les effets de ces émissions ont été évalués en termes de cytotoxicité et de réponses au stress oxydatif et à l'inflammation, qui sont des mécanismes clés dans le développement de maladies respiratoires chroniques.

2.1. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été analysée 24h après les différentes expositions en mesurant la quantité d'ATP intracellulaire. Les données sont présentées dans la Figure 35. Les résultats montrent que les aérosols d'e-cig n'induisent pas ou peu de baisse de viabilité cellulaire même après 120 bouffées. En effet, la viabilité des cellules exposées aux émissions de Modbox reste supérieure à 92 %, et à 75 % pour celles exposées aux émissions du modèle Lounge. En revanche, une exposition aux aérosols de HTP induit une baisse du contenu en ATP intracellulaire dès 12 bouffées (89 % de viabilité), et une diminution de viabilité jusqu'à 98 % après 120 bouffées. Une exposition aux fumées de cigarette induit encore plus rapidement une forte diminution de la viabilité ; elle a atteint 0 % après 10 bouffées seulement. Pour comparer les dispositifs, la dose efficace de chaque

aérosol, exprimée en bouffée, pour laquelle la viabilité cellulaire atteint 50 % a été calculée (ED50). Alors qu'aucune ED50 n'a pu être calculée, pour les 3 modèles d'e-cig, celle du HTP est égale à 45 bouffées (soit 22,5 minutes d'exposition) et celle de la 3R4F est égale à 2 bouffées (soit 1 minute d'exposition). Toujours dans le but de comparer l'ensemble des dispositifs, la viabilité cellulaire a été exprimée en fonction de la quantité en nicotine et les résultats sont rapportés dans la Figure 35F. Comme pour les résultats de viabilité exprimés par bouffée, ceux exprimés par mg de nicotine montrent une

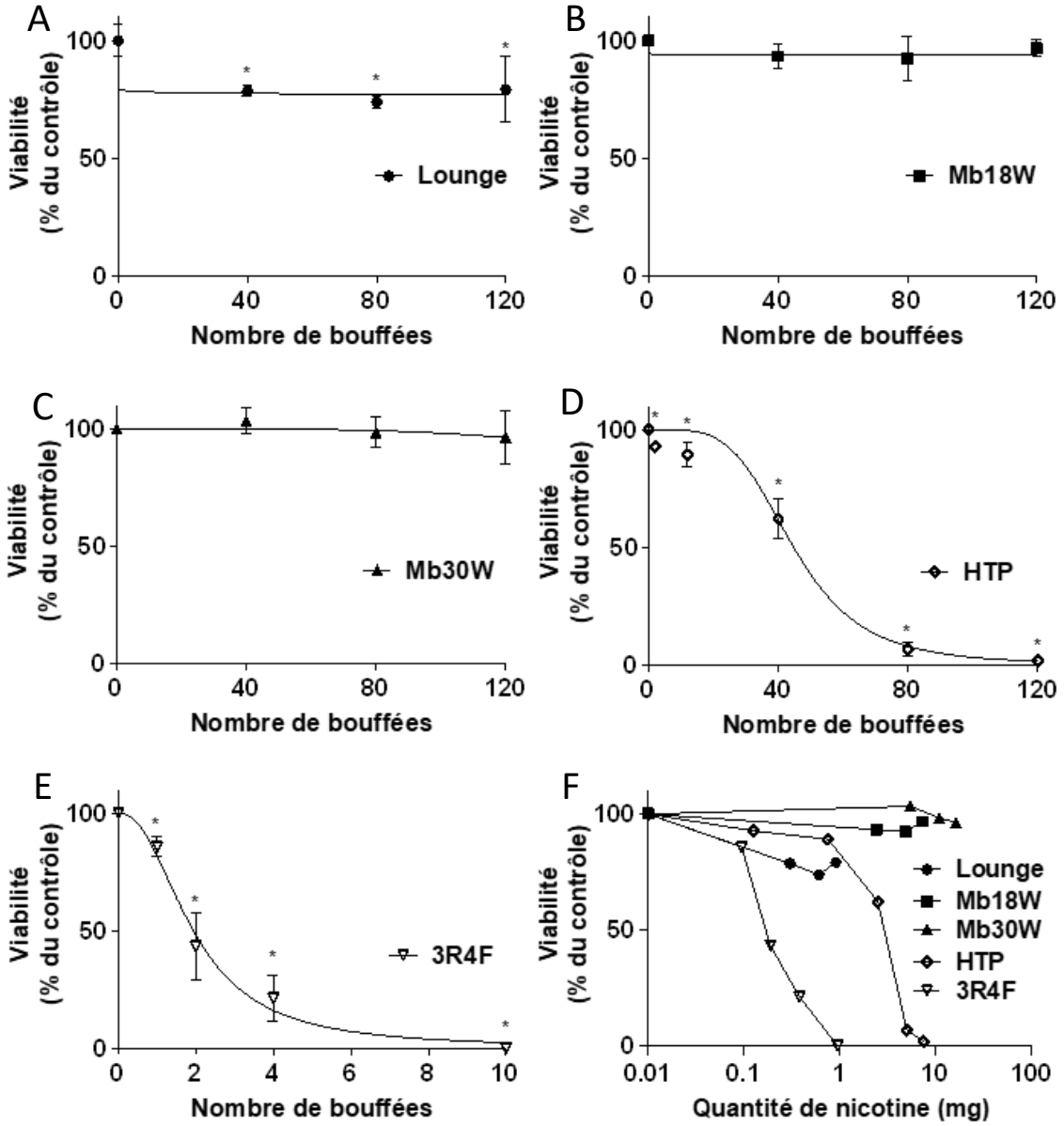


*Figure 35. Viabilité cellulaire mesurée après 24h d'exposition des cellules BEAS-2B à des aérosols non dilués d'e-cig : Lounge (A), Mb18W (B) et Mb30W(C), de HTP (D) et de cigarette 3R4F (E) en fonction du nombre de bouffées. Les résultats sont exprimés en pourcentage comparé aux contrôles arbitrairement fixés à 100 %. Les résultats représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes. (F) Viabilité cellulaire exprimée en fonction de la quantité en nicotine (en mg) des émissions de chaque dispositif. * p < 0,05.*

cytotoxicité plus élevée pour la 3R4F (ED50 de 0,2 mg de nicotine), que pour le HTP (ED50 de 2,8 mg de nicotine) et une très faible cytotoxicité de l'e-cig.

En se basant sur les données de viabilité cellulaire présentées ci-dessus, des doses sub-toxiques (> 75 % de viabilité) ou toxiques ont été sélectionnées pour mesurer les paramètres du stress oxydant et de l'inflammation : 40 et 120 bouffées pour les e-cig ; 2, 12 et 40 bouffées pour le HTP ; 1 et 2 bouffée(s) pour la cigarette 3R4F.

2.2. Analyse du stress oxydant

La génération du stress oxydant a d'abord été analysée en mesurant le contenu des cellules exposées en glutathion réduit (GSH) et glutathion oxydé (GSSG). Le GSH est considéré comme l'un des antioxydants les plus importants, qui permet de réduire les espèces réactives de l'oxygène. Le déséquilibre du rapport GSSG/GSH peut être utilisé comme un marqueur de stress oxydant. La prise en charge du stress oxydant dans la cellule peut être un phénomène très rapide. Une étude menée précédemment au laboratoire a d'ailleurs montré que le rapport GSSG/GSH était rapidement modulé juste après les expositions, puis était revenu à la normale 3 heures après. (Anthérieu *et al.*, 2017). C'est pourquoi, le contenu en glutathion a été mesuré dès la fin des expositions aux différent dispositifs (0h). Les résultats sont rapportés dans la Figure 36. Concernant les expositions aux e-cig, aucun changement du contenu intracellulaire en glutathion n'a été observé après des expositions à la Lounge ou à la Mb18W. Seules les émissions de Mb30W ont induit une hausse significative du rapport GSSG/GSH (x 2,9), mais seulement après la plus longue exposition (120 bouffées). Les expositions aux émissions de HTP ont, quant à elles, induit une augmentation significative du rapport GSSG/GSH par rapport aux cellules contrôles dès 12 bouffées (x 2,7). Cette augmentation est confirmée et plus marquée après 40 bouffées (x 4,5). Enfin, les expositions à la cigarette 3R4F ont également induit une augmentation de la réponse antioxydante, mais plus rapidement. En effet, dès la première

bouffée le rapport GSSG/GSH augmente significativement (x 2,7) par rapport aux cellules non-exposées et croît encore après 2 bouffées (x 7,8).

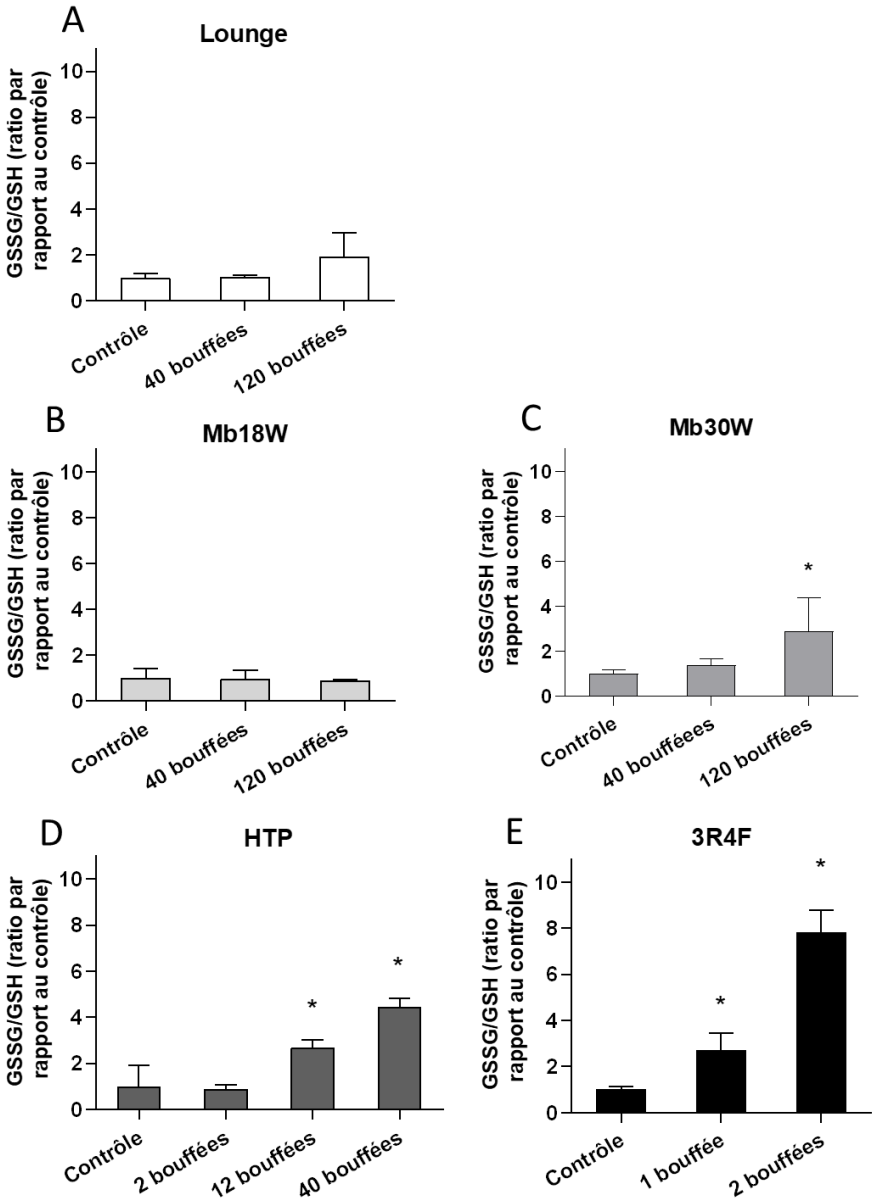


*Figure 36. Rapport de glutathion (GSSG/GSH) mesuré sur des cellules BEAS-2B immédiatement après une exposition aux aérosols d'e-cig : Lounge (A), Mb18W (B) et Mb30W (C), de HTP (D) et de 3R4F (E). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et sont exprimées en ratio par rapport aux cellules contrôles dont le ratio a été arbitrairement fixé à 1. * $p < 0,05$.*

2.3. Analyse de l'expression de gènes du métabolisme et du stress oxydant

Lorsque la cellule est exposée à des composés potentiellement toxiques, un des mécanismes de défense est constitué par l'action des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et notamment par celles de la superfamille des cytochromes P450 (CYP). Le CYP1A1 et le CYP1B1 sont particulièrement impliqués dans la métabolisation des HAP retrouvés dans la fumée de cigarette. Cependant, leur activité est aussi génératrice de radicaux libres et peut alors participer à l'induction d'un stress oxydant. C'est pourquoi l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (*CYP1A1* et *CYP1B1*) et dans la réponse antioxydante induite par Nrf2 (*HMOX1* et *NQO1*) a été

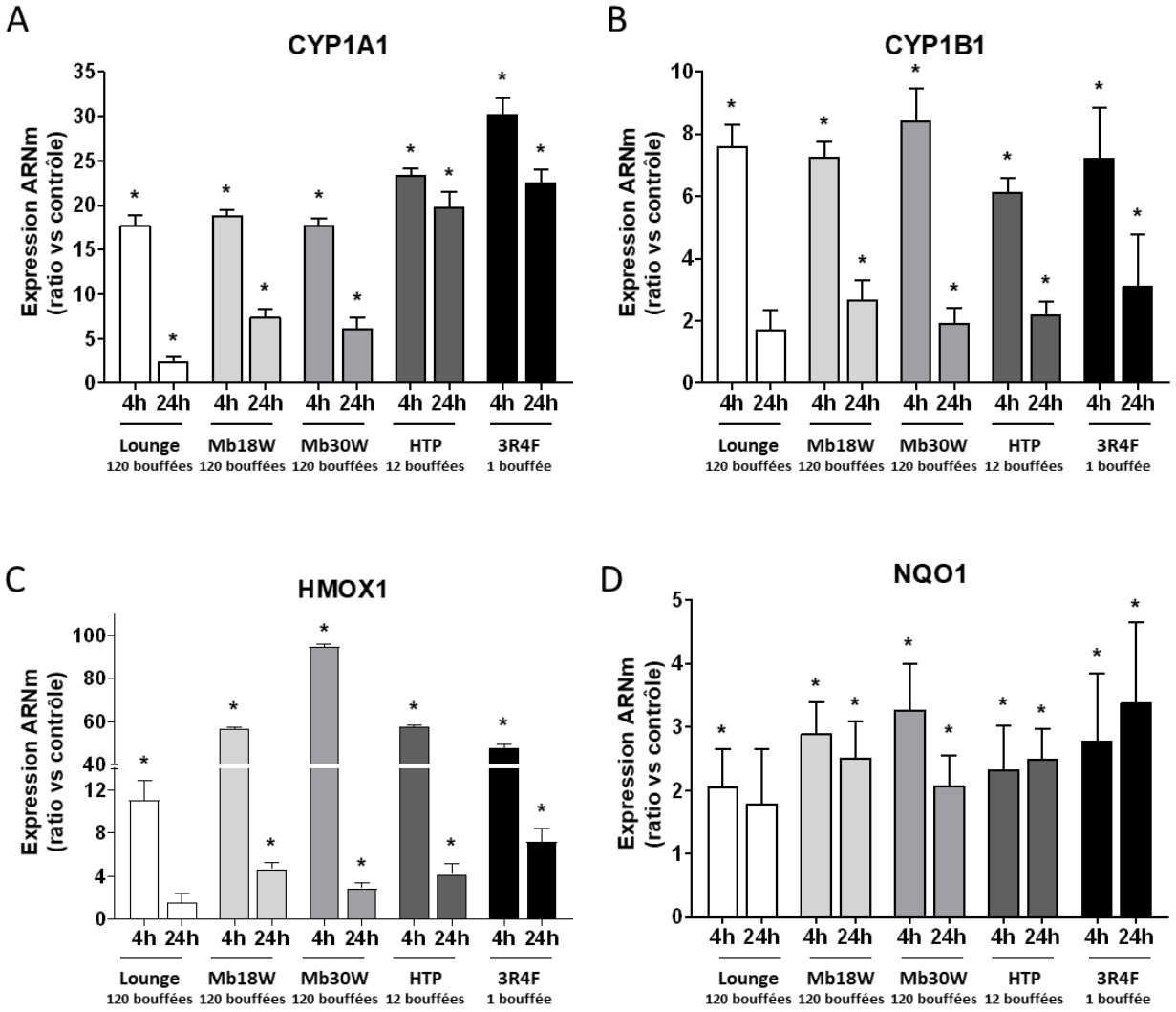


*Figure 37. Expression des ARNm codant pour des gènes liés au métabolisme : CYP1A1 (A) et CYP1B1 (B) ou à la réponse antioxydante : HMOX1 (C) et NQO1 (D) sur des cellules BEAS-2B. L'expression des gènes a été analysée 4h ou 24h après l'exposition aux aérosols d'e-cig (Lounge, Mb18W et Mb30W), de HTP et de 3R4F. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et sont exprimés en rapport comparé aux cellules contrôles dont le rapport d'expression a été arbitrairement fixée à 1. * $p < 0,05$.*

analysée 4 h ou 24 h après une exposition de 120 bouffées aux émissions d'e-cig, de 12 bouffées à celles de HTP et de 1 bouffée à celles de 3R4F. Les résultats sont rapportés dans la Figure 37.

D'abord, une induction de l'expression des gènes du métabolisme, *CYP1A1* et *CYP1B1* a été observée, quel que soit l'exposition ou le temps considéré. Pour les deux gènes l'induction est plus forte 4 h que 24 h après l'exposition. Concernant *CYP1A1,* son expression est bien plus augmentée que celle de *CYP1B1*. De plus, l'induction mesurée est plus forte après une exposition au HTP et à la 3R4F (> x 20 par rapport aux cellules non-exposées) qu'après une exposition aux e-cig. Ensuite, une augmentation de l'expression des gènes d'enzymes antioxydantes, *HMOX1* et *NQO1*, a été également observée, quel que soit le dispositif ou le temps considéré sauf 24h après une exposition aux aérosols de Lounge. De plus, l'expression de *HMOX1* et de *NQO1*, augmente avec l'augmentation de la puissance délivrée par les e-cig. Enfin, l'augmentation de l'expression du gène *HMOX1* est plus importante à 4h qu'à 24h, témoignant de la rapidité des mécanismes mis en jeu dans la réponse au stress oxydant. Pour l'ensemble des gènes, la cigarette induit les mêmes effets que l'e-cig et le tabac chauffé, mais seulement après 1 bouffée contre 12 pour le tabac chauffé et 120 pour les 3 modèles d'e-cig.

2.4. Analyse de l'inflammation

La réponse inflammatoire des cellules BEAS-2B a été mesurée à l'aide du dosage de dix médiateurs de l'inflammation 24h après une exposition aux aérosols d'e-cig (40 et 120 bouffées), de HTP (2, 12 et 40 bouffées) ou de 3R4F (1 et 2 bouffée(s)). La capacité des cellules BEAS-2B à sécréter ces médiateurs de l'inflammation a été confirmée par un traitement au lipopolysaccharide (LPS). Après 24h d'exposition aux différents dispositifs, 6 médiateurs sur les 10 testés n'ont pas été détectés dans le milieu de culture : GM-CSF, IL-13, IL-1β, MIP-1α, RANTES et TNF-α. En revanche, 4 ont pu être quantifiés : GRO-α, IL-6, IL-8 et MCP-1. Les résultats, exprimés en ratio par rapport à la concentration mesurée dans les cellules contrôles non exposées, sont rapportés dans le Tableau 13.

Tableau 13. Profil de sécrétion des médiateurs de l'inflammation par les cellules BEAS-2B mesurés 24h après les expositions aux émissions d'e-cig (Lounge, Mb18W et Mb30W), de tabac chauffé (HTP), et de cigarette (3R4F). Les données sont représentées par la moyenne ± écart-type des ratios comparés aux cellules non-exposées dont le ratio a été arbitrairement fixé à 1. Les données en gras sont significativement différentes du contrôles (p<0,05).

	IL-6	IL-8	MCP-1	GROα
LPS	38,86 ± 0,41	7,32 ± 0,03	3,91 ± 0,21	8 ± 0,69
Lounge				
40 bouffées	2,14 ± 0,69	0,81 ± 0,36	0,67 ± 0,22	0,68 ± 0,15
120 bouffées	2,21 ± 1	0,63 ± 0,01	**0,62 ± 0,27**	0,6 ± 0,04
Mb18W				
40 bouffées	2,55 ± 1,18	1,13 ± 0,65	0,99 ± 0,08	0,99 ± 0,26
120 bouffées	**2,26 ± 0,63**	0,98 ± 0,35	0,77 ± 0,15	0,82 ± 0,16
Mb30W				
40 bouffées	**3,28 ± 0,48**	0,87 ± 0,12	0,8 ± 0,15	0,71 ± 0,2
120 bouffées	**2,42 ± 0,16**	0,57 ± 0,12	0,63 ± 0,17	**0,38 ± 0,11**
HTP				
2 bouffées	0,4 ± 0,03	0,95 ± 0,03	0,61 ± 0,03	0,9 ± 0,06
12 bouffées	3,03 ± 3,05	**3,27 ± 0,48**	**0,58 ± 0,16**	**0,73 ± 0,05**
40 bouffées	1,3 ± 1,05	1,33 ± 1,54	**0,21 ± 0,14**	**0,24 ± 0,16**
3R4F				
1 bouffée	1,37 ± 0,55	1,44 ± 0,33	0,97 ± 0,11	**0,72 ± 0,06**
2 bouffées	1,45 ± 0,56	1,8 ± 0,86	**0,19 ± 0,06**	**0,24 ± 0,07**

Premièrement, une augmentation de la sécrétion d'IL-6 a été observée dans le milieu de culture des cellules exposées aux aérosols de modèle d'e-cig de troisième génération, après 120 bouffées pour la Mb18W (x 2,3 par rapport aux cellules non exposées) et après 40 (x 3,3) et 120 bouffées (x 2,4) pour la Mb30W. Aucun changement significatif sur la sécrétion d'IL-6 n'a été mesuré pour le HTP et la 3R4F, même après des expositions au plus grand nombre de bouffée (40 et 2 bouffées, respectivement). Concernant IL-8, une exposition aux émissions de HTP induit une augmentation significative de la sécrétion après 12 bouffées (x 3,3), mais cette augmentation n'est pas retrouvée après 40 bouffées.

Une diminution significative de la sécrétion de MCP-1 et de GRO-α a été observée suite aux expositions aux émissions de Mb30W, de HTP et de 3R4F. Ces diminutions sont seulement mesurées pour le temps d'exposition le plus long (120 bouffées) pour la Mb30W (x 0,6 et x 0,4 pour MCP-1 et GRO-α, respectivement), mais sont retrouvées pour la plupart des temps d'exposition pour le HTP (après 2, 12 et 40 bouffées pour MCP-1 et 12 et 40 pour GRO-α) et la 3R4F (après 2 bouffées pour MCP-1 et 1 et 2 bouffées pour GRO-α).

2.5. Analyse de la corrélation entre la composition des aérosols et la toxicité in vitro

Afin d'essayer d'expliquer les différences de toxicité *in vitro* observées par la composition chimique des différents aérosols, les données de viabilité cellulaire et de ratio de glutathion ont été exprimées en fonction des quantités de composés carbonylés et de HAP mesurées précédemment. Les courbes de tendance présentées dans la Figure 38 permettent d'estimer un coefficient de corrélation entre les différents paramètres étudiés. Les données obtenues montrent une corrélation négative entre la quantité de composés mesurés dans les aérosols et la viabilité cellulaire. En effet, plus les quantités de composés carbonylés ou de HAP augmentent, plus la viabilité cellulaire diminue. Cependant les coefficients de corrélation ne sont que de 0,75 et 0,64, respectivement, indiquant que d'autres facteurs rentrent en jeu dans la diminution de la viabilité. De la même façon, les courbes de corrélation C et D montrent que le stress oxydant augmente lorsque la quantité de composés carbonylés et de HAP augmente. Cependant les

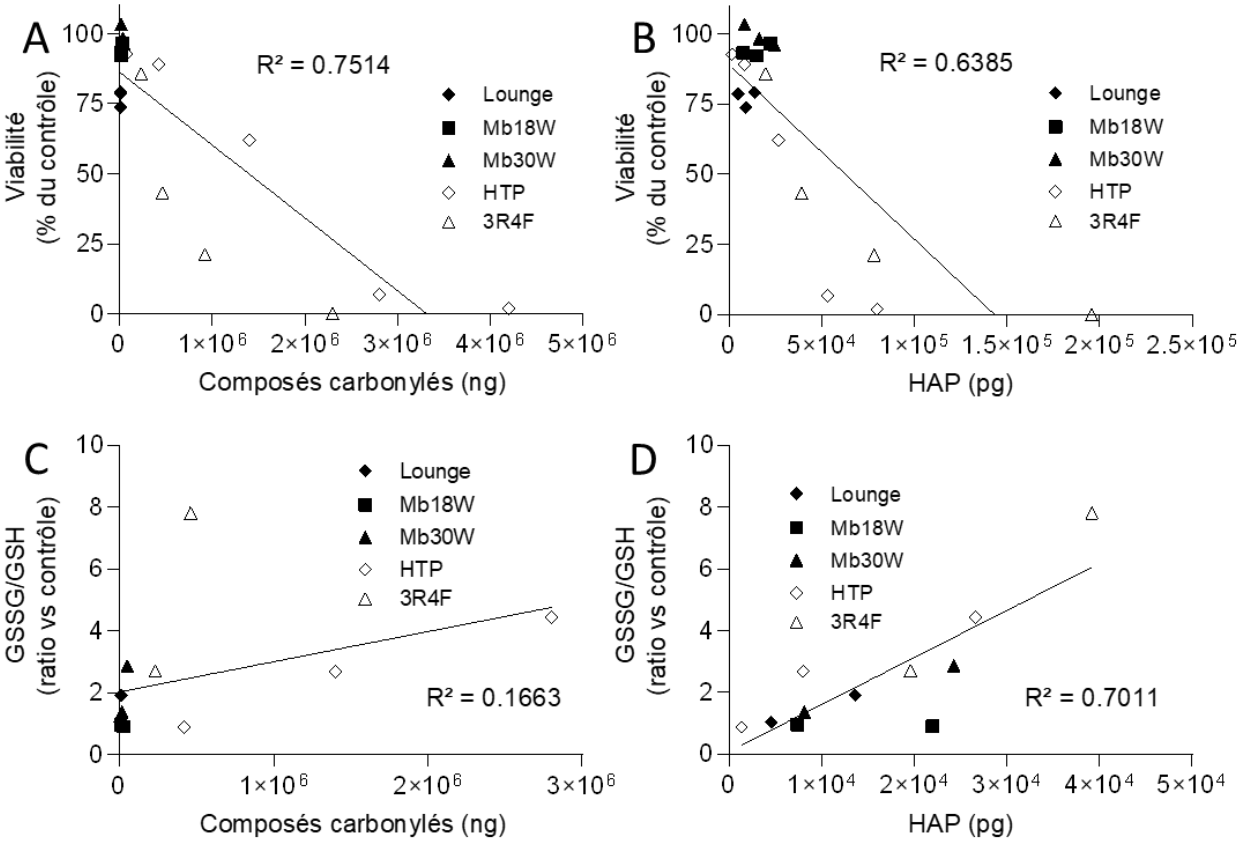


Figure 38. Courbes de tendance et coefficient de corrélation entre les paramètres de toxicité in vitro *et les quantités de composés chimiques retrouvées dans les émissions d'e-cig (Lounge, Mb18W, Mb30W), de HTP ou de 3R4F. (A) Viabilité cellulaire exprimée en fonction des composés carbonylés ; (B) Viabilité cellulaire exprimée en fonction des HAP ; (C) Ratio GSSG/GSH exprimé en fonction des composés carbonylés ; (D) Ratio GSSG/GSH exprimé en fonction des HAP. R^2 = coefficient de corrélation*

coefficients de corrélation sont assez faibles (0,1663 et de 0,7011, respectivement), indiquant, comme pour la diminution de viabilité, que d'autres facteurs rentrent en jeu dans l'induction du stress oxydant.

2.6. Discussion

L'étude de la viabilité cellulaire effectuée dans nos conditions d'exposition a montré que les e-cig testées n'altéraient pas ou peu la viabilité cellulaire, quel que soit le modèle d'e-cig, la puissance de celle-ci ou le nombre de bouffées lors de l'exposition. En revanche, l'exposition aux émissions de tabac chauffé dans les mêmes conditions a induit une forte baisse de viabilité, même si elle est moins rapide qu'avec la cigarette. Nous avons choisi pour nos expériences d'exposer les cellules à des aérosols non dilués. Cette méthode est décrite comme plus sensible pour comparer les réponses aux émissions des nouveaux dispositifs de délivrance de nicotine. C'est ce que suggèrent Bishop *et al.*, qui ont exposé un épithélium bronchique humain reconstitué en 3D à des aérosols dilués ou non dilués d'e-cig et de cigarette (Bishop *et al.*, 2019). Ils observent également que la fumée de cigarette induit plus de mortalité cellulaire que les émissions d'e-cig. Cependant, ils mettent en évidence une baisse de viabilité importante (ED50 = 60 bouffées) avec les aérosols non dilués après une exposition de 40 bouffées aux aérosols d'e-cig. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans notre étude mais cela s'explique par le fait que les auteurs se sont volontairement placés dans des conditions extrêmes en fermant les arrivées d'air de l'e-cig. Ces conditions entraînent une augmentation de la température car il y a moins d'air pour refroidir la résistance et elles peuvent mener à une génération plus importante de composés carbonylés et donc à une cytotoxicité plus importante. Concernant le tabac chauffé, actuellement peu d'études comparent sa cytotoxicité à celle de l'e-cig. De plus, la plupart de ces études ont été réalisées dans des conditions de cultures immergées exposées à des extraits d'aérosols (Ito *et al.*, 2019; Munakata *et al.*, 2018; Sohal *et al.*, 2019). L'approche par des cellules cultivées en IAL est cependant plus pertinente dans le cadre d'étude sur des produits générant des aérosols pouvant être inhalés (Wan *et al.*, 2009). De plus, les études analysant la cytotoxicité du tabac chauffé sur des cultures en IAL sont pour la plupart issues de l'industrie du tabac (Tableau 9). Nos résultats sont cependant en accord avec une étude indépendante qui montre que les aérosols de tabac chauffé induisent une diminution de la viabilité de cellules épithéliales bronchiques humaines (H292) cultivées en IAL. Comme dans notre étude, la diminution de la viabilité

cellulaire observée avec le tabac chauffé est plus importante qu'avec l'e-cig mais moins qu'avec la cigarette (Leigh *et al.*, 2018). Alors que certaines études expriment leurs résultats de viabilité en fonction du nombre de bouffées, ils semblent pertinent d'exprimer les données en fonction de la quantité en nicotine, théorique ou mesurée, pour rendre compte d'une utilisation réelle (Wang *et al.*, 2019). L'expression des résultats en fonction de la quantité de nicotine ne change pas la hiérarchisation des dispositifs vis-à-vis de la viabilité cellulaire. Ces résultats suggèrent alors que pour une même quantité de nicotine, le tabac chauffé est moins cytotoxique que la cigarette mais plus que l'e-cig.

Le stress oxydant est un des mécanismes impliqués dans la pathogénicité pulmonaire de la fumée de cigarette (Rahman and MacNee, 1999). En effet, l'exposition chronique aux radicaux libres et aux composés organiques réactifs retrouvés dans les émissions peut induire à long terme le dysfonctionnement de nombreux processus cellulaires. Bien que les concentrations en composés toxiques soient beaucoup moins importantes dans les émissions d'e-cig, elles pourraient être suffisantes pour induire des effets délétères. L'analyse du stress oxydant dans les cellules exposées aux différents dispositifs a alors été réalisée en mesurant le ratio glutathion oxydé/réduit qui est un bon indicateur de l'équilibre redox intracellulaire (Asensi *et al.*, 1999). Les expositions à la cigarette, au tabac chauffé et à l'e-cig réglée à 30 W ont induit une augmentation de ce ratio, témoignant d'un déséquilibre en faveur des oxydants. L'induction d'un stress oxydant par l'e-cig avait déjà été mise en évidence dans plusieurs études (Chatterjee *et al.*, 2019; Pearce *et al.*, 2020) mais n'avait pas été comparé au tabac chauffé ou à la cigarette. Concernant le tabac chauffé, nos résultats vont dans le sens de Wang et al., qui montrent également une diminution du taux de glutathion oxydé, mais aussi une augmentation de la quantité d'ERO dans une lignée de macrophages cultivée en IAL (Wang *et al.*, 2019). Par contre, ces données diffèrent de ce qui avait été présenté par PMI, indiquant que le tabac chauffé n'avait pas d'effet sur la génération de ERO et sur le contenu en glutathion (Taylor *et al.*, 2018). Cette dernière étude a cependant été réalisée sur des cellules en culture immergée et sur une lignée cellulaire différente (H292), ce qui peut expliquer la différence de résultats. Munakata et al. ont également montré une modification du contenu en glutathion dans des cellules BEAS-2B après des expositions aux aérosols de tabac chauffé et d'e-cig (Munakata *et al.*, 2018). Nos résultats ont, en plus, permis de mettre en évidence une différence de réponse en fonction de la puissance de l'e-cig. En effet, contrairement aux émissions de la Mb30W, celles du modèle Lounge et de la Mb18W ne semblent pas

modifier le contenu en glutathion des cellules exposées. L'analyse de l'expression de gènes impliqués dans les processus de détoxication (*CYP1A1* et *CYP1B1*) et dans la réponse antioxydante (*HMOX1* et *NQO1*) ont pu permettre de vérifier si d'autres mécanismes cellulaires de défense contre les substances toxiques ont été impactés. De façon intéressante, l'expression des quatre gènes analysés a été augmentée pour tous les dispositifs testés, y compris le modèle Lounge et Mb18W. La fumée de cigarette et plus particulièrement les HAP sont connus pour induire l'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1 qui,* via l'activation du récepteur Ahr, les métabolisent en produits potentiellement génotoxiques (Sacks *et al.*, 2011). Ces enzymes contribuent à l'élimination des HAP mais peuvent produire des métabolites intermédiaires hautement réactifs et génotoxiques. La surexpression des CYP1A1 et CYP1B1 a été mise en évidence dans les poumons de fumeurs (Kim *et al.*, 2004) mais également suite à une exposition *in vitro* aux aérosols d'e-cig (Sun *et al.*, 2019). Ces données sont en accord avec les résultats de ce projet et suggèrent que même si les émissions d'e-cig renferment des traces de HAP, cela suffit pour induire une surexpression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*, qui peuvent participer à la production de composés génotoxiques (Guengerich, 2008). Les composés carbonylés peuvent aussi activer la voie Nrf2 qui intervient dans la réponse antioxydante et l'induction de l'expression de *HMOX1* et *NQO1* qui sont impliqués dans l'élimination des ERO (Zhang *et al.*, 2019). Ces composés, bien caractérisés dans la fumée de cigarette ont également été retrouvés, en moindre quantité, dans nos analyses des émissions de tabac chauffé et d'e-cig ; ils peuvent expliquer l'induction de ces gènes mesurée dans les cellules exposées. Ces données illustrent la capacité de tous les dispositifs testés à induire ces processus de défenses cellulaires. Dans la fumée de cigarette, les espèces oxydantes sont principalement générées par le processus de combustion (Kopa and Pawliczak, 2020) et peuvent être corrélées à la quantité totale de composés toxiques dans les émissions. Dans notre cas, la quantité plus importante de composés carbonylés générée par l'e-cig réglée à la plus forte puissance (Mb30W) pourrait expliquer que cette dernière est la seule à induire une altération du contenu en glutathion. En effet, une puissance plus élevée signifie une température de chauffe de la résistance plus élevée et un volume de e-liquide consommé plus grand et donc une potentielle production d'espèces oxydantes plus importante (Haddad *et al.*, 2019; Son *et al.*, 2019; Zhao, 2018). Cependant, il a été montré que les émissions d'e-cig peuvent contenir de 10 à 1000 fois moins de radicaux libres que la fumée de cigarette (Son *et al.*, 2019). En effet, les résultats précédemment décrits ont

été obtenus à différents temps d'expositions selon le dispositif : 120 bouffées pour l'e-cig, seulement 12 bouffées pour le tabac chauffé et une seule bouffée pour la cigarette. Il faut alors replacer ces temps d'exposition dans le cadre d'une utilisation réaliste : alors que le nombre de bouffée pour le tabac chauffé semble raisonnable, 120 bouffées d'e-cig en 1h correspond plutôt à une session intense de vapotage (Jones *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2017)

L'inflammation chronique provoquée par la fumée de cigarette est considérée comme jouant un rôle central dans la pathogenèse de maladies respiratoires comme la BCPO ou le cancer du poumon. L'augmentation de l'IL-6 observée après des expositions aux trois modèles d'e-cig a déjà été décrite dans plusieurs modèles cellulaires exposés à l'e-cig (Merecz-Sadowska *et al.*, 2020) et aussi dans le plasma de vapoteurs réguliers (Singh *et al.*, 2019). Concernant le tabac chauffé, la réponse biphasique observée dans notre étude concernant l'IL-8 (c'est-à-dire une augmentation après 12 bouffées et diminution après 40 bouffées) a déjà été décrite dans la littérature. Munakata *et al.* observent cette réponse biphasique sur des cellules BEAS-2B exposées à des extraits d'aérosols de tabac chauffé et de fumée de cigarette mais également pour GM-CSF, contrairement à notre étude (Munakata *et al.*, 2018). Cette différence peut s'expliquer encore une fois par le fait que l'étude en question est réalisée sur des cultures de cellules immergées et exposées à des extraits d'aérosols et non directement aux aérosols sur des cellules cultivées en IAL. Nous avons également mesuré une diminution de la sécrétion de GRO-α et de MCP-1 pour les temps d'exposition les plus longs aux émissions d'e-cig, de tabac chauffé et de cigarette. Cette diminution a déjà été décrite suite à une exposition de cellules endothéliale humaine à la cigarette (Allam *et al.*, 2013). GRO-α joue un rôle majeur dans le recrutement sur le site de l'inflammation des neutrophiles qui participent au maintien de l'homéostasie tissulaire et à l'aide pour lutter contre les agressions des voies respiratoires notamment. MCP-1 est un chimio-attractant pour recruter les monocytes et les macrophages sur les tissus inflammatoires. De ce fait, la diminution de GRO-α et de MCP-1 observée dans le cas des expositions aux émissions de tabac chauffé et à la fumée cigarette pourrait être délétère pour l'immunité des tissus pulmonaires et affecter le bon déroulement de la réponse anti-inflammatoire. Ces modulations de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation peuvent être partiellement expliquées par les quantités de composés carbonylés et les HAP mesurées dans les différentes émissions. En effet, certains composés carbonylés, notamment les aldéhydes tels que l'acroléine, le formaldéhyde et l'acétaldéhyde, sont des irritants pour les voies respiratoires et peuvent déclencher une

inflammation (Lino-dos-Santos-Franco *et al.*, 2011; Shields *et al.*, 2017). Le benzo(a)pyrène est également un composé pouvant induire la sécrétion de cytokines (Chen *et al.*, 2012a). D'autres composés contenus dans les émissions peuvent jouer un rôle dans l'induction de la réponse inflammatoire comme les métaux, par exemple (Lerner *et al.*, 2015). De plus, le propylène glycol et le glycérol sont des molécules très hygroscopiques, c'est-à-dire qu'elles retiennent les molécules d'eau du milieu environnant ; elles peuvent de ce fait provoquer un stress hyper osmotique (Fowles *et al.*, 2013; Frank *et al.*, 1981). La présence de ces composés au niveau des voies respiratoires pourraient ainsi altérer le mécanisme de clairance muco-ciliaire et mener à une augmentation de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (Iskandar *et al.*, 2016; Munkholm and Mortensen, 2014; Palazzolo *et al.*, 2017).

Il semble important de rappeler que pour l'ensemble des paramètres étudiés, nous avons choisi de nous placer à des temps d'exposition pour lesquels les émissions n'induisaient pas une baisse de viabilité supérieure à 50 %. Ceci nous permettant d'évaluer les mécanismes de toxicité précoces induits par les différents dispositifs. Cependant, ces temps d'exposition sont très différents en fonction du dispositif et ont pu impacter les résultats obtenus. En effet, bien qu'une exposition à une seule bouffée de cigarette soit suffisante pour générer du stress oxydant et induire l'expression d'enzymes responsables du métabolisme des xénobiotiques, ce nombre de bouffée est peut-être insuffisant pour induire une réponse inflammatoire caractéristique d'une exposition à la fumée de cigarette. Par ailleurs, certaines protéines de l'inflammation sont sécrétées rapidement après la mise en contact avec des composés toxiques alors que d'autres interviennent plus tardivement. Pour cette étude, nous avons choisi d'évaluer la sécrétion de ces protéines 24h après la dernière exposition mais il faudrait réaliser une cinétique complète pour mieux caractériser la réponse inflammatoire induite par ces dispositifs. Enfin, les expérimentations *in vitro* ont été réalisées sur des cellules BEAS-2B qui sont largement utilisées dans l'étude des voies respiratoires. Cependant, il serait intéressant d'étudier la réponse d'autres modèles cellulaires des voies respiratoires aux émissions d'e-cig. Des modèles de cellules primaires mieux différenciées avec la présence de cellules ciliées et sécrétrices de mucus pourraient exprimer des réponses différentes aux expositions. De plus, l'utilisation de co-cultures ou de cultures 3D serait primordiale pour étudier les mécanismes mis en place.

Finalement, en reliant les paramètres analysés (viabilité, stress oxydant et réponse inflammatoire) aux quantités de composés carbonylés et de HAP mesurées dans les différents aérosols, les courbes de corrélations montrent que (i) la diminution de la viabilité cellulaire semble partiellement corrélée à la concentration des émissions en composés carbonylés et en HAP, (ii) l'augmentation du ratio GSSG/GSH, montre une meilleure corrélation avec la quantité de HAP mesurée dans les émissions qu'avec celles des composés carbonylés et (iii) les HAP et les composés carbonylés ne jouent qu'un rôle mineur dans la réponse inflammatoire induite par les différents dispositifs. En effet, les composés carbonylés et les HAP ne représentent qu'une fraction du mélange complexe constituant la fumée de cigarette et les émissions de tabac chauffé et d'e-cig. D'autres familles de composés toxiques susceptibles d'être présents dans les aérosols d'e-cig et de tabac chauffé tels que les métaux, les nitrosamines et les composés organiques volatiles par exemple (Li *et al.*, 2019b; Schaller *et al.*, 2016a; Zhao *et al.*, 2016) participent à l' « effet cocktail » et devront également être pris en considération dans l'étude de la toxicité des différentes émissions.

Évaluation de la toxicité des émissions d'e-cig et de cigarette dans un modèle de souris BALB/c

3. ***Évaluation de la toxicité pulmonaire des émissions d'e-cig et de cigarette dans un modèle de souris BALB/c***

L'étude de la toxicité de l'e-cig et du tabac chauffé s'est d'abord portée sur la composition chimique des aérosols, puis sur des expérimentations *in vitro*. Cependant, il est impossible d'identifier les effets des émissions sur l'ensemble d'un organe voire d'un organisme à partir de ces seules données. L'exposition d'animaux à ces dispositifs est ainsi primordiale pour comprendre et évaluer la pathogénicité potentielle de l'e-cig. Sur les quelques études menées sur des modèles *in vivo*, peu analysent les effets à long terme et aucune ne s'est intéressée à l'impact potentiel de la puissance de l'e-cig sur la toxicité.

C'est pourquoi la dernière partie de ce travail de thèse consiste à l'exposition d'un modèle de souris BALB/c à des émissions d'e-cig de troisième génération (Mb18W ou Mb30W) pendant 4 jours, 3 mois ou 6 mois. Les effets de ces émissions ont été évalués en termes de stress oxydant, de génotoxicité, et de modifications épigénétiques et transcriptomiques, puis comparés à ceux de la fumée de cigarette.

3.1. Génotoxicité

3.1.1. Analyse des lésions oxydatives de l'ADN

La 8-OHdG, un marqueur de lésions oxydatives sur l'ADN a été quantifiée dans le tissu pulmonaire des souris exposées aux émissions d'e-cig ou de cigarette pendant 4 jours, 3 mois ou 6 mois. Les résultats exprimés en ratio par rapport à la quantité de 8-OHdG des souris contrôles sont présentés dans la Figure 39. Les émissions du modèle d'e-cig Mb18W n'ont jamais induit de changement significatif de la quantité de 8-OHdG quelle que fût la durée des expositions. Cependant les émissions du modèle d'e-cig de plus forte puissance, Mb30W, ont induit une augmentation significative pour les temps 60 (x1,5) et 90 minutes (x1,6) des expositions aiguës. Cette augmentation significative est également observée après les expositions de 3 mois (x1,8) et 6 mois (x1,2). Concernant la fumée de cigarette, elle a induit également une augmentation de la quantité de 8-OHdG aux temps 4 jours (x1,6), 3 mois (x2) ou 6 mois (x1,4). A noter que les augmentations significatives observées avec la Mb30W et la 3R4F après 3 mois d'exposition sont aussi significatives par rapport à la quantité mesurée avec la Mb18W.

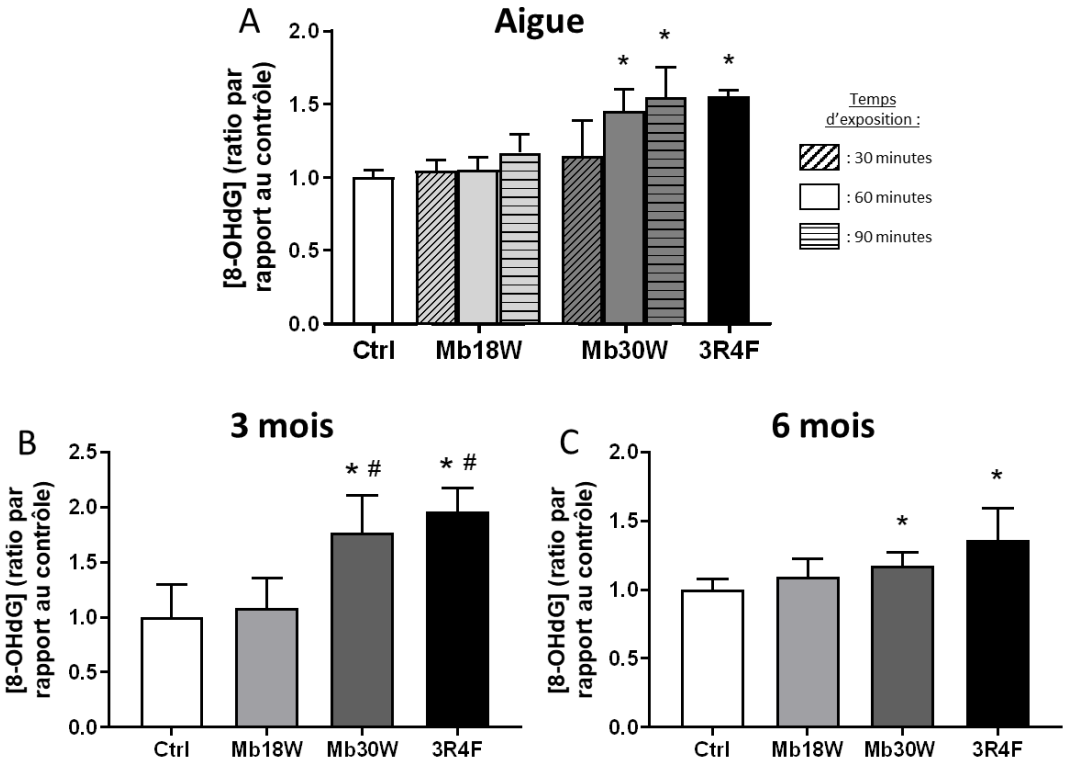


*Figure 39. Quantité de 8-OHdG mesurée dans l'ADN pulmonaire de souris exposées 30, 60 ou 90 minutes à l'e-cig (Mb18W et Mb30W) ou à la 3R4F pendant 4 jours (A), ou 60 minutes pendant 3 mois (B) ou 6 mois (C) exprimée par rapport à celle des souris contrôles (ctrl) arbitrairement fixée à 1. * p < 0,05 par rapport aux souris contrôles ; # p < 0,05 par rapport à Mb18W.*

3.1.2. Analyse des cassures simple et double brins de l'ADN (test des comètes)

Le test des comètes a été réalisé pour rechercher des lésions primaires de l'ADN dans le foie et les poumons des souris exposées aux émissions d'e-cig et de cigarette pendant 4 jours, 3 mois et 6 mois. Ce test évalue l'occurrence de cassures simple et double brin de l'ADN suite à des expositions. Un contrôle positif a été réalisé avec le méthane sulfonate de méthyle (MMS), un agent alkylant connu pour ses propriétés génotoxiques. Les résultats des tests des comètes sont présentés dans la Figure 40.

Les tests des comètes classiques indiquent que les expositions de 4 jours et de 3 mois aux émissions d'e-cig et de cigarette n'ont pas induit de lésions primaires de l'ADN au niveau du foie et des poumons. En revanche, le pourcentage d'ADN altéré au niveau de la queue des comètes est significativement plus élevé dans le cas des cellules exposées au MMS, témoignant de la validité du test. Puisque les résultats du dosage de la 8-OHdG présentés précédemment avaient montré l'existence de lésions oxydatives de l'ADN chez les souris exposées pendant 4 jours ou 3 mois aux émissions de Mb30W et de cigarette, une étape supplémentaire consistant à incuber l'ADN avec la 8-hydroxyguanine ADN-glycosylase (hOgg1) a été réalisée pour les souris exposées pendant 6 mois aux différentes émissions afin d'augmenter la sensibilité du test. En effet, cette enzyme clive spécifiquement les lésions oxydatives au niveau de la 8-oxoguanine et génèrent des fragments d'ADN supplémentaires. Ainsi, pour les expositions de 6 mois, alors que le test des comètes hOgg(-) ne mesure aucune altération de l'ADN, le test hOgg(+) est en accord avec les dosages de 8-OHdG à 6 mois et révèle que les émissions de Mb30W et de 3R4F augmentent significativement le pourcentage d'ADN fragmenté retrouvé dans la queue de la comète, indiquant une augmentation des lésions oxydatives de l'ADN au niveau hépatique et pulmonaire. Cette augmentation n'est pas retrouvée dans le cas d'une exposition à la Mb18W.

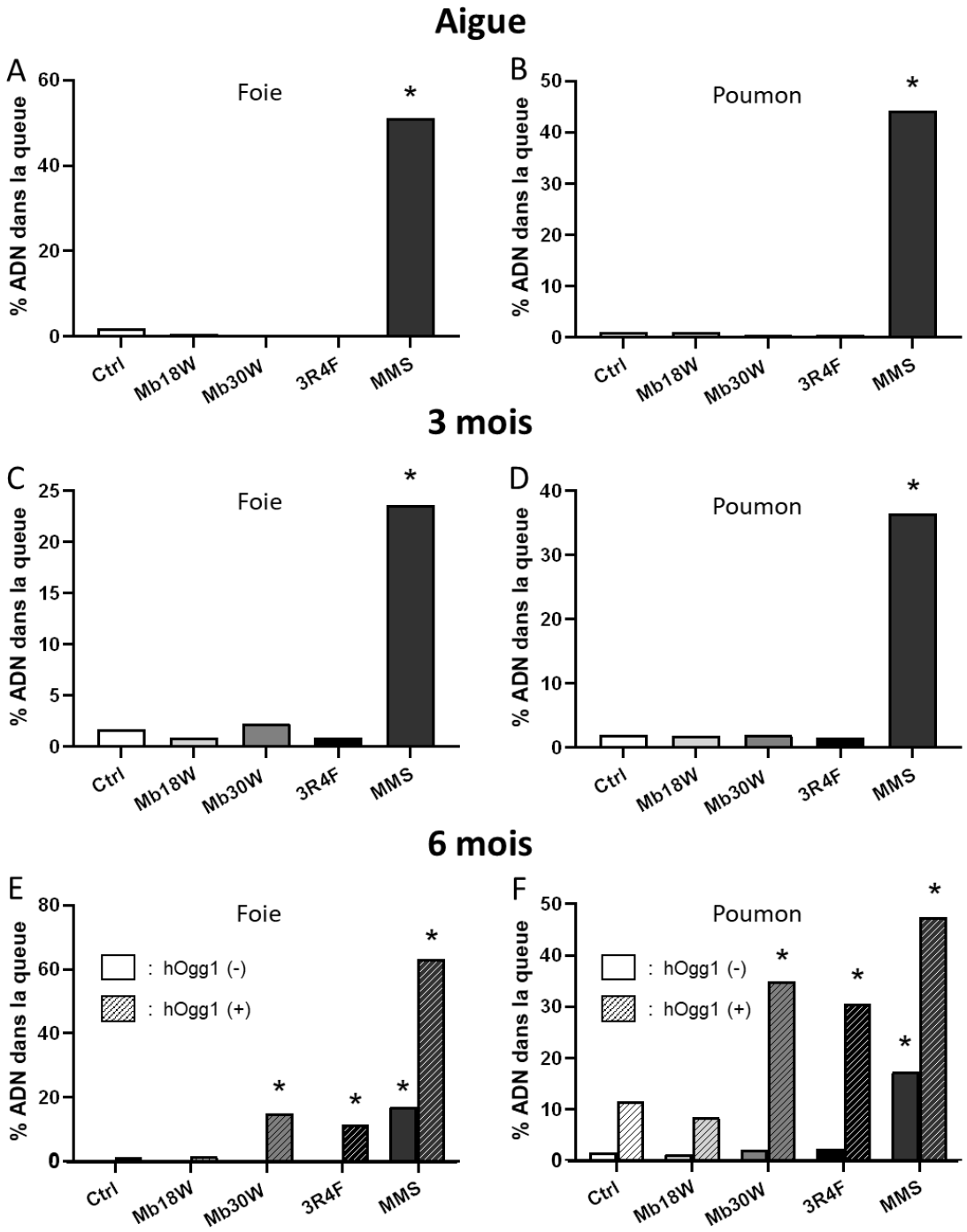


*Figure 40. Lésions primaires de l'ADN évaluées par le test des comètes au niveau hépatique (A, C et E) et pulmonaire (B, D et F) après expositions de 60 minutes des souris BALB/c aux e-cig (Mb18W, Mb30W) et à la 3R4F pendant 4 jours (A et B), 3 mois (C et D) ou 6 mois (E et F). Contrôle positif : MMS (méthane sulfonate de méthane). hOgg1 (-) : test des comètes classique ; hOgg1 (+) : test des comètes associés à l'enzyme hOgg1. * p < 0,05 par rapport aux souris contrôles (ctrl).*

3.1.3. Analyse des aberrations chromosomiques (test des micronoyaux)

Le test des micronoyaux a été réalisé sur la moelle osseuse pour déterminer si les émissions d'e-cig ou de cigarette pouvaient induire des aberrations chromosomiques

après des expositions subchronique (3mois) ou chronique (6 mois). Les résultats rapportant le nombre de micronoyaux comptés dans les érythrocytes (MNPCE) et le rapport du nombre d'érythrocytes polychromatiques (PCE) sur le nombre d'érythrocytes normochromatiques (NCE) sont présentés en Figure 41. Le rapport PCE/NCE est indiqué pour évaluer la cytotoxicité des traitements effectués sur les cellules de la moelle osseuse.

Alors qu'une exposition au MMS a induit une augmentation significative du nombre de micronoyaux par rapport aux échantillons contrôles, certifiant de la validité du test, aucune variation significative n'a été observée dans le nombre de MNPCE quels que fussent le dispositif et la durée d'exposition. De plus, aucune variation significative du ratio PCE/NCE n'a été observée, témoignant que les tests ont été réalisés dans des conditions d'expositions non cytotoxiques.

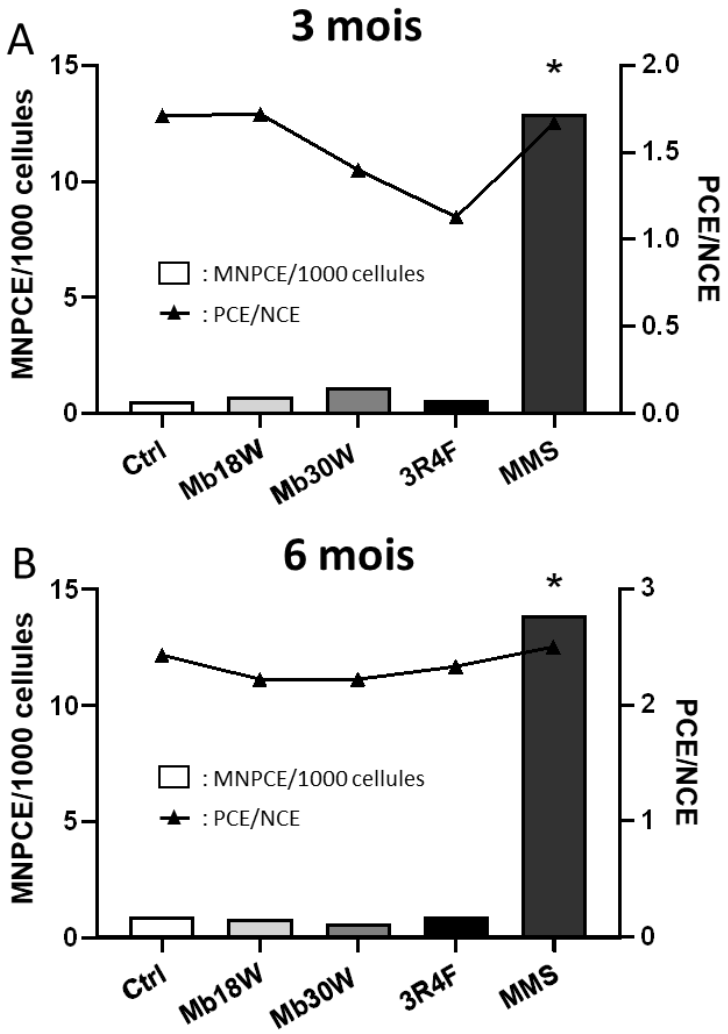


*Figure 41. Tests des micronoyaux évaluant les aberrations chromosomiques après une exposition de 60 minutes des souris BALB/c aux émissions d'e-cig (Mb18W ou Mb30W) ou de cigarette pendant 3 mois (A) ou 6 mois (B). MNPCE : Nombre de micronoyaux dans les érythrocytes polychromatiques ; PCE : érythrocytes polychromatiques ; NCE : érythrocytes normochromatiques. * $p < 0,05$ par rapport aux souris contrôles (ctrl).*

3.1.4. Analyse des mutations géniques (test du Pig-A)

Pour évaluer les mutations géniques induites par les émissions d'e-cig, le test *du Pig-A* a été réalisé sur les cellules sanguines des animaux exposés pendant 3 mois ou 6 mois. L'effet mutagène est estimé en comptant par cytométrie en flux la fréquence d'érythrocytes (RBC pour *red blood cells*) et de réticulocytes (RET) mutants pour le gène *Pig-A*. La cytotoxicité induite par les expositions est estimée par le pourcentage de RET nouvellement formés qui témoigne du bon déroulement de l'hématopoïèse. Les résultats sont présentés dans la Figure 42.

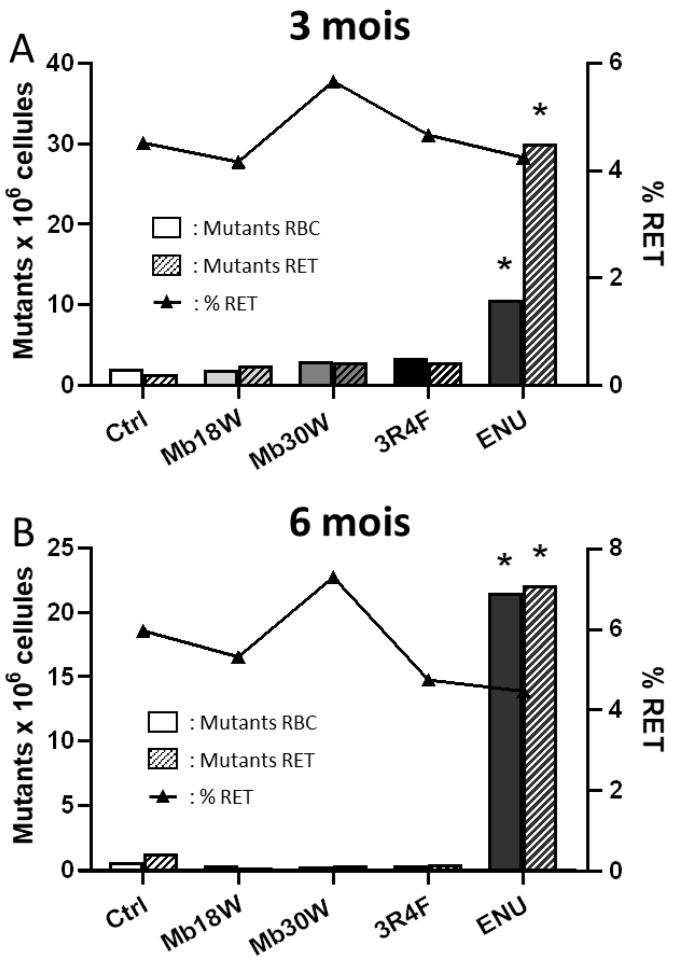


*Figure 42. Test du Pig-A évaluant l'induction de mutations géniques après expositions de 60 minutes des souris BALB/c pendant 3 mois (A) ou 6 mois (B) aux émissions d'e-cig (Mb18W ou Mb30W) ou de 3R4F. Les résultats sont exprimés en nombre d'érythrocytes (RBC) ou de réticulocytes (RET) mutants pour le gène Pig-A. Le ratio % RET rapporte le pourcentage de nouveaux réticulocytes observées. * p < 0,05 par rapport aux souris contrôles (ctrl). ENU : N-nitroso-N-éthylurée, contrôle positif.*

Comme lors des tests précédents, alors que le contrôle positif (ENU) a induit une augmentation significative de la fréquence des RET ou RBC mutants, aucune variation significative n'a été observée après une exposition aux émissions d'e-cig Mb18W, Mb30W ou de cigarette, témoignant de l'absence de mutations géniques. Le pourcentage de RET par rapport au nombre de cellules totales ne change pas entre les dispositifs, témoignant de l'absence de l'altération de l'hématopoïèse pour les temps d'expositions testés.

3.2. Modifications épigénétiques

En plus de ces mécanismes de génotoxicité, la fumée de cigarette peut également moduler l'expression du génome par le biais de modifications épigénétiques. La méthylation globale de l'ADN, la modification des histones et la dérégulation de miARN pourraient notamment jouer un rôle dans la pathogénicité du tabac. L'étude de ces modifications dans le cadre d'expositions à l'e-cig pourrait permettre de mettre en évidence des mécanismes qui pourraient jouer un rôle dans la potentielle toxicité de ces dispositifs.

3.2.1. Méthylation globale de l'ADN

La méthylation de l'ADN joue un rôle dans l'initiation de la transcription des gènes. L'analyse du taux de méthylation de l'ADN a été réalisée chez les souris exposées pendant 3 mois ou 6 mois aux émissions des e-cig réglées à 18 W ou 30 W, ou de cigarette. La Figure 43 rapporte ces résultats. Après 3 mois d'exposition, aucun changement significatif n'a été observé chez les souris exposées par rapport aux souris contrôles. En revanche, après 6 mois d'exposition, une augmentation de la méthylation globale de l'ADN d'un ratio 1,4 a

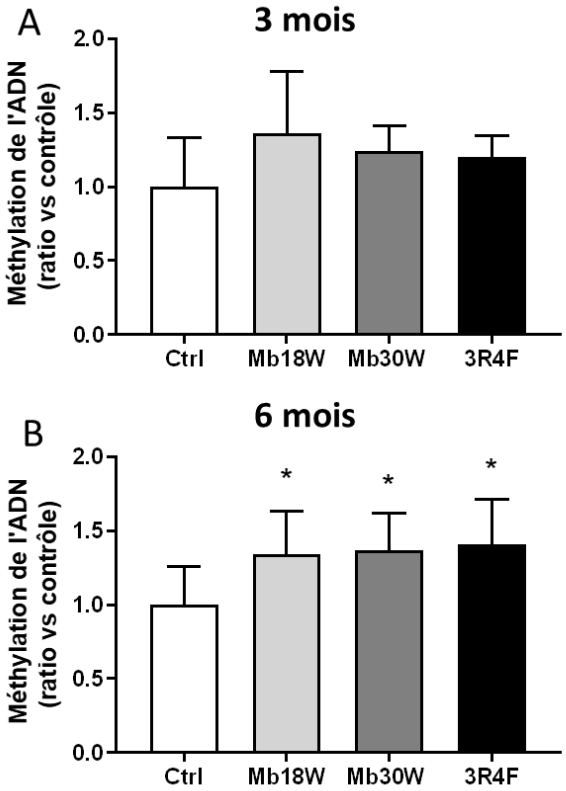


*Figure 43. Taux de méthylation globale de l'ADN mesuré au niveau pulmonaire sur des souris BALB/c exposées 60 minutes à l'e-cig (Mb18W et Mb30W) ou à la 3R4F pendant 3 mois (A) ou 6 mois (B). Les résultats sont exprimés en ratio par rapport au taux de méthylation mesuré chez les souris contrôles (ctrl) dont le ratio a été arbitrairement fixé à 1. * $p < 0,05$.*

été enregistrée chez les souris exposées aux émissions de Mb18W, Mb30W ou de cigarette.

3.2.2. Analyse de la modification des histones

Les histones jouent un rôle fondamental dans la compaction de l'ADN en chromatine et dans la régulation des fonctions du génome. Toute modification de ces histones peut ainsi favoriser ou inhiber la transcription de certains gènes. L'une des principales modifications d'histones est l'acétylation, elle est médiée par deux enzymes : l'histone acétyltransférase (HAT) et l'histone désacétylase (HDAC). C'est la balance entre ces deux enzymes qui détermine l'état d'acétylation des histones et toute dérégulation peut être responsable d'une modification de l'expression génique.

Les activités de HAT et de HDAC ont été mesurées au niveau pulmonaire en réponse à des expositions de 3 ou 6 mois aux émissions d'e-cig Mb18W, de Mb30W ou de 3R4F. Les résultats sont présentés dans la Figure 44. Aucune variation significative d'activité, ni

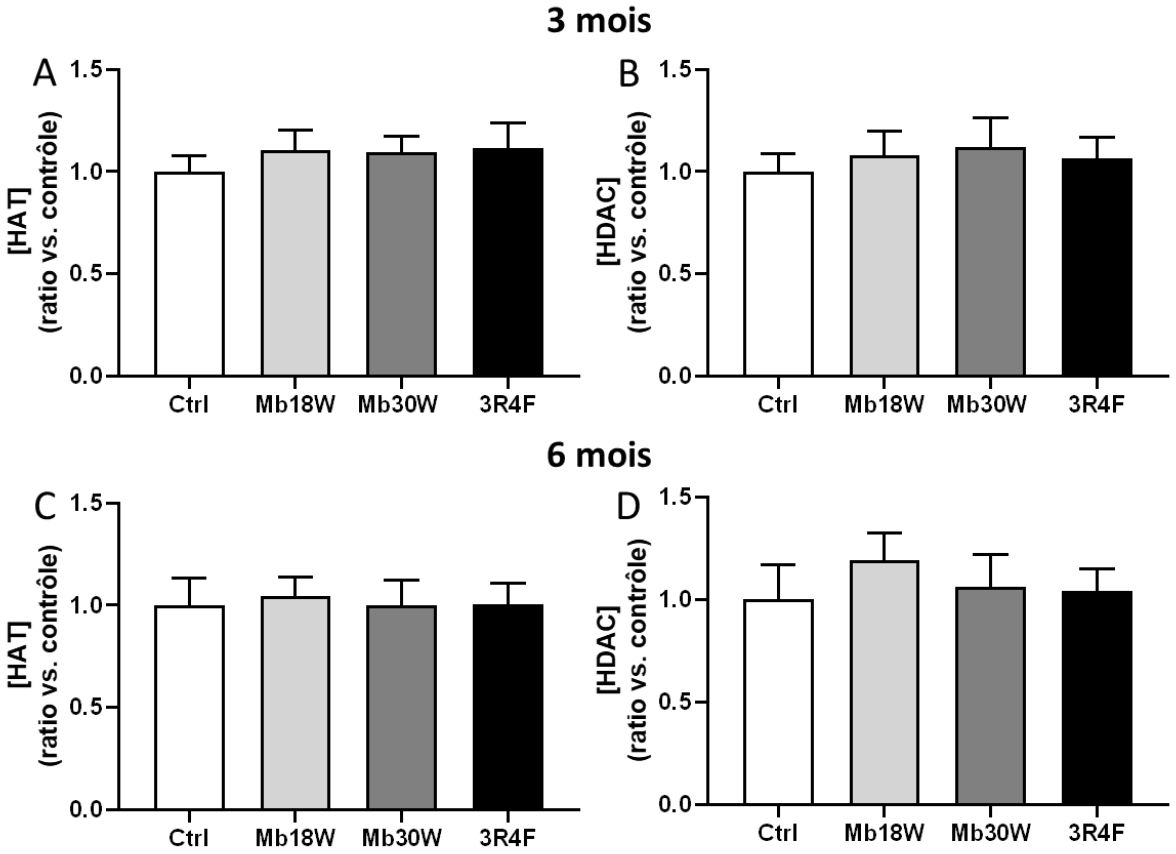


Figure 44. Analyse de l'activité de l'histone acétyltransférase (HAT) et de l'histone désacétylase (HDAC) au niveau des poumons de souris BALB/c exposées aux émissions de deux e-cig (Mb18W et Mb30W) ou de 3R4F pendant 3 mois (A et B) ou 6 mois (C et D). Les résultats sont exprimés en ratio de l'activité mesurée chez les souris contrôles (ctrl) dont le ratio a été arbitrairement fixé à 1.

du ratio HAT/HDAC n'a été mesurée chez les animaux. Ces résultats sont observés avec tous les dispositifs et pour tous les temps d'exposition.

3.2.3. Analyse des miARN

Le profil d'expression de 754 miARN a été déterminé au niveau pulmonaire après expositions des souris BALB/c à l'e-cig ou à la cigarette pendant 4 jours, 3 mois ou 6 mois. La Figure 45 rapporte le nombre de miARN dérégulés d'un facteur d'au moins 1,5 par rapport aux souris contrôles ($p<0,05$) pour les expositions aiguës. Les résultats montrent que le nombre total de miARN dérégulés est plutôt similaire entre les 3 temps d'exposition à la Mb18W (entre 14 et 17 miARN). En revanche, chez les souris exposées à la Mb30W, le nombre total de miARN dérégulés est plus faible à 30 minutes (10 miARN) qu'aux temps d'exposition les plus longs (19 miARN à 60 et à 90 minutes). Enfin, c'est après l'exposition à la fumée de cigarette (60 min) que l'expression des miARN est la plus altérée avec 30 miARN dérégulés.

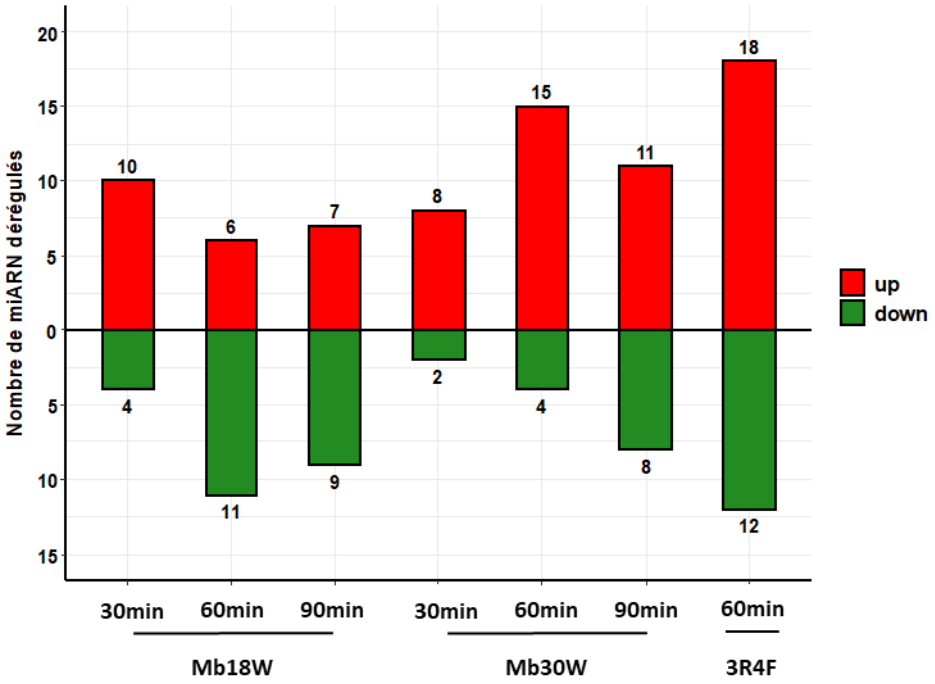


Figure 45. Nombre de miARN dérégulés au niveau pulmonaire après des expositions de souris BALB/c 30, 60 ou 90 minutes par jour pendant 4 jours aux émissions d'e-cig (Mb18W ou Mb30W) et à la fumée de cigarette par rapport aux souris contrôles non exposées. Les miARN ont été considérés dérégulés quand leur différentiel d'expression était d'au moins 1,5 ($p<0,05$). Les histogrammes en rouge représentent les miARN surexprimés et les histogrammes en vert représentent les miARN sous-exprimés dans chaque groupe.

La Figure 46 répertorie le nombre de miARN dérégulés au niveau pulmonaire après des expositions chroniques de 3 mois ou de 6 mois. En ce qui concerne les expositions de 3 mois, la fumée de cigarette a induit un nombre de miARN dérégulés plus élevé que les

émissions de Mb18W ou de Mb30W (11 et 5 miARN dérégulés, respectivement). Cette différence n'est plus observée après 6 mois d'exposition : alors que la Mb18W a induit la dérégulation de 4 miARN, la Mb30W et la cigarette ont induit la dérégulation de 8 miARN. Les listes des miARN dérégulés après les expositions de 4 jours, 3 mois ou 6 mois sont rapportées en annexe dans le Tableau S 3, le Tableau S 4 et le Tableau S 5, respectivement.

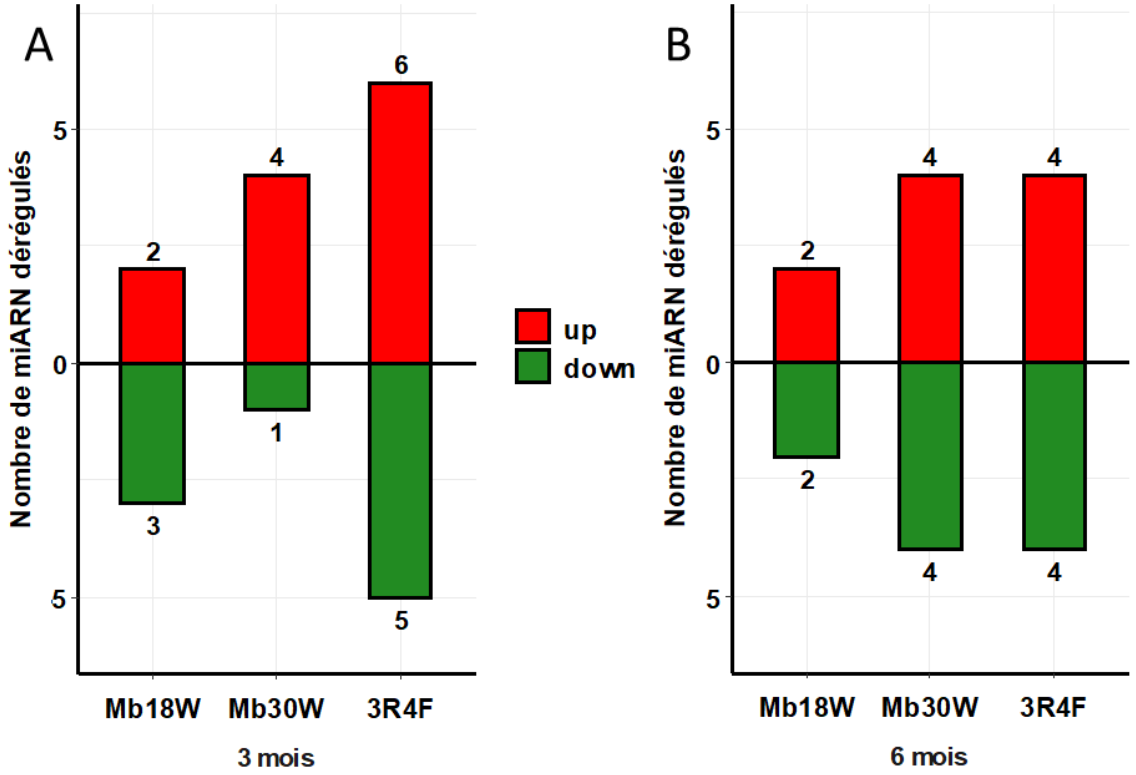


Figure 46. Nombre de miARN dérégulés au niveau pulmonaire après des expositions de 60 minutes, 5 jours/semaine pendant (A) 3 mois ou (B) 6 mois aux émissions d'e-cig ou à la fumée de cigarette par rapport aux souris contrôles non exposées. Les miARN ont été considérés dérégulés quand leur différentiel d'expression était d'au moins 1,5 (p<0,05). Les histogrammes en rouge représentent les miARN surexprimés et les histogrammes en vert représentent les miARN sous-exprimés dans chaque groupe.

Parmi les miARN dérégulés par les émissions de Mb18W, de Mb30W et de cigarette (Figure 47), très peu de miARN sont communs aux temps d'expositions 4 jours, 3 mois ou 6 mois. En effet, seul le mir-653 est commun entre les expositions de 3 mois et de 6 mois à la Mb18W, le mir-223 pour les expositions de 3 et 6 mois à la Mb30W et le mir-494 pour les expositions aiguës et de 6 mois à la cigarette. Enfin, certains miARN dérégulés sont communs entre les dispositifs (Figure 48). Concernant les expositions aiguës, 6 miARN sont communs entre la Mb18W et la 3R4F, 7 sont communs entre la Mb30W et la 3R4F et 2 sont communs entre toutes les expositions. Après 3 mois d'exposition, le mir-189 est commun à tous les dispositifs. Aucun autre miARN n'est commun à ce temps d'exposition. Pour les expositions de 6 mois, deux miARN sont notables : le mir-223 qui est surexprimé dans le cas de la Mb30W et sous-exprimé dans celui de la cigarette, et le mir-375 qui est surexprimé par la Mb18W et la cigarette. Aucun miARN dérégulé commun n'est retrouvé pour les deux modèles d'e-cig après 6 mois.

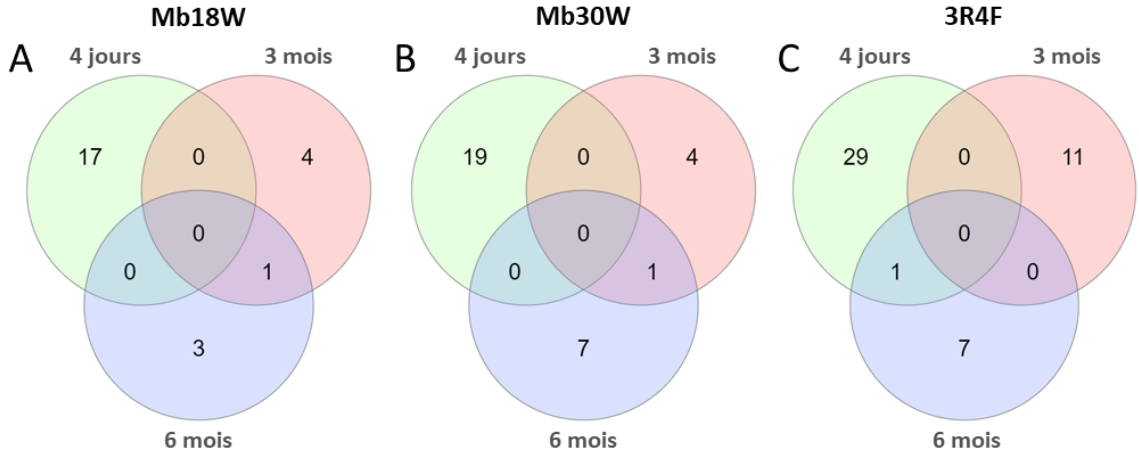


Figure 47. Nombre de miARN dérégulés spécifiques et communs entre les expositions aiguës de 60 minutes, de 3 mois, et de 6 mois de souris BALB/c aux émissions de (A) Mb18W, (B) Mb30W, (C) 3R4F.

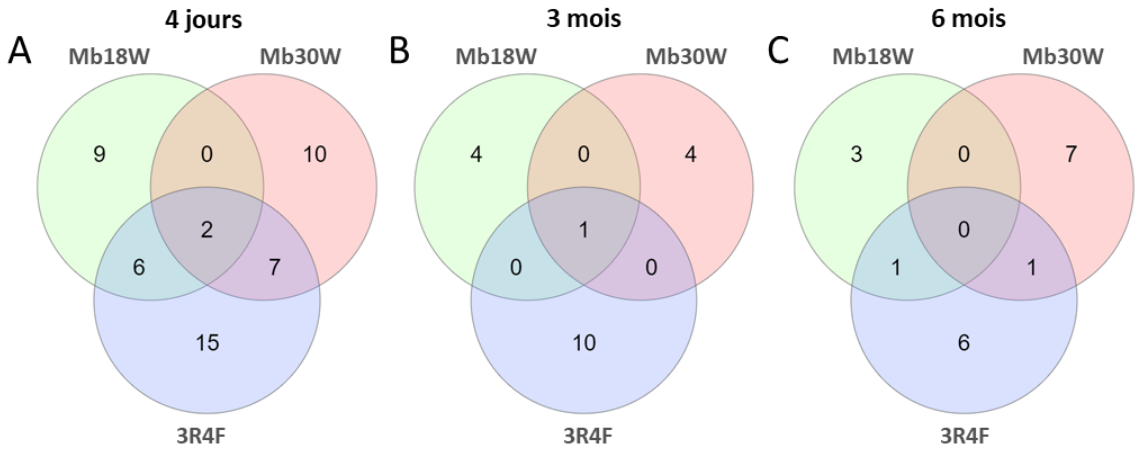


Figure 48. Nombre de miARN dérégulés spécifiques et communs entre les dispositifs (A) Mb18W, (B) Mb30W et (C) 3R4F suite aux expositions de souris BALB/c pendant 4 jours, 3 mois ou 6 mois.

3.3. Analyses transcriptomiques

Avec pour objectif de mieux comprendre et de comparer les mécanismes et les voies de signalisation dérégulés par les expositions aux deux modèles d'e-cig ou à la cigarette, le profil d'expression global des ARNm pulmonaires des souris a été analysé à l'aide de microarrays. Cette technique permet d'effectuer une analyse pangénomique et sans à priori des modifications transcriptomiques pulmonaires potentiellement induites par les différentes expositions. Les dérégulations transcriptomiques ont été considérées significatives pour les différentiels d'expression d'un facteur 1,5 avec un $p<0,05$.

3.3.1. Expositions aiguës

Le nombre de gènes dérégulés pour chaque exposition est rapporté dans la Figure 49. Avec les critères choisis, aucun gène n'a été dérégulé après les expositions à la Mb18W aux temps 30 et 90 minutes et seulement 2 gènes l'ont été à 60 minutes. En revanche, le transcriptome a été plus impacté par les expositions à la Mb30W : 40 gènes (33 surexprimés et 7 sous-exprimés) ont été dérégulés à 30 minutes, 42 gènes (23 surexprimés et 19 sous-exprimés) à 60 minutes et 132 gènes (31 surexprimés et 101 sous-exprimés) à 90 minutes. C'est après l'exposition à la fumée de cigarette pendant 60

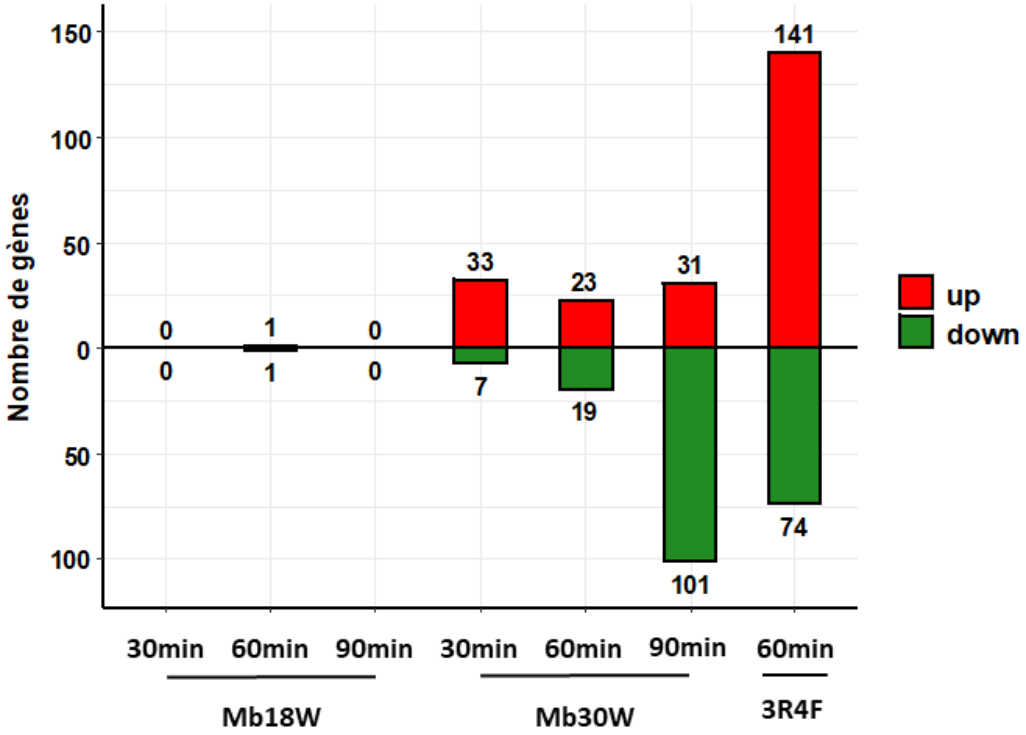


Figure 49. Nombre de gènes dérégulés au niveau pulmonaire après des expositions 30, 60 ou 90 minutes par jour pendant 4 jours aux émissions d'e-cig (Mb18W ou Mb30W) et à la fumée de cigarette par rapport aux souris contrôles non exposées. Les gènes ont été considérés dérégulés quand leur différentiel d'expression était d'au moins 1,5 ($p<0,05$). Les histogrammes en rouge représentent les gènes surexprimés et les histogrammes en vert représentent les gènes sous-exprimés dans chaque groupe.

minutes que l'expression des gènes pulmonaires a été la plus altérée avec 215 gènes dérégulés (141 surexprimés et 74 sous-exprimés).

La Figure 50 montre l'ensemble des gènes dérégulés dans au moins une des conditions et regroupe les dispositifs en fonction du profil d'expression de ces gènes. Cette représentation illustre que la cigarette 3R4F, la Mb18W et la Mb30W ont des profils d'expression suffisamment différents pour ne pas former un cluster entre elles. En effet, pour chaque e-cig, les 3 temps (30, 60 et 90 min) sont strictement regroupés par modèle (Mb18W ou Mb30W). De plus, au sein de ces clusters, les expositions de 30 et 60 minutes se différencient des expositions de 90 minutes pour les deux e-cig.

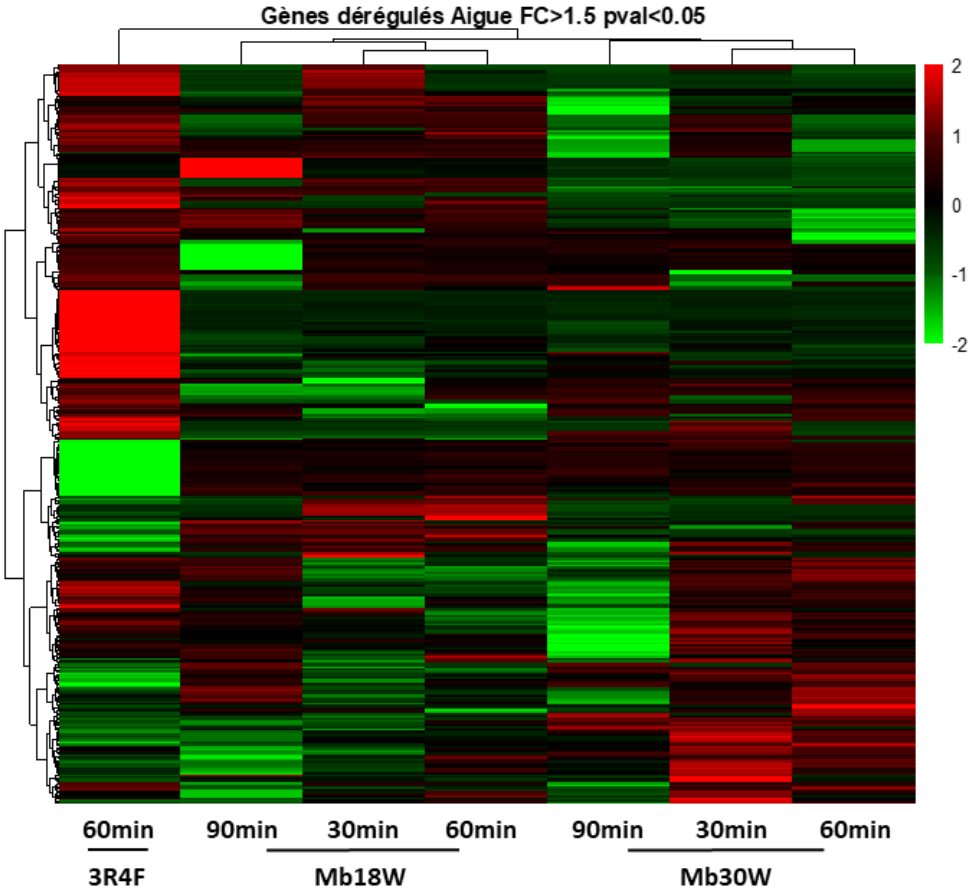


Figure 50. Heatmap des gènes dérégulés dans au moins une des conditions. Les gènes représentés en rouge sont les gènes surexprimés et ceux représentés en vert sont sous-exprimés.

Les diagrammes de Venn présentés dans la Figure 51 rapportent les gènes communs et spécifiques entre les différentes expositions. Ces données mettent en évidence que la majeure partie des gènes dérégulés après une exposition aiguë de 30 minutes à la Mb30W est retrouvée après une exposition de 60 minutes (19 sur-exprimés et 7 sous-exprimés). De plus, une grande partie des gènes dérégulés à 60 minutes sont également dérégulés après une exposition de 90 minutes (13 sur-exprimés et 6 sous-exprimés). Mais la majorité des gènes dérégulés après 90 minutes d'exposition sont spécifiques à cette condition (12 sur-exprimés et 82 sous-exprimés). Enfin, la majorité des gènes dérégulés par les expositions à la cigarette sont spécifiques à cette condition (136 sur-exprimés et 61 sous-exprimés).

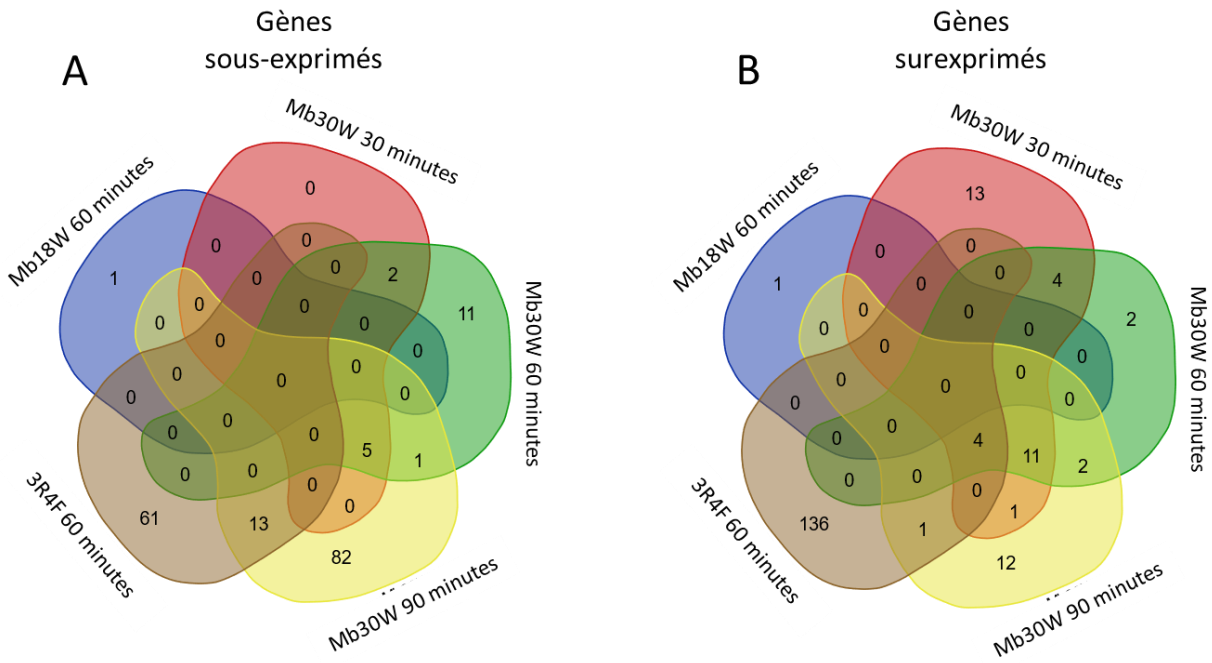


Figure 51. Diagrammes de Venn présentant les gènes dérégulés communs et spécifiques sous-exprimés (A) et surexprimés (B) entre les différentes conditions des expositions aiguës.

3.3.2. Expositions chroniques de 3 et 6 mois

Pour les expositions de 3 mois et 6 mois le nombre de gènes significativement dérégulés est rapporté dans la Figure 52. Contrairement à ce qui a été observé lors des expositions aiguës, les expositions chroniques aux émissions de Mb18W ont induit plus de dérégulations que celles aux émissions de Mb30W. De plus, alors qu'un plus grand nombre de gènes dérégulés a été observé à 6 mois par rapport à 3 mois avec la Mb18W,

l'inverse a été observé avec la Mb30W. En effet, avec les critères statistiques utilisés, les émissions de Mb18W ont induit la dérégulation de 197 (121 surexprimés et 76 sous-exprimés) et 431 gènes (388 surexprimés et 43 sous-exprimés) après 3 mois ou 6 mois d'exposition, respectivement, alors que les émissions de Mb30W ont induit la dérégulation de 72 (50 surexprimés et 22 sous-exprimés) et 40 gènes (12 surexprimés et 28 sous-exprimés) pour ces mêmes temps d'exposition. Comme lors des expositions aiguës, ce sont les expositions chroniques à la fumée de cigarette qui ont induit le plus grand nombre de gènes dérégulés : 248 gènes (186 surexprimés et 62 sous-exprimés) après 3 mois et 615 gènes (336 surexprimés et 279 sous-exprimés) après 6 mois. Globalement, les expositions ont induit plus de surexpression de gènes que de sous-expression.

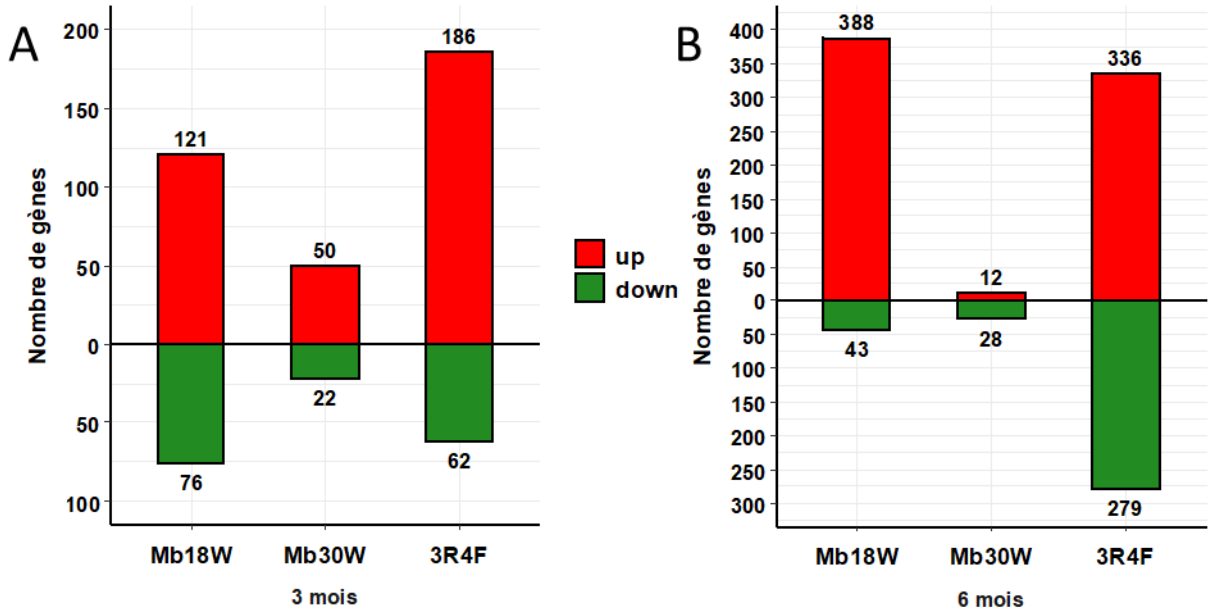


Figure 52. Nombre de gènes dérégulés au niveau pulmonaire après des expositions de 60 minutes, 5 jours/semaine pendant (A) 3 mois ou (B) 6 mois aux émissions d'e-cig ou à la fumée de cigarette par rapport aux souris contrôles non exposées. Les gènes ont été considérés dérégulés quand leur différentiel d'expression était d'au moins 1,5 (p<0,05). Les histogrammes en rouge représentent les gènes surexprimés et les histogrammes en vert représentent les gènes sous-exprimés dans chaque groupe.

Les diagrammes de Venn représentés dans la Figure 53 permettent de montrer le nombre de gènes dérégulés communs entre les expositions aiguës, de 3 mois et de 6 mois pour les différents dispositifs testés (60 min d'expositions/jour). Les résultats révèlent

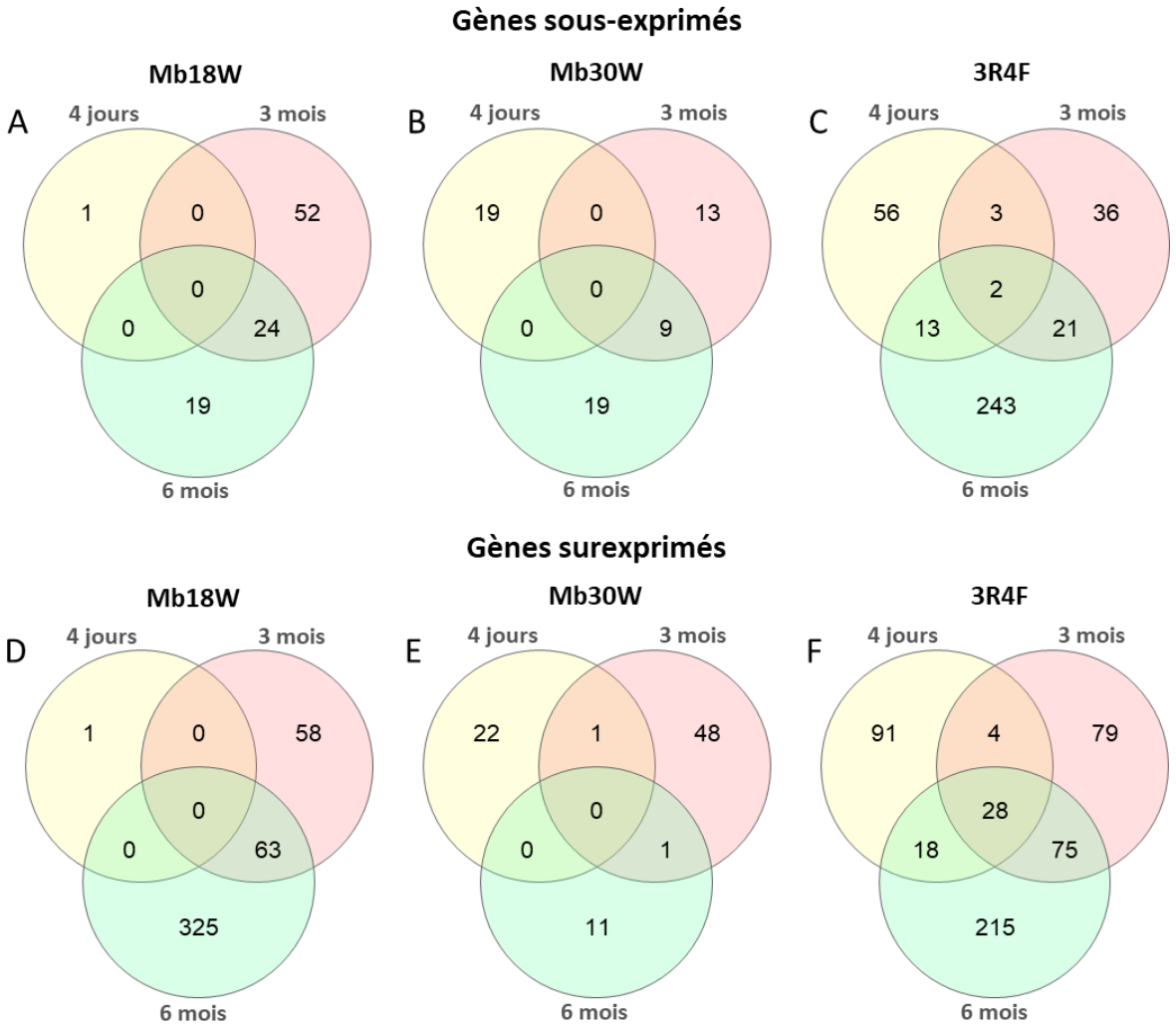


Figure 53. Diagrammes de Venn rapportant les gènes sous-exprimés (A, B et C) ou surexprimés (D , E et F) spécifiques et communs entre les expositions aiguës, de 3 mois et de 6 mois à la Mb18W (A et D), à la Mb30W (B et E) et à la cigarette 3R4F (C et F).

qu'il n'y a qu'un seul gène commun dérégulé entre les expositions aiguës et sub-chroniques : il s'agit d'un gène surexprimé à la fois après une exposition aiguë et de 3 mois à la Mb30W. Par contre, entre les expositions de 3 mois et de 6 mois le nombre de gènes communs est plus importants. En effet, 24 gènes sous-exprimés et 63 surexprimés sont communs entre les expositions de 3 mois et 6 mois à la Mb18W, ce qui représente près de la moitié (44 %) de la totalité des gènes dérégulés à 3 mois, mais seulement 20 % des gènes dérégulés à 6 mois. Pour la Mb30W, seulement 10 gènes (9 sous-exprimés et 1 surexprimé) sont communs entre les expositions de 3 mois et de 6 mois. Concernant les expositions à la fumée de cigarette, un plus grand nombre de gènes sont communs entre les différentes expositions. En effet, 30 gènes dérégulés sont communs aux 3 protocoles d'exposition et 126 sont communs entre les expositions de 3 mois et de 6 mois. Cinquante et un % des gènes dérégulés après des expositions de 3 mois à la cigarette sont aussi

retrouvés dérégulés après 6 mois, ce qui représente 38 % des gènes dérégulés dans cette dernière condition.

La Figure 54 permet de rapporter le nombre de gènes dérégulés communs et spécifiques entre les différents dispositifs testés après les expositions de 3 mois et de 6 mois. Elle montre qu'après 3 mois, 25 gènes (12 surexprimés et 13 sous-exprimés) sont dérégulés communément par toutes les émissions, et que 23 gènes (10 surexprimés et 13 sous-exprimés) le sont après 6 mois. Cependant, ces gènes dérégulés de manière commune ne sont pas les mêmes à 3 mois et à 6 mois. La Figure 54 montre également qu'après 3 mois d'exposition, 22 % des gènes dérégulés (16 gènes sur un total de 72) par les émissions de Mb30W le sont aussi par celles de Mb18W ; après 6 mois d'exposition, ce ratio atteint 28 % (11 sur 40). Certains gènes dérégulés par les émissions de Mb18W sont communs avec ceux dérégulés par la fumée de cigarette : 53 gènes (39 surexprimés et 14 sous-exprimés) après 3 mois et 192 (183 surexprimés et 9 sous-exprimés) après 6 mois

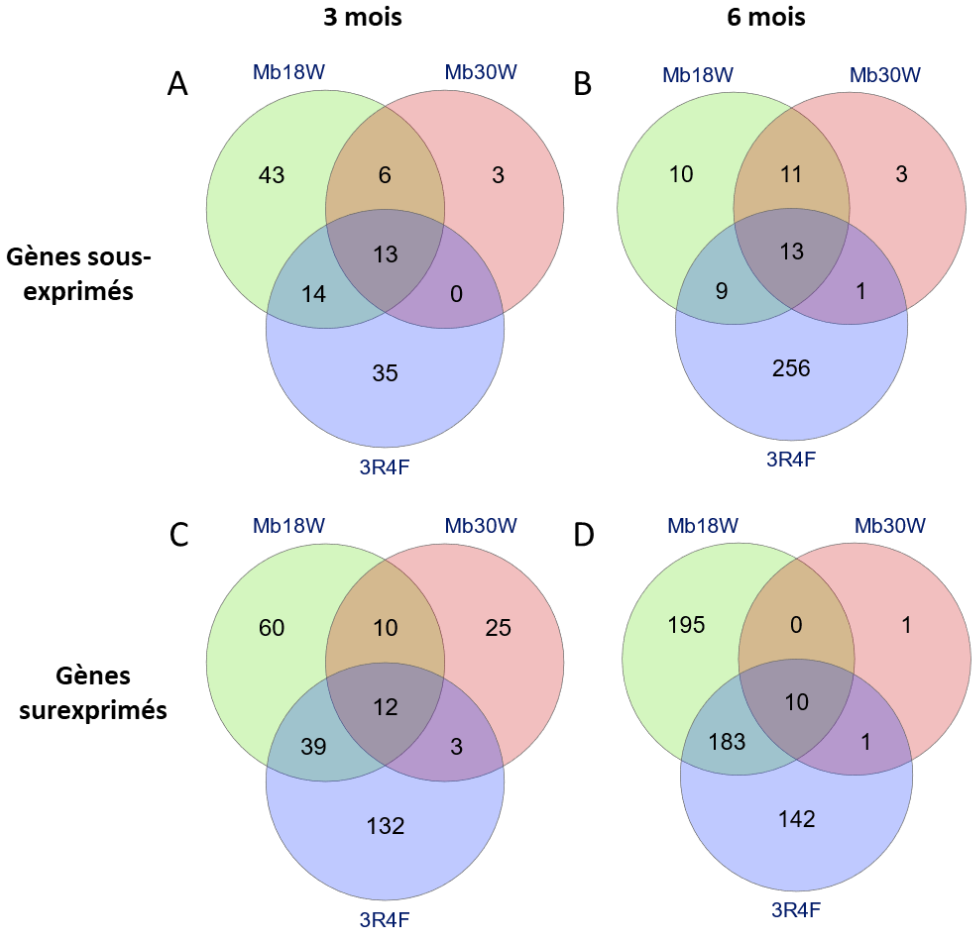


Figure 54. Diagrammes de Venn représentant les gènes sous-exprimés (A et B) et surexprimés (C et D) communs et spécifiques après une exposition de 3 mois (A et C) ou de 6 mois (B et D) entre les dispositifs (Mb18W, la Mb30W et cigarette).

d'exposition. Par ailleurs, 103 gènes (60 surexprimés et 43 sous-exprimés) et 215 gènes (195 surexprimés et 10 sous-exprimés) sont dérégulés après 3 et 6 mois d'exposition à la Mb18W, respectivement. Cependant, c'est avec la fumée de cigarette que le nombre de gènes spécifiquement dérégulés est le plus important avec 167 gènes pour les expositions de 3 mois (132 surexprimés et 35 sous-exprimés) et 398 gènes pour celles de 6 mois (142 surexprimés et 256 sous-exprimés).

3.3.3. Analyses fonctionnelles des gènes dérégulés

Pour aller plus loin dans l'étude des effets toxicologiques des émissions d'e-cig et de de cigarette, une analyse fonctionnelle des gènes dérégulés a été réalisée à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Cet outil permet d'identifier les voies de signalisation les plus impactées en fonction du nombre et de la fonction des gènes dérégulés impliqués dans celles-ci. Cette analyse a été effectuée pour les expositions aiguës de 60 minutes et les expositions chroniques.

Pour les expositions aiguës, 17 voies de signalisation sont apparues significativement dérégulées ($p<0,05$) par les émissions de la Mb30W et 80 voies par la fumée de cigarette. Les expositions aiguës aux émissions de Mb18W, n'ayant modifié significativement que 2 gènes, aucune voie de signalisation n'a été associée. Concernant les expositions de 3 mois, 88 voies de signalisation ont été impactées par les émissions de Mb18W, 26 par celles de la Mb30W et 48 par celles de la cigarette. Enfin, après 6 mois d'exposition, la dérégulation de 26 voies de signalisation a pu être mise en évidence pour la Mb18W, contre 29 voies pour la Mb30W et 55 pour la cigarette. Les Figure 55,Figure 56 etFigure 57 montrent respectivement les 25 voies de signalisation les plus impactées (top 25), classées en fonction de leur significativité, par les expositions aiguës, de 3 mois ou de 6 mois. Les voies ont également été réparties dans des fonctions biologiques plus globales et le nombre de gènes impliqués dans chaque fonction est également rapporté dans ces figures.

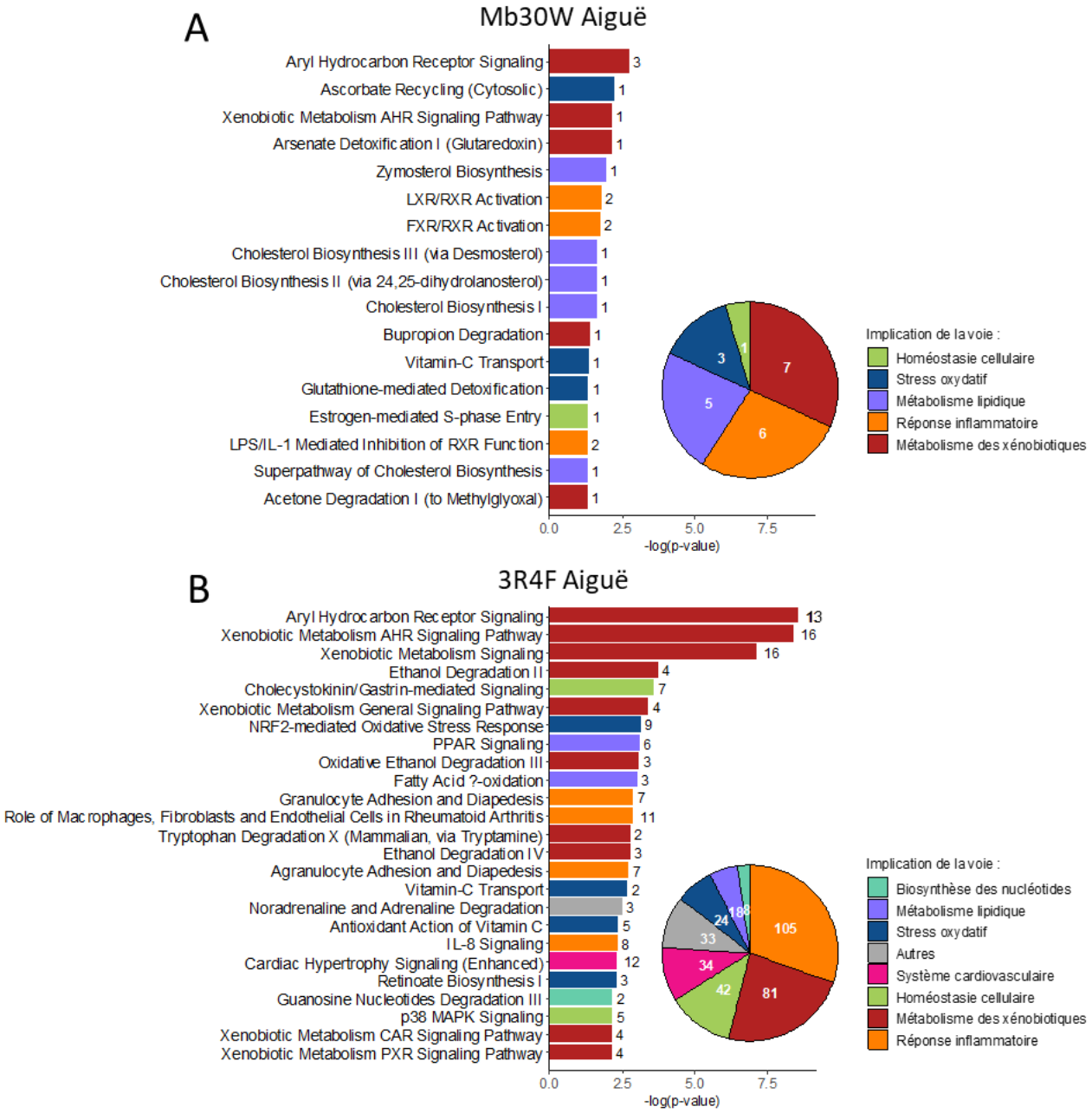


Figure 55. Top 25 des voies de signalisation dérégulées classées en fonction de leur significativité (-log(p-val)) suite aux expositions aiguës aux émissions de (A) Mb30W et (B) 3R4F. Les voies dérégulées ont été classés par fonctions biologiques et les diagrammes circulaires représentent la proportion de gènes dérégulés pour chaque fonction.

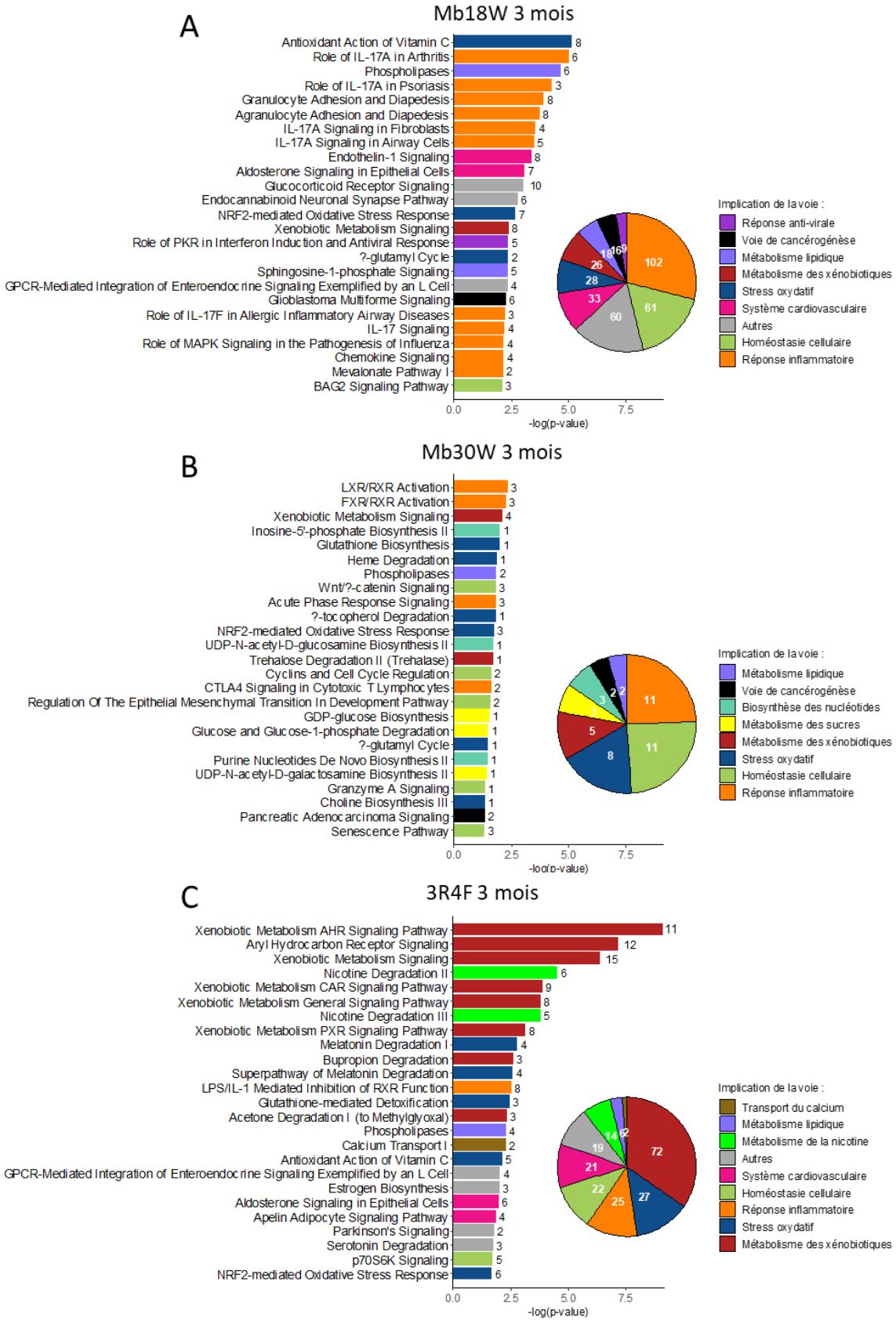


Figure 56. Top 25 des voies de signalisation dérégulées classées en fonction de leur significativité (-log(p-val)) suite aux expositions de 3 mois aux émissions de (A) Mb18W, (B) Mb30W et (C) 3R4F. Les voies dérégulées ont été classés par fonctions biologiques et les diagrammes circulaires représentent la proportion de gènes dérégulés pour chaque fonction.

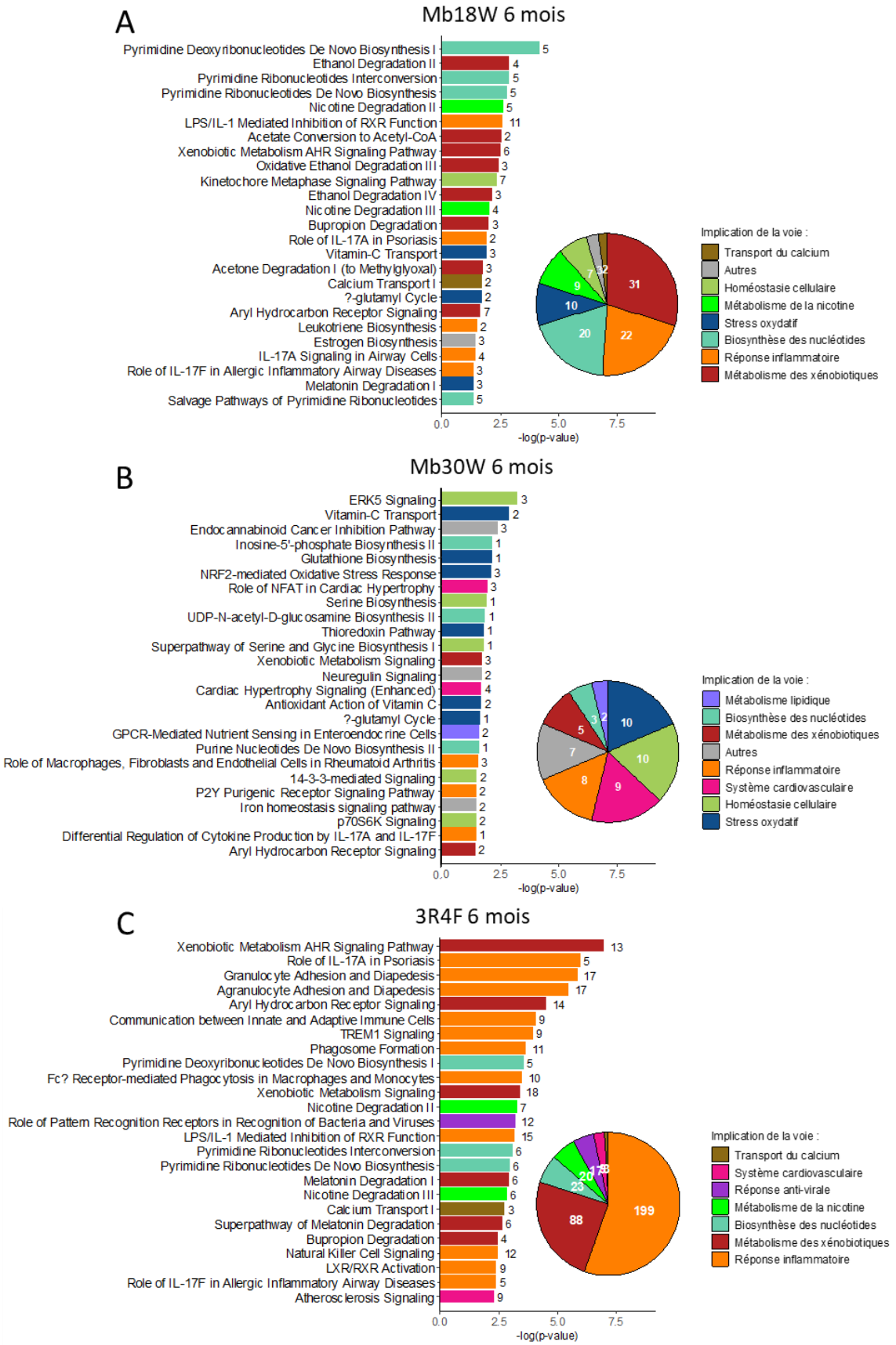


Figure 57. Top 25 des voies de signalisation dérégulées classées en fonction de leur significativité (-log(p-val)) suite aux expositions de 6 mois aux émissions de (A) Mb18W, (B) Mb30W et (C) 3R4F. Les voies dérégulées ont été classés par fonctions biologiques et les diagrammes circulaires représentent la proportion de gènes dérégulés pour chaque fonction.

Pour les expositions aiguës, les résultats montrent que les deux fonctions biologiques les plus affectées sont la réponse inflammatoire et le métabolisme des xénobiotiques en ce qui concerne les émissions de Mb30W et à la fumée de cigarette. Les voies de signalisation dérégulées le sont cependant de manière nettement plus significative pour une exposition à la fumée de cigarette que pour les émissions de Mb30W. De plus, le nombre de gènes dérégulés et impliqués dans les différentes voies est également plus important chez les souris exposées à la cigarette. Par exemple, seulement 6 et 7 gènes sont respectivement dérégulés dans la réponse inflammatoire et le métabolisme des xénobiotiques pour la Mb30W lorsque 105 et 81 gènes le sont pour la cigarette (Figure 55).

Concernant les expositions de 3 mois, les émissions des deux modèles d'e-cig induisent majoritairement une modification de la réponse inflammatoire et de l'homéostasie cellulaire. A noter que pour ces dispositifs, quelques voies impliquées dans le stress oxydant sont également affectées. Pour les expositions à la cigarette, la majorité des voies dérégulées sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, en particulier la biotransformation des HAP, mais certaines mettent également en évidence une réponse inflammatoire, un stress oxydant et une altération de l'homéostasie cellulaire. De par un plus grand nombre de gènes modulés, la significativité des dérégulations des voies de signalisation est plus importante après exposition à la fumée de cigarette qu'après celles aux émissions d'e-cig, et légèrement plus élevée après expositions à celles de Mb18W qu'après expositions à celles de Mb30W (Figure 56).

Après 6 mois d'exposition, la fonction la plus impactée par la fumée de cigarette est la réponse inflammatoire avec 199 gènes dérégulés contre 22 et 8 gènes modulés pour la Mb18W et la Mb30W, respectivement. De la même façon, la seconde fonction la plus affectée par la fumée de cigarette est le métabolisme des xénobiotiques avec 88 gènes impliqués alors que 31 gènes sont impliqués dans le cas des expositions à la Mb18W et 5 gènes pour la Mb30W. La tendance observée après les expositions aiguës et de 3 mois se constate également après 6 mois : les voies de signalisation sont plus significativement dérégulées et impliquent plus de gènes après exposition à la fumée de cigarette (Figure 57).

3.4. Discussion

Les expositions des animaux ont été réalisées strictement par voie nasale selon la méthode « nose-only ». Ce protocole permet de réduire les effets systémiques de la nicotine et des autres substances présentes dans les émissions qui pourraient pénétrer par voie cutanée dans le cas de l'utilisation de chambres d'exposition « corps entier » (Oyabu *et al.*, 2016). De plus, la méthode « nose-only » permet un contrôle plus précis de l'atmosphère dans laquelle les animaux respirent et évite que l'air expiré par une souris n'influe sur les autres (Pauluhn and Thiel, 2007). La limite de ces expositions par voie nasale est qu'elles nécessitent la contention des animaux, ce qui peut être la source d'un stress non négligeable.

Comme pour les expositions *in vitro*, il n'existe pas à l'heure actuelle de profil de bouffée standardisé pour l'évaluation de l'impact de l'e-cig sur les animaux. Le choix du profil de bouffée s'est alors porté sur le même profil que celui adopté lors de la caractérisation chimique et de l'étude *in vitro* : le profil HCI. La connaissance des différents paramètres étudiés (températures, quantité de composés carbonylés et de HAP) nous permet d'affirmer que les émissions ne sont pas générées dans des conditions extrêmes mais qu'elles correspondent plutôt à des conditions réalistes. Cependant, la machine à fumer utilisée pour les expériences *in vivo* comporte une chambre de condensation et dilue les aérosols pour les délivrer aux vingt-quatre souris simultanément. Ces différences, bien que n'affectant pas la génération des aérosols, pourraient impacter la quantité finale de produits toxiques délivrée aux animaux. Pour pallier à cela, le dosage plasmatique de la cotinine, un métabolite de la nicotine, pourra être réalisé et nous permettra de rapporter la quantité de nicotine que les souris ont inhalée et de mieux contrôler les niveaux d'exposition aux différents dispositifs.

Il est aujourd'hui admis que la fumée de cigarette comporte un grand nombre de composés cancérogènes. Certains de ces composés peuvent produire des adduits et des lésions de l'ADN, qui constituent des étapes importantes dans le processus de cancérogénèse. Le stress oxydant est un phénomène qui peut être induit par ces composés et mener à l'oxydation de bases nucléotidiques puis à des cassures de l'ADN. Durant notre étude, nous avons pu mesurer une augmentation de la concentration pulmonaire en 8-OHdG, un marqueur de lésions oxydatives de l'ADN, chez les souris exposées de manière aiguë ou chronique à la fumée de cigarette ou aux émissions de Mb30W. Ces résultats

témoignent que l'e-cig, réglée à forte puissance est, comme la cigarette, capable de générer un stress oxydant au niveau pulmonaire chez la souris. Ce stress est induit rapidement dès 4 jours d'exposition et se maintient dans les expositions chroniques de 3 et 6 mois. Cette augmentation du stress oxydant a déjà été mise en évidence *in vivo* dans la littérature mais une seule étude prend également en compte le réglage de la puissance de l'e-cig (Cirillo *et al.*, 2019). Ainsi, dans des poumons de rats, Cirillo et al. montrent que les émissions d'e-cig réglées à 40 W augmente la production de ERO par rapport aux e-cig réglées à 8 W. La capacité d'induction du stress oxydant de l'e-cig pourrait dépendre de la composition des émissions en composés carbonylés. En effet, nos données de caractérisation chimique ont démontré que l'e-cig réglée à forte puissance émet deux fois plus de composés carbonylés que celle réglée à faible puissance. Bien que les deux paramètres puissent être corrélés, les composés carbonylés ne sont pas les seuls constituants des émissions d'e-cig impliqués dans le stress oxydant et d'autres composés non mesurés, pourraient également jouer un rôle.

L'oxydation des guanosines peut mener à des cassures simple et double brin de l'ADN et peut être corrélée avec le taux de mutagénicité dans les cellules de mammifères (Cooke *et al.*, 2003). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord réalisé des tests des comètes au niveau pulmonaire et hépatique. Étonnamment, les résultats obtenus lors des expositions aiguës et de 3 mois ont été négatifs pour les expositions à l'e-cig et à la cigarette. En effet, de nombreuses études des années 1990 montrent que la cigarette peut induire des cassures des brins d'ADN sur des lignées cellulaires, des cellules primaires et *in vivo* chez des rongeurs (DeMarini, 2004). Pour les expositions de 6 mois, les tests des comètes ont alors été complétés par l'utilisation de l'enzyme hOgg1 qui clive spécifiquement l'ADN au niveau des lésions oxydatives. Avec ce test des comètes hOgg1+, nous avons pu mettre en évidence des fragments d'ADN chez les souris exposées pendant 6 mois aux émissions de cigarette classique, ou d'e-cig Mb30W. Ces données confirment l'existence de lésions oxydatives de l'ADN chez ces souris. Ces lésions, probablement consécutives à un stress oxydant, pourraient être les premières étapes d'un processus de pathogénicité des émissions d'e-cig si elles ne sont pas réparées. Cependant, dans notre étude, les aérosols d'e-cig et de cigarette n'ont induit ni aberrations chromosomiques (micronoyaux), ni mutagénicité (*Pig-A*) chez des souris exposées jusqu'à 6 mois. Dalrymple *et al.* montrent, contrairement à nos résultats, que des expositions à la fumée de cigarette peuvent induire des cassures de l'ADN dès 3 semaines d'exposition (1h/jour

et 5 fois/semaine) chez des rats, par contre, en concordance avec nos résultats, ils ne retrouvent aucune augmentation significative du nombre de mutations du gène *Pig-A* et du nombre de micronoyaux après 6 semaines d'exposition (Dalrymple *et al.*, 2016). D'autres résultats confirment l'absence de micronoyaux suite à des expositions de rongeurs à la cigarette (Miert *et al.*, 2008; Schramke *et al.*, 2014). Il a été montré que les mécanismes de réparation de l'ADN se mettent rapidement en place au niveau pulmonaire à la suite d'une exposition à la cigarette et que des cassures simple brin pouvaient être réparées dès 60 minutes après la dernière exposition (Tsuda *et al.*, 2000). Ces données pourraient alors expliquer les résultats négatifs observés pour les différents tests de mutagénicité. Les mécanismes cellulaires de réparation mis en place seraient suffisants dans le cadre de nos conditions d'exposition pour empêcher que les lésions oxydatives de l'ADN observées perdurent. Cependant, il faut rappeler que les tests des micronoyaux et du *Pig-A* ont été respectivement réalisés sur des prélèvements de moelle osseuse et de sang. Ils ne reflètent donc pas directement les effets des émissions sur le poumon. Deux études de génotoxicité ont déjà été réalisées suite à des expositions de rongeurs aux émissions d'e-cig (Canistro et al., 2017; Lee et al., 2017). La première met en évidence des lésions primaires de l'ADN au niveau systémique et des micronoyaux sur les réticulocytes ; la deuxième recense la présence d'adduits issus des aldéhydes et des nitrosamines. Cependant, ces deux études se placent dans des conditions d'exposition plus intenses que les nôtres (11 cycles de 2 x 6 secondes de bouffée, 5 fois/semaine pendant 4 semaines pour la première et des expositions de 3h/jour, 5 fois/semaine, pendant 3 semaines pour la deuxième). Il serait cependant intéressant de mesurer d'autres adduits de l'ADN, comme ceux retrouvés par Lee et al. (1,N^2-propano-désoxyGuanosine) pour vérifier s'ils sont également retrouvés avec nos conditions d'exposition. Les mécanismes de réparation de l'ADN les plus représentés dans les tissus pulmonaires de souris sont la réparation par excision de nucléotides et par excision de base (David *et al.*, 2007). Les activités de protéines réparatrices de l'ADN impliquées respectivement dans ces mécanismes, XPC (*Xeroderma pigmentosum complementation group C*) et OGG1/2 (*8-Oxoguanine glycosylase*) (Radicella *et al.*, 1997; Sugasawa *et al.*, 1998) pourraient être de bons indicateurs supplémentaires pour évaluer l'effet génotoxique des émissions d'e-cig.

En plus des modifications directes du génome, la fumée de cigarette peut aussi être responsable d'altérations de mécanismes épigénétiques (Kopa and Pawliczak, 2018; Zong

et al., 2019). En effet, de nombreuses études ont démontré l'existence de modifications épigénétiques chez les fumeurs réguliers. Ces modifications sont impliquées dans la dérégulation de l'expression génique menant aux processus de pathogénicité de la cigarette. Dans un premier temps, l'étude de la méthylation globale de l'ADN a été effectuée dans les poumons des souris exposées pendant 3 ou 6 mois aux émissions d'e-cig (Mb18W et Mb30W), ou de cigarette. Alors qu'aucune modification n'a été observé après 3 mois d'exposition, une légèrement augmentation de la méthylation globale de l'ADN d'environ 30 % a pu être mise en évidence après 6 mois d'exposition aux émissions des deux modèles d'e-cig et à la cigarette, sans différence entre les différents dispositifs. Dans la littérature, les études sur la fumée de cigarette rapportent plutôt une hypométhylation globale de l'ADN chez l'Homme (Freudenheim *et al.*, 2019). Cependant, la plupart des études sont menées sur les cellules sanguines pour faciliter les prélèvements et témoignent plutôt des effets systémiques. L'état de méthylation de l'ADN pourrait alors être différent au niveau pulmonaire. De plus, les individus inclus dans ces études sont souvent des fumeurs réguliers de plus de 50 ans, exposés donc à plus long terme que nos animaux. Une étude de 8 semaines sur des souris exposées pendant 3h/jour à la fumée de cigarette a quantifié les régions où la méthylation de l'ADN est altérée. Elle montre que certaines régions sont hyperméthylées, mais globalement, elle met en évidence un plus grand nombre de régions pour lesquelles la méthylation est diminuée (Phillips and Goodman, 2009). La fumée de cigarette influe sur l'état de méthylation par le biais des dommages à l'ADN qu'elle peut induire. En effet, lors de lésions de l'ADN, des mécanismes de réparation se mettent en place et la DNMT1 est recrutée au niveau du site endommagé (Jin and Robertson, 2013). L'activation de cette enzyme induit alors une hyperméthylation des ilots CpG qui vise à inhiber le gène endommagé pendant la phase de réparation (Cuozzo *et al.*, 2007; Mortusewicz *et al.*, 2005). Les résultats issus de nos travaux pourraient alors témoigner de mécanismes de réparation de l'ADN en réponse aux lésions provoquées par les composés chimiques toxiques présents dans les émissions. D'après les données de nos analyses transcriptomiques, l'expression du gène de *DNMT1* n'est pas modifiée mais il serait alors intéressant de mesurer directement l'activité enzymatique au niveau pulmonaire des souris exposées. De plus, il serait pertinent d'analyser la méthylation spécifique de certains gènes impliqués dans les mécanismes de toxicité et de cancérogénèse (oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs) induits par la fumée de cigarette tels que *CDKN2A*

(Palmisano *et al.*, 2000), *p53* et *KRAS* (Gao *et al.*, 2017) afin de vérifier s'ils sont également modifiés par les émissions d'e-cig.

La structure de la chromatine, médiée par les histones, joue également un rôle important dans la régulation de l'expression génique en contrôlant l'accessibilité des sites promoteurs de gènes notamment. Quelques études mettent en évidence des modifications des histones, et ainsi de la structure de la chromatine, suite à des expositions à la fumée de cigarette, mais le lien direct avec les pathologies respiratoires n'est pas encore clairement défini (Sundar and Rahman, 2016). Aucune étude ne s'est encore intéressée à ce paramètre dans le contexte d'expositions aux émissions d'e-cig. Il a déjà été montré que des expositions aiguës à la fumée de cigarette chez des souris induisaient une augmentation de l'expression de HDAC, de HAT et de phosphorylases, alors que des expositions chroniques induisaient une diminution de l'expression de ces enzymes (Yao and Rahman, 2011). Les données que nous avons obtenues dans notre étude ne montrent pas de modifications de l'activité des enzymes responsables de l'acétylation (HAT) et de la désacétylation des histones (HDAC) dans les poumons des souris exposées pendant 3 mois et 6 mois aux émissions d'e-cig ou de cigarette. Ces résultats diffèrent de ce qui est retrouvé dans la littérature sur le sujet. Ceci pourrait être expliqué par plusieurs raisons. D'une part, il existe plusieurs classes de HDAC. La méthode que nous avons utilisée ne permet de détecter que celles de classe I, IIB et IV, connues pour être sensibles à la fumée de cigarette (Zong *et al.*, 2019), et non celles de classe IIA et III qui peuvent également être modulées par la réponse à la fumée de cigarette, comme la Sirtuin-1 (SIRT1) par exemple, qui a été montrée dérégulée suite à une exposition *in vitro* et *in vivo* à la fumée de cigarette (Conti *et al.*, 2018; Pace *et al.*, 2016; Ting *et al.*, 2016). Il serait alors peut-être intéressant de mesurer également ces dernières classes d'HDAC. D'autre part, bien que le ratio des activités HAT/HDAC, qui est un indicateur de la modification de l'état d'acétylation des histones, ne soit pas modifié dans nos conditions expérimentales, certaines modifications spécifiques sur les histones H3 et H4 pourraient exister. Nous avons tenté d'analyser directement des modifications spécifiques d'histones connues pour être affectées par l'exposition à la fumée de cigarette (H3K9ac, H3S10ph, H3K9me, H3K27me et H3K4me). Les méthodes utilisées n'ont cependant pas permis l'obtention de résultats interprétables.

Les miARN contribuent également aux mécanismes épigénétiques, cette fois-ci post-transcriptionnels, en jouant un rôle central dans la régulation négative de l'expression

génique. Ce sont de petits ARN non codants capables de s'apparier sur des ARNm cibles et d'empêcher leur traduction. Même si la fonction précise de la majorité d'entre eux, c'est-à-dire l'identité de toutes leurs cibles, reste à définir, les miARN sont reconnus pour être impliqués dans la majorité des processus biologiques et/ou pathologiques. La méthode des OpenArrays que nous avons utilisée nous a permis d'analyser l'expression pulmonaire de 754 miARN. Ce sont les expositions aiguës qui ont induit le plus de dérégulations de miARN. Cependant, aucun de ces miARN n'a été retrouvé dérégulé après les expositions chroniques. Cela pourrait témoigner de mécanismes initiaux de réponse aux émissions d'e-cig et de cigarette mais auxquels l'organisme des souris se serait par la suite adapté. C'est pourquoi nos premières analyses bioinformatiques se sont d'abord focalisées sur les miARN dérégulés après 3 mois et 6 mois d'exposition. En effet, ces dérégulations pourraient être de meilleurs marqueurs d'effets à long terme sur les animaux. A ce jour, trois études ont analysé l'expression du mirnome suite à des expositions à l'e-cig. Une étude sur des cellules primaires d'épithélium bronchique humain exposées à des extraits d'aérosols d'e-cig pendant 48 h a validé la dérégulation de 8 miARN, mais aucun n'est en commun avec nos résultats (Solleti *et al.*, 2017). Deux autres études ont été réalisées chez l'Homme au niveau systémique : la première n'a détecté aucune modification chez des individus ayant vapoté pendant 4 semaines (Song *et al.*, 2020), et la deuxième réalisée sur des utilisateurs réguliers d'e-cig ou de cigarette met en évidence 17 miARN dérégulés avec l'e-cig et 24 avec la cigarette, mais aucun de ces miARN n'est en commun avec ceux que nous avons mis en évidence (Singh *et al.*, 2020).

La validation fonctionnelle des miARN dérégulés n'a pas été réalisé au cours de ces travaux de thèse mais elle sera abordée au laboratoire lorsque des miARN candidats auront été sélectionnés. Cependant, des analyses bio-informatiques préliminaires permettent d'avoir une première vision de leur implication. Pour initier ces analyses, nous nous sommes intéressés aux miARN dérégulés à la fois par les émissions d'e-cig et de cigarette. Deux premiers miARN ont alors attiré notre attention. Le miR-189 est sous-exprimé après expositions de 3 mois aux émisisons d'e-cig ou à la fumée de cigarette. Il est alors peut-être témoin d'une réponse induite par les deux types d'émissions. Cependant, le miR-189 n'a pas encore de fonction décrite dans la littérature. Ainsi, l'étude plus approfondie de la fonction de ce miARN pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de réponse commun entre l'e-cig et la cigarette et d'évaluer le rôle de ce miARN dans leur potentielle toxicité à long terme. Le miR-223, quant à lui, est dérégulé à

la fois par les expositions de 3 et 6 mois aux émissions de Mb30W et par les expositions de 6 mois à la fumée de cigarette. De façon intéressante, il est surexprimé après expositions à la Mb30W mais sous-exprimé après expositions à la cigarette. Ce miARN a déjà été mesuré surexprimé chez la souris, mais suite à des expositions de seulement 3 semaines à la cigarette (Leuenberger *et al.*, 2016). Il est décrit comme suppresseur de tumeur dans le cadre du cancer du poumon. La sous-expression de miR-223 favoriserait la tumorigenèse et serait médiée par p53 tandis que la surexpression inhiberait la prolifération cellulaire (Luo *et al.*, 2019). Ce miARN serait, dans un premier temps, protecteur face aux agressions des produits toxiques contenus dans la cigarette, puis après des expositions de 6 mois à la cigarette, sa sous-expression pourrait alors favoriser l'apparition de tumeur. La surexpression observée suite aux expositions aux émissions de Mb30W pourrait alors indiquer que le tissu pulmonaire se défend contre des agressions chimiques, même après 6 mois.

Afin de préciser ou d'identifier la fonction des miARN dont l'expression pulmonaire a été modifiée par l'exposition aux émissions d'e-cig et de cigarette, il est, dans un premier temps, possible d'utiliser des algorithmes de prédiction de cibles tels que TargetScan et miRDB. Ces algorithmes se basent sur des données de complémentarité de séquence et thermodynamiques afin de prédire une interaction et sa stabilité entre de potentiels ARNm cibles et un miARN (Min and Yoon, 2010). En croisant les listes prédictives d'ARNm cibles générées pour chaque miARN dérégulé et celles des gènes effectivement sous- et sur-exprimés recensées par nos analyses transcriptomiques, certains miARN ont retenu notre attention. Le gène *slc7a11,* sous-exprimé suite aux expositions chronique aux émissions de Mb18W, est par exemple retrouvé comme cible possible de 3 miARN dérégulés : le miR-375 surexprimé suite aux expositions de 6 mois aux émissions de Mb18W et de cigarette et les miR-764-5p et -448 surexprimés après expositions de 6 mois à la fumée de cigarette. Le gène *slc7a11* code pour une protéine qui est impliquée dans le transport de la cystéine, un acide aminé précurseur dans la biosynthèse du glutathion, et qui joue ainsi un rôle dans l'équilibre redox intracellulaire (Koppula *et al.*, 2018). La surexpression des miR-375, miR-764-5p et miR-448 pourrait être responsable de la diminution d'expression de *slc7a11* et modifier ainsi la réponse au stress oxydant induite par les expositions aux différents dispositifs. La dérégulation de miR-375 semble d'autant plus intéressante que ce miARN, connu pour jouer un rôle dans un grand nombre de fonctions biologiques, est surtout décrit comme étant protecteur contre la tumorigenèse

dans de nombreux types de cancer (Yan *et al.*, 2014). La surexpression de miR-375 observée suite à nos expositions correspond peut-être à un phénomène compensatoire face aux processus biologiques potentiellement dérégulés par les émissions des différents dispositifs (Yan *et al.*, 2014). Cette approche méthodologique visant à identifier la fonction des miARN et leur rôle dans la réponse aux effets respectivement induits par les aérosols d'e-cig et la fumée de cigarette sera appliquée à l'ensemble des miARN spécifiquement dérégulés par ces émissions. La validation fonctionnelle des miARN candidats sélectionnés sur la base des analyses bio-informatiques sera assurée par transfections des pré- ou anti-miARN correspondants dans des modèles de cellules pulmonaires, puis par analyses transcriptomiques.

Dans l'objectif d'apporter de nouvelles données mécanistiques concernant les effets des émissions d'e-cig, une analyse transcriptomique pangénomique a été effectuée au niveau pulmonaire sur les souris exposées. Cette méthode permet d'analyser sans à priori les dérégulations induites par les deux modèles d'e-cig d'une part, mais aussi de les comparer à celles induites par la fumée de cigarette d'autre part. Les résultats obtenus lors des expositions aiguës montrent que l'e-cig réglée à forte puissance induit la dérégulation de plus de gènes que celle réglée à faible puissance, mais moins que la cigarette classique. De façon intéressante, les altérations transcriptomiques semblent suivre un effet dose-réponse pour la Mb30W, avec les expositions de 90 minutes qui induisent la dérégulation d'un plus grand nombre d'ARNm que celles de 60 et 30 minutes. Après 3 mois et 6 mois d'exposition, la tendance entre les deux modèles d'e-cig s'inverse puisque c'est la Mb18W qui induit le plus grand nombre de gènes dérégulés par rapport à la Mb30W. C'est la première fois qu'une telle différence est mise en évidence mais l'analyse de nos résultats ne nous permet pas de l'expliquer clairement. Ces résultats sont peut-être représentatifs de mécanismes mis en place plus précocement suite aux expositions à l'e-cig de plus forte puissance. Les concentrations en composés toxiques plus élevées dans les émissions de Mb30W par rapport à celles du modèle Mb18W auraient pu induire des mécanismes d'adaptation plus rapidement après les expositions. Il pourrait donc être intéressant d'exposer des souris à des temps intermédiaires (1 mois par exemple) pour examiner la cinétique des altérations transcriptomiques induites par les émisisons d'e-cig. En revanche, c'est toujours la cigarette qui provoque le plus de dérégulations en comparaison aux deux modèles d'e-cig. Cette différence entre cigarette et e-cig a déjà été mise en évidence dans la littérature, notamment au laboratoire sur des

cellules BEAS-2B (Anthérieu *et al.*, 2017), mais aussi sur un modèle *in vivo* de souris C57BL/6 exposé pendant 3 semaines (Lee *et al.*, 2018). Cependant, c'est la première fois que les différences observées entre deux e-cig réglées à des puissances différentes sont décrites, d'autant plus dans un modèle *in vivo* exposé à court, moyen et long terme. Pour essayer d'apporter des premières réponses quant aux modifications transcriptomiques observées, nous avons effectué une analyse fonctionnelle des gènes dérégulés dans les différentes conditions testées. Il apparaît d'abord que les voies dérégulées par la fumée de cigarette le sont plus significativement que par les émissions d'e-cig. De plus, malgré le plus grand nombre de gènes dérégulés par les émissions de Mb18W, la significativité des voies dérégulées est très similaire avec celle mesurée pour les expositions aux émissions de Mb30W. Sans surprise, suite aux expositions à la fumée de cigarette, les fonctions biologiques les plus impactées sont le métabolisme des xénobiotiques et la réponse inflammatoire. La surexpression des voies du métabolisme, et notamment de la voie AhR, est caractéristique d'une réponse aux HAP comme ceux que nous avons dosés dans la fumée de cigarette. Les gènes surexprimés de cette voie sont notamment ceux des cytochromes CYP1A1 et CYP1B1, que nous avons également retrouvés surexprimés dans nos expérimentations *in vitro*. Ces enzymes peuvent être impliquées dans la transformation de xénobiotiques en métabolites intermédiaires très réactifs pouvant causer des adduits et, à plus long terme, des lésions de l'ADN. Des voies impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques sont également retrouvées dans les voies significativement dérégulées par les expositions aux e-cig. Cependant, les gènes dérégulés dans ce cas codent plutôt pour une alcool déshydrogénase (*ADH7*) des aldéhydes déshydrogénases (*ALDH18A1, ALDH1L2* et *ALDH3A1)* qui pourraient être impliquées dans le métabolisme de composés carbonylés tels que ceux identifiés dans les émissions d'e-cig (Ahmed Laskar and Younus, 2019), mais plus probablement dans la voie de biotransformation du propylène glycol, composé majoritaire des aérosols d'e-cig (Bornhorst and Mbughuni, 2019). Il est intéressant de noter que l'expression de *CYP1A1* n'est pas modifiée et que celle de *CYP1B1* est sous-exprimée, ce qui démontre finalement l'absence d'activation de la voie AhR, en cohérence avec les quantités de HAP, mesurées à l'état de trace dans les émissions d'e-cig. Une étude réalisée sur des cellules de l'épithélium bronchique issues de donneurs fumeurs ou utilisateurs d'e-cig, met également en évidence une dérégulation des voies du métabolisme xénobiotiques par l'e-cig, mais différente de celle observée pour la cigarette (Corbett et al., 2019).

L'analyse fonctionnelle des altérations transcriptomiques montre également une modulation de la voie Th17 suite aux expositions à la fumée de cigarette. Cette voie est impliquée dans la différentiation des lymphocytes T CD4+ naïfs vers des cellules Th17 capables de produire l'IL-17. Les lymphocytes Th17 sont impliqués dans la défense immunitaire contre certaines bactéries et champignons, mais suite à une exposition à la fumée de cigarette, l'augmentation du nombre de ces cellules dans le tissu pulmonaire serait impliquée dans l'inflammation chronique et persistante retrouvée chez les patients atteints de BPCO (Di Stefano *et al.*, 2009). Des expositions de 6 à 8 mois de souris C57BL/6 à la fumée de cigarette ont déjà mis en évidence cette augmentation de Th17 (Harrison *et al.*, 2008), mais cela n'a jamais été montré avec des expositions à l'e-cig. Nos résultats montrent que cette voie est également dérégulée par l'exposition chronique aux émissions des deux modèles d'e-cig (à 6 mois pour la Mb30W et à 3 mois pour la Mb18W). Le gène *IL17RA* (pour IL-17 receptor A) est dérégulé dans le cas d'exposition à la cigarette et témoigne directement de l'augmentation de la sécrétion de l'IL-17A (Gaffen, 2009). Cependant, dans le cas des expositions à l'e-cig, les gènes dérégulés font partie de la voie des Th17 mais sont encore trop peu nombreux pour conclure sur une éventuelle surexpression de cette voie. Une autre voie de l'inflammation est également retrouvée significativement dérégulée suite aux expositions à la fumée de cigarette et aux aérosols d'e-cig : il s'agit de la voie LXR/RXR (pour *Liver X Receptor/Retinoid X Receptor*). L'implication des gènes majeurs de cette voie, à savoir les transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) et certaines métalloprotéases matricielles (comme MMP9), a été mise en évidence dans l'exacerbation de l'inflammation pulmonaire médiée par les macrophages dans le cas d'une exposition à la cigarette (Sonett *et al.*, 2018).

D'autres fonctions moins représentées apparaissent également impactées chez les souris exposées aux émissions d'e-cig. Par exemple, l'analyse des données transcriptomiques a révélé la dérégulation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (*PLA1A, PMVK, PLCB1, PLCB4*). Celui-ci a déjà été décrit comme pouvant être affecté chez des vapoteurs réguliers, ce qui pourrait témoigner de la charge excessive en lipides apportée par le glycérol contenu dans les e-liquides. Cette charge excessive pourrait alors perturber la sécrétion de surfactant au niveau pulmonaire et impacter la fonction pulmonaire (Madison *et al.*, 2019). Des gènes impliqués dans la biosynthèse des nucléotides sont également dérégulés chez les souris exposées aux aérosols d'e-cig ou à la fumée de cigarette (*AK7, AK8, AK9, ATIC* et *NME5*). Ces modifications d'expression

pourraient être liées à un phénomène de prolifération cellulaire comme le suggère la dérégulation de la voie ERK5 (avec les gènes *FOSL1, MYC* et *SFN*) (Nishimoto and Nishida, 2006) ou à des mécanismes de réparation de l'ADN.

Sur la base de nos résultats transcriptomiques, il est difficile de conclure sur les mécanismes précis de toxicité des émissions d'e-cig. Cela pourrait s'expliquer par le fait que, pour les analyses transcriptomiques, les ARN ont été extraits à partir du tissu pulmonaire total. De ce fait, l'absence de distinction entre les différents tissus composants le poumon (bronche, bronchiole, alvéole) fait que certains mécanismes spécifiques pourraient être masqués par le transcriptome d'autres cellules. Par ailleurs, lors des sacrifices, les poumons de souris ont été divisés et répartis dans différents milieux de conservation en fonction des paramètres à mesurer (génotoxicité, analyses protéiques et analyses transcriptomiques). Certaines lésions qui seraient très localisées ne seraient alors pas observables dans la partie de poumon dédiée aux analyses transcriptomiques. Pour compenser en partie ces biais méthodologiques, il est envisagé de réaliser des analyses d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* sur des poumons complets d'autres lots de souris exposées dans les mêmes conditions. Le résultat de ces observations permettrait, d'une part, de savoir si d'éventuelles lésions cellulaires ou tissulaires sont localisées ou diffuses et, d'autre part, d'identifier à l'aide d'anticorps ou de sondes marquées, choisis sur la base des données transcriptomiques (ARNm et miARN) déjà acquises et des voies de signalisation suggérées par les analyses bio-informatiques, le ou les types cellulaires les plus affectées par les expositions. Enfin, pour de futurs projets, il serait peut-être intéressant de réaliser les analyses transcriptomiques sur des cellules ou des groupes de cellules préalablement isolés à l'aide de la technologie de séquençage de cellule unique (ou « single cell »). L'utilisation de cette technologie permettrait d'identifier plus aisément les types cellulaires impactés (cellules épithéliales, cellules immunitaires, cellules endothéliales, fibroblastes...) et de sélectionner les modèles *in vitro* les plus pertinents pour étudier les mécanismes précis induits par les différentes émissions.

Discussion générale
Conclusions et perspectives

Discussion générale

La croissance du marché du vapotage depuis les années 2010 a forcé les institutions à prendre des mesures pour encadrer l'utilisation de l'e-cig. De la directive européenne, transposée dans le droit français en 2016, qui vise à mieux contrôler la composition des e-liquides, jusqu'à l'interdiction de vapoter dans les lieux publics fin 2017, les autorités de santé prônent la prudence vis-à-vis de ces produits (OMS, 2020). Alors que la majorité des données scientifiques s'accordent à dire que l'e-cig serait moins toxique que la cigarette conventionnelle, il y a encore un manque de recul sur la toxicité intrinsèque du vapotage à long terme sur la santé humaine. De plus, les enjeux commerciaux du marché de l'e-cig poussent les fabricants à proposer une grande diversité de e-liquides et de modèles aux technologies toujours plus avancées qui rendent difficile l'évaluation toxicologique exhaustive de l'ensemble des dispositifs commercialisés (ANSES, 2020) .

L'évaluation des effets du vapotage sur la santé peut se faire à plusieurs niveaux : la caractérisation chimique des émissions, pour estimer l'exposition des consommateurs aux différents composés toxiques ; la toxicité *in vitro*, qui permet de mettre en évidence les mécanismes cellulaires mis en jeu dans la réponse à ces composés ; la toxicité *in vivo*, pour rendre compte de l'impact d'une exposition à long terme aux émissions ; et les études épidémiologiques et le suivi des vapoteurs. Cependant, dans un contexte où les publications concernant l'e-cig se font de plus en plus nombreuses, la multiplicité des protocoles expérimentaux utilisés complique la comparaison entre les données de la littérature disponibles (Ward *et al.*, 2020). En effet, les premiers travaux menés au laboratoire montrent que le choix de l'arôme, de la quantité de nicotine, du modèle d'e-cig ou encore du profil de bouffée utilisé, peuvent influencer la concentration des aérosols en composés toxiques (Beauval *et al.*, 2017, 2019). De plus, les méthodologies d'exposition *in vitro* sont également nombreuses dans la littérature, allant de l'exposition de cellules immergées aux e-liquides ou à des extraits d'aérosols, à l'utilisation de cellules en interface air-liquide permettant de les exposer directement aux aérosols (Tableau 4, Tableau 5 et Tableau 6). Ainsi, pour évaluer pleinement la toxicité de l'e-cig il est aujourd'hui nécessaire de réaliser des travaux transdisciplinaires afin de caractériser non seulement la toxicité des aérosols mais aussi leur composition chimique.

Le premier point clé de ce travail de thèse était de comparer la toxicité de l'e-cig à celle de la cigarette conventionnelle. La comparaison des émissions générées par les dispositifs a montré que les émissions d'e-cig de tous les modèles testés (2ème et 3ème génération) contenaient beaucoup moins de composés carbonylés et de HAP que la fumée de cigarette, même rapporté à la quantité de nicotine délivrée. Ces quantités plus faibles en produits toxiques se sont traduites dans les expériences *in vitro*, sur un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines, par une faible cytotoxicité, même après 1h d'exposition aux émisisons d'e-cig. A l'inverse, la fumée de cigarette a induit une mortalité cellulaire dès la première minute d'exposition. Nos expériences *in vitro* ont montré que les faibles quantités de composés toxiques retrouvées dans les émissions d'e-cig pouvaient suffire à déclencher des mécanismes cellulaires de défenses tels que l'induction d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques, d'un stress oxydant et de la sécrétion de cytokines.

L'induction de ces mécanismes est une réponse physiologique lors d'une exposition à des composés chimiques. C'est la chronicité des expositions qui peut jouer un rôle dans leur pathogénicité (Milara and Cortijo, 2012). Pour comparer l'impact à court, moyen et long terme des émissions d'e-cig et de la fumée de cigarette, nous avons utilisé un modèle de souris BALB/C exposées en « nose-only » pendant 4 jours, 3 mois ou 6 mois aux différentes émissions. Les données obtenues lors de ces expériences *in vivo* sont plus nuancées que celles obtenues lors des expériences *in vitro*. En effet, les expositions aux aérosols d'e-cig ont induit, à l'instar de la fumée de cigarette, des lésions oxydatives de l'ADN, une augmentation de la méthylation de l'ADN et des dérégulations au niveau des miARN et de l'expression génique. Les premières analyses des modifications transcriptomiques montrent que quelques fonctions biologiques sont impactées mais elles ne témoignent pas d'une toxicité avérée des aérosols d'e-cig sur les souris exposées, même après 6 mois. Cependant, sur la base des résultats présentés, les expositions à long terme à la fumée de cigarette n'ont pas non plus induit de toxicité évidente. Bien qu'un plus grand nombre de gènes soit dérégulé et que les premières analyses fonctionnelles suggèrent que les fonctions biologiques sont plus impactées par les expositions à la cigarette, aucune voie de signalisation, notamment après 6 mois ne semble pointer vers des effets délétères importants. Cependant, quelques voies de l'inflammation sont tout de même dérégulées par la fumée de cigarette, notamment la voie des Th17, avec plus de gènes impliqués qu'après des expositions à l'e-cig. De même, sur la base des données

transcriptomiques obtenues après 6 mois d'exposition à la fumée de cigarette, l'absence de voies de cancérogénèse peut sembler étonnante. En effet, des voies impliquées dans la prolifération et/ou l'apoptose (*p53*, *KRAS* ou *MAPK)* sont souvent décrites chez l'Homme dans le cancer du poumon induit par la cigarette (Surgeon General US, 2010). Mais, une revue de littérature met en évidence que peu de modèles *in vivo* induisent des cancers suite à des expositions à la cigarette, même après de longs protocoles (Coggins, 2010). En effet, la meilleure méthode décrite dans cette publication pour voir l'apparition de tumeurs, et qui a été testée sur plusieurs modèles de souris (A/J, BALB/c et SWR), est une exposition à la fumée de cigarette de 6h/jour, 5j/semaine pendant 5 mois suivi d'une période de recouvrement de 4 mois (Witschi, 2002). L'ajout d'une période de recouvrement aurait peut-être permis de mettre en évidence le développement de dérégulations plus importantes induites par la fumée de cigarette et/ou les émissions d'e-cig.

Bien que sur la base de nos résultats, nous ne mettons pas en évidence de toxicité particulière des émissions d'e-cig, nous ne pouvons pas non plus démontrer leur innocuité. La présence, même faible, de composés toxiques et la mise en évidence de la sécrétion de cytokine *in vitro*, d'un stress oxydant pouvant mener à des lésions de l'ADN, et de modifications épigénétiques et transcriptomiques pourraient être des premiers éléments dans l'identification de potentiels effets néfastes. Nos analyses transcriptomiques apportent des éléments de réponses en mettant en lumière certaines voies de signalisation communes avec la cigarette (bien que le nombre de gènes impliqués soit beaucoup plus faible avec l'e-cig), notamment la voie des Th17 impliquée dans le développement d'une inflammation chronique et dans la progression de la BPCO (Ponce-Gallegos *et al.*, 2017). Cependant, les données sont pour l'instant uniquement basées sur l'analyse fonctionnelle des gènes dérégulés obtenue par le logiciel IPA. Il sera alors nécessaire de valider les dérégulations observées, notamment au niveau protéique, pour caractériser précisément les mécanismes de réponse mis en jeu lors d'une exposition à l'e-cig.

Un autre point clé de ce travail de thèse était d'identifier l'impact de la puissance de l'e-cig sur la toxicité des émissions. La première différence constatée se situe au niveau de la composition chimique des aérosols. En effet, nous avons montré que l'e-cig réglée à 30 W génère deux fois plus de composés carbonylés que celle réglée à 18 W. Ces composés

sont très réactifs et peuvent être impliqués dans la génération d'un stress oxydant au niveau des voies respiratoires (Bekki *et al.*, 2014). De façon intéressante, les marqueurs de stress oxydant mesurés *in vitro* et *in vivo* montrent également que seules les expositions à l'e-cig réglée à forte puissance induisent une augmentation du glutathion oxydé et des lésions oxydatives de l'ADN. Une autre différence majeure observée entre les e-cig de faible et forte puissance se situe au niveau des modifications transcriptomiques induites *in vivo*. En effet, alors que le modèle Modbox réglé à 30 W induit la dérégulation d'un plus grand nombre de gènes après les expositions aiguës, ce sont les expositions chroniques de 3 et 6 mois aux émissions d'e-cig réglée à 18 W qui induisent le plus de gènes dérégulés. Ces résultats sont surprenants du fait de la quantité plus importante de composés toxiques dans les émissions de Mb30W qui laissait présager qu'elles induiraient plus de modifications transcriptomiques. Cependant, les analyses fonctionnelles des gènes dérégulés révèlent que, par rapport aux expositions à la fumée de cigarette, moins de gènes sont impliqués dans les différentes voies de signalisation mises en évidence après une expositions aux aérosols des deux modèles d'e-cig. Ces observations sont alors à nuancer et le faible nombre de gènes retrouvés dans chaque voie ne garantit pas la pertinence biologique des dérégulations induites par les aérosols d'e-cig. Les émissions de Mb30W, plus riches en composés toxiques, auraient pu induire des mécanismes d'adaptation plus précocement que celles de la Mb18W. Pour vérifier cela, il serait intéressant de réaliser des temps d'expositions intermédiaires pour rendre compte de la cinétique des modifications transcriptomiques.

En plus de l'évaluation de la toxicité de l'e-cig, ce projet de thèse propose également l'analyse d'un nouveau dispositif de délivrance de nicotine : le tabac chauffé. Ce nouveau produit, dont le représentant principal est l'iQOS développé par PMI, permet de générer un aérosol à partir de feuille de tabac supposément sans combustion. Arrivé sur le marché en 2017 en même temps qu'un grand nombre de publications scientifiques financées par le fabricant, le marketing de ce dispositif repose sur le fait qu'il serait moins toxique que la cigarette conventionnelle (Haziza *et al.*, 2016b; Oviedo *et al.*, 2016; Schaller *et al.*, 2016a, 2016b; Smith *et al.*, 2016; Wong, 2016). En effet, les études menées par le fabricant indiquent une réduction de l'exposition aux composés toxiques équivalente à 90 % par rapport à la cigarette (Schaller *et al.*, 2016a). Récemment, en juillet 2020, la FDA a autorisé la commercialisation de l'iQOS aux États-Unis en tant que « produit du tabac à risque

modifié » (FDA, 2020). Cependant, le nombre d'études indépendantes évaluant la toxicité de ce dispositif est encore faible et son utilisation pourrait comporter des risques.

Dans ce contexte, nous avons décidé d'analyser également la composition chimique et la toxicité *in vitro* des émissions de tabac chauffé suivant les mêmes paramètres que nos analyses sur l'e-cig et la cigarette. En effet, les études disponibles à ce jour semblent indiquer que le tabac chauffé comporte moins de risque que la cigarette, mais qu'en est-t-il par rapport à l'e-cig ? La caractérisation chimique montre que les émissions de tabac chauffé contiennent moins de composés carbonylés et de HAP que la fumée cigarette conventionnelle, mais plus que les émissions d'e-cig. De plus, les expériences *in vitro* montrent que les émissions de tabac chauffé induisent 50 % de mortalité cellulaire après un nombre de bouffées plus importants (45 bouffées) que la fumée de cigarette (2 bouffées). Par opposition, les aérosols d'e-cig n'avaient induit que très peu de mortalité jusqu'à 120 bouffées. Enfin, les mécanismes cellulaires étudiés montrent que le rapport GSSG/GSH et l'expression de gènes du métabolisme impliqués dans le métabolisme des HAP (*CYP1A1* et *CYP1B1*) et dans la réponse antioxydante (*HMOX1* et *NQO1*) sont augmentés après une exposition moins intense aux aérosols de tabac chauffé (12 bouffées) par rapport à la fumée de cigarette (1 bouffée), mais moins forte par rapport aux émissions d'e-cig (120 bouffées).

Globalement, nos premiers résultats montrent que les émissions de tabac chauffé semblent effectivement moins toxiques que la fumée de cigarette, mais notre étude souligne le fait qu'elles paraissent cependant avoir une toxicité cellulaire bien plus sévère que les émissions d'e-cig. L'e-cig et le tabac chauffé sont des dispositifs de délivrance de nicotine alternatifs à la cigarette. Alors que l'OMS prône le sevrage tabagique, l'arrivée du tabac chauffé sur le marché pose plusieurs problèmes. Premièrement, l'impossibilité de baisser la quantité de nicotine délivrée. En effet, les e-liquides contiennent une quantité variable de nicotine (de 0 à 20 mg/mL, en Europe) alors que le tabac chauffé, contient une quantité fixe de nicotine, celle présente dans les feuilles de tabac. Ainsi, alors que le vapoteur peut utiliser l'e-cig comme substitut nicotinique en diminuant graduellement les doses de nicotine, l'utilisateur de tabac chauffé ne fait que remplacer la cigarette. Deuxièmement, la cinétique de délivrance de nicotine est également importante à prendre en compte. En effet, différentes études montrent que l'administration d'une grande quantité de nicotine dans un petit laps de temps espacé de périodes de manque, provoque

une addiction bien plus forte que dans le cas d'une administration diffuse (Allain *et al.*, 2015; Samaha *et al.*, 2005). Le tabac chauffé reprend un mode d'administration similaire à celui de la cigarette conventionnelle, qui ressemble plutôt au premier mode, alors que celui de l'e-cig est plutôt similaire à l'administration diffuse tout au long de la journée (Helen *et al.*, 2016; Voos *et al.*, 2019). L'e-cig pourrait alors, à la différence du tabac chauffé, être moins addictive que la cigarette et faciliter la sevrage nicotinique (Shiffman and Sembower, 2020). Mais le pouvoir addictogène de ces dispositifs, primordial dans l'aide à l'arrêt de la cigarette, nécessite encore des études.

Conclusion et perspectives

Les travaux réalisés lors de cette thèse ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur l'impact sanitaire des nouvelles alternatives à la cigarette. Les analyses de la composition chimique et de la toxicité *in vitro* des émissions d'e-cig de différentes puissances et du tabac chauffé ont été réalisées dans des conditions expérimentales standardisées, en comparaison avec la fumée de cigarette conventionnelle. Ces données sont nécessaires pour évaluer la réduction des risques associée à l'utilisation de ces dispositifs.

La composition chimique des émissions en composés carbonylés et en HAP est un bon indicateur de leur potentielle toxicité, mais, d'autres composés, dont la présence a déjà été montrée dans les émissions d'e-cig (Ward *et al.*, 2020) et les aérosols de tabac chauffé (Li *et al.*, 2019b), devraient être étudiés, comme par exemple, les nitrosamines issues du tabac, les métaux issus de la résistance de l'e-cig ou du tabac, ou encore d'autres COV qui pourraient être des dérivés secondaires issus du chauffage du e-liquide ou du stick de tabac.

Les études *in vitro* menées au laboratoire sur la toxicité de l'e-cig et du tabac chauffé ne se limitent pas à ce qui a été décrit dans ces travaux. En effet, un autre projet ayant pour but d'évaluer la toxicité génétique et épigénétique de ces dispositifs sur les cellules BEAS-2B a été abordé. Les premiers résultats obtenus en termes de génotoxicité montrent que les émissions de tabac chauffé et la fumée de cigarette induisent des cassures primaires de l'ADN, contrairement aux aérosols de Mb18W et de Mb30W pour lesquelles aucun dommage de l'ADN n'a été observé. Les analyses transcriptomiques réalisées pour l'ensemble de ces dispositifs devraient permettre de mieux caractériser la toxicité *in vitro*.

De la même façon, les expositions *in vivo* à long terme aux émissions d'e-cig font partie d'un projet plus vaste : le projet RESPIRE financé par l'INCa. C'est dans le contexte de ce projet, qu'ont été réalisées les analyses de génotoxicité, de modifications épigénétiques et génétiques réalisées durant cette thèse. D'autres analyses ont également été effectuées à partir des mêmes expositions de souris. Ainsi, nos données seront à mettre en regard de celles obtenues en termes de lésions tissulaires pulmonaires, de fonction respiratoire, du profil inflammatoire et de la fonction mitochondriale. La confrontation de l'ensemble des résultats obtenus avec les données issues de mes travaux

de thèse devrait permettre de mieux caractériser l'impact respiratoire des émissions d'e-cig et de la comparer à celle de la fumée de cigarette dans nos conditions d'exposition.

L'ensemble de ces données devraient pouvoir apporter de nouvelles connaissances fondamentales pour l'évaluation des risques de ces produits émergents et, *in fine*, aider les décisions des autorités de santé sur la politique à suivre pour réduire la prévalence des maladies pulmonaires et des décès liés à la cigarette.

Bibliographie

Bibliographie

Adenuga, D., and Rahman, I. (2010). Protein kinase CK2-mediated phosphorylation of HDAC2 regulates co-repressor formation, deacetylase activity and acetylation of HDAC2 by cigarette smoke and aldehydes. Arch Biochem Biophys *498*, 62–73.

Adriaens, K., Gucht, D.V., and Baeyens, F. (2018). IQOSTM vs. e-Cigarette vs. Tobacco Cigarette: A Direct Comparison of Short-Term Effects after Overnight-Abstinence. Int. J. Environ. Res. Public Health 20.

Ahmed Laskar, A., and Younus, H. (2019). Aldehyde toxicity and metabolism: the role of aldehyde dehydrogenases in detoxification, drug resistance and carcinogenesis. Drug Metabolism Reviews *51*, 42–64.

Alipoor, S.D., Adcock, I.M., Garssen, J., Mortaz, E., Varahram, M., Mirsaeidi, M., and Velayati, A. (2016). The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases. European Journal of Pharmacology *791*, 395–404.

Allain, F., Minogianis, E.-A., Roberts, D.C.S., and Samaha, A.-N. (2015). How fast and how often: The pharmacokinetics of drug use are decisive in addiction. Neuroscience & Biobehavioral Reviews *56*, 166–179.

Allam, E., DelaCruz, K., Ghoneima, A., Sun, J., and Windsor, L. (2013). Effects of tobacco on cytokine expression from human endothelial cells. Oral Dis *19*, 660–665.

Alpert, H.R., Connolly, G.N., and Biener, L. (2013). A prospective cohort study challenging the effectiveness of population-based medical intervention for smoking cessation. Tob Control *22*, 32–37.

Andler, R., Guignard, R., Spilka, S., Le Nézet, O., Pasquereau, A., Richard, J.-B., and Nguyen-Thanh, V. (2018). Consommation de tabac et usage de cigarette électronique en France. Revue des Maladies Respiratoires *35*, 673–685.

ANSES (2020). Produits du tabac et du vapotage : l'Anses publie un panorama inédit des produits vendus en France | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Anthérieu, S., Garat, A., Beauval, N., Soyez, M., Allorge, D., Garçon, G., and Lo-Guidice, J.-M. (2017). Comparison of cellular and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. Toxicol In Vitro.

Aokage, T., Tsukahara, K., Fukuda, Y., Tokioka, F., Taniguchi, A., Naito, H., and Nakao, A. (2019). Heat-not-burn cigarettes induce fulminant acute eosinophilic pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation. Respir Med Case Rep *26*, 87–90.

Arimilli, S., Madahian, B., Chen, P., Marano, K., and Prasad, G.L. (2017). Gene expression profiles associated with cigarette smoking and moist snuff consumption. BMC Genomics *18*, 156.

Asensi, M., Sastre, J., Pallardo, F.V., Lloret, A., Lehner, M., Garcia-de-la Asuncion, J., and Viña, J. (1999). [23] Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. In Methods in Enzymology, (Elsevier), pp. 267–276.

Association française de normalisation (2016). Cigarettes électroniques et e-liquides - Partie 3 : exigences et méthodes d'essais relatives aux émissions - XP D90-300-3 - Juillet 2016 -.

Auer, R., Concha-Lozano, N., Jacot-Sadowski, I., Cornuz, J., and Berthet, A. (2017). Heat-Not-Burn Tobacco Cigarettes: Smoke by Any Other Name. JAMA Intern Med *177*, 1050–1052.

Azzopardi, D., Patel, K., Jaunky, T., Santopietro, S., Camacho, O.M., McAughey, J., and Gaça, M. (2016). Electronic cigarette aerosol induces significantly less cytotoxicity than tobacco smoke. Toxicology Mechanisms and Methods *26*, 477–491.

Bahl, V., Lin, S., Xu, N., Davis, B., Wang, Y., and Talbot, P. (2012). Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. Reproductive Toxicology *34*, 529–537.

Baker, R.R. (1974). Temperature distribution inside a burning cigarette. Nature *247*, 405–406.

Baker, R.R. (2006). Smoke generation inside a burning cigarette: Modifying combustion to develop cigarettes that may be less hazardous to health. Progress in Energy and Combustion Science *32*, 373–385.

Barna, S., Rózsa, D., Varga, J., Fodor, A., Szilasi, M., Galuska, L., and Garai, I. (2019). First comparative results about the direct effect of traditional cigarette and e-cigarette smoking on lung alveolocapillary membrane using dynamic ventilation scintigraphy: Nuclear Medicine Communications *40*, 153–158.

Beauval, N., Howsam, M., Antherieu, S., Allorge, D., Soyez, M., Garçon, G., Goossens, J.F., Lo-Guidice, J.M., and Garat, A. (2016). Trace elements in e-liquids - Development and validation of an ICP-MS method for the analysis of electronic cigarette refills. Regulatory Toxicology and Pharmacology *79*, 144–148.

Beauval, N., Antherieu, S., Soyez, M., Gengler, N., Grova, N., Howsam, M., Hardy, E.M., Fischer, M., Appenzeller, B.M.R., Goossens, J.-F., et al. (2017). Chemical Evaluation of Electronic Cigarettes: Multicomponent Analysis of Liquid Refills and their Corresponding Aerosols. Journal of Analytical Toxicology *41*, 670–678.

Beauval, N., Verrièle, M., Garat, A., Fronval, I., Dusautoir, R., Anthérieu, S., Garçon, G., Lo-Guidice, J.-M., Allorge, D., and Locoge, N. (2019). Influence of puffing conditions on the carbonyl composition of e-cigarette aerosols. International Journal of Hygiene and Environmental Health *222*, 136–146.

Behar, R.Z., Davis, B., Wang, Y., Bahl, V., Lin, S., and Talbot, P. (2014). Identification of toxicants in cinnamon-flavored electronic cigarette refill fluids. Toxicology in Vitro *28*, 198–208.

Behar, R.Z., Luo, W., McWhirter, K.J., Pankow, J.F., and Talbot, P. (2018). Analytical and toxicological evaluation of flavor chemicals in electronic cigarette refill fluids. Scientific Reports *8*, 8288.

Bekki, K., Uchiyama, S., Ohta, K., Inaba, Y., Nakagome, H., and Kunugita, N. (2014). Carbonyl Compounds Generated from Electronic Cigarettes. Int J Environ Res Public Health *11*, 11192–11200.

Bekki, K., Inaba, Y., Uchiyama, S., and Kunugita, N. (2017). Comparison of Chemicals in Mainstream Smoke in Heat-not-burn Tobacco and Combustion Cigarettes. 7.

Belushkin, M., Tafin Djoko, D., Esposito, M., Korneliou, A., Jeannet, C., Lazzerini, M., and Jaccard, G. (2020). Selected Harmful and Potentially Harmful Constituents Levels in Commercial e-Cigarettes. Chem. Res. Toxicol. *33*, 657–668.

Béné, M.C., and Cartron, G. (2009). Le contrôle de l'expression des gènes par les microARN. 6.

Bengalli, R., Ferri, E., Labra, M., and Mantecca, P. (2017). Lung Toxicity of Condensed Aerosol from E-CIG Liquids: Influence of the Flavor and the In Vitro Model Used. Int. J. Environ. Res. Public Health 14.

Bermudez, E.A., Rifai, N., Buring, J.E., Manson, J.E., and Ridker, P.M. (2002). Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. The American Journal of Cardiology *89*, 1117–1119.

Bernhard, D., Rossmann, A., and Wick, G. (2005). Metals in cigarette smoke. 5.

Bernstein, D.M. (2004). A Review of the Influence of Particle Size, Puff Volume, and Inhalation Pattern on the Deposition of Cigarette Smoke Particles in the Respiratory Tract. Inhalation Toxicology *16*, 675–689.

Bishop, E., Haswell, L., Adamson, J., Costigan, S., Thorne, D., and Gaca, M. (2019). An approach to testing undiluted e-cigarette aerosol in vitro using 3D reconstituted human airway epithelium. Toxicology in Vitro *54*, 391–401.

Bluhm, A.L., Weinstein, J., and Sousa, J.A. (1971). Free Radicals in Tobacco Smoke. Nature *229*, 500–500.

Bonaldi, C. (2019). ESTIMATION DU NOMBRE DE DÉCÈS ATTRIBUABLES AU TABAGISME, EN FRANCE DE 2000 À 2015 / ESTIMATION OF DEATHS ATTRIBUTABLE TO TOBACCO SMOKING, IN FRANCE FROM 2000 TO 2015. 7.

Bornhorst, J.A., and Mbughuni, M.M. (2019). Chapter 3 - Alcohol Biomarkers: Clinical Issues and Analytical Methods. In Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing (Second Edition), A. Dasgupta, ed. (Academic Press), pp. 25–42.

Bowler, R.P., Barnes, P.J., and Crapo, J.D. (2004). The Role of Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease *1*, 255–277.

Boysen, G., and Hecht, S.S. (2003). Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. Mutation Research/Reviews in Mutation Research *543*, 17–30.

Brody, A.L., Mandelkern, M.A., Costello, M.R., Abrams, A.L., Scheibal, D., Farahi, J., London, E.D., Olmstead, R.E., Rose, J.E., and Mukhin, A.G. (2009). Brain nicotinic acetylcholine receptor occupancy: effect of smoking a denicotinized cigarette. Int. J. Neuropsychopharm. *12*, 305.

Brossard, P., Weitkunat, R., Poux, V., Lama, N., Haziza, C., Picavet, P., Baker, G., and Lüdicke, F. (2017). Nicotine pharmacokinetic profiles of the Tobacco Heating System 2.2, cigarettes and nicotine gum in Japanese smokers. Regul Toxicol Pharmacol *89*, 193–199.

Bruder, C., Bulliard, J.-L., Germann, S., Konzelmann, I., Bochud, M., Leyvraz, M., and Chiolero, A. (2018). Estimating lifetime and 10-year risk of lung cancer. Preventive Medicine Reports *11*, 125–130.

Buro-Auriemma, L.J., Salit, J., Hackett, N.R., Walters, M.S., Strulovici-Barel, Y., Staudt, M.R., Fuller, J., Mahmoud, M., Stevenson, C.S., Hilton, H., et al. (2013). Cigarette smoking induces small airway epithelial epigenetic changes with corresponding modulation of gene expression. Hum Mol Genet *22*, 4726–4738.

Cahill, K., Stevens, S., and Lancaster, T. (2014). Pharmacological Treatments for Smoking Cessation. 2.

Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer *6*, 857–866.

Canistro, D., Vivarelli, F., Cirillo, S., Babot Marquillas, C., Buschini, A., Lazzaretti, M., Marchi, L., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M.T., Lodovici, M., et al. (2017). E-cigarettes induce toxicological effects that can raise the cancer risk. Sci Rep *7*, 2028.

Carter, B.D., Freedman, N.D., Ockene, J.K., and Thun, M.J. (2015). Smoking and Mortality — Beyond Established Causes. N Engl j Med 10.

Cervellati, F., Muresan, X.M., Sticozzi, C., Gambari, R., Montagner, G., Forman, H.J., Torricelli, C., Maioli, E., and Valacchi, G. (2014). Comparative effects between electronic and cigarette smoke in human keratinocytes and epithelial lung cells. Toxicology in Vitro *28*, 999–1005.

Chatterjee, S., Tao, J.-Q., Johncola, A., Guo, W., Caporale, A., Langham, M.C., and Wehrli, F.W. (2019). Acute exposure to e-cigarettes causes inflammation and pulmonary endothelial oxidative stress in nonsmoking, healthy young subjects. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology *317*, L155–L166.

Chen, C.-L., Hsu, L.-I., Chiou, H.-Y., Hsueh, Y.-M., Chen, S.-Y., Wu, M.-M., Chen, C.-J., and Blackfoot Disease Study Group, for the (2004). Ingested Arsenic, Cigarette Smoking, and Lung Cancer Risk: A Follow-up Study in Arseniasis-Endemic Areas in Taiwan. JAMA *292*, 2984.

Chen, W., Xu, X., Bai, L., Padilla, M.T., Gott, K.M., Leng, S., Tellez, C.S., Wilder, J.A., Belinsky, S.A., Scott, B.R., et al. (2012a). Low-dose gamma-irradiation inhibits IL-6 secretion from human lung fibroblasts that promotes bronchial epithelial cell transformation by cigarette-smoke carcinogen. Carcinogenesis *33*, 1368–1374.

Chen, Y., Huang, P., Ai, W., Li, X., Guo, W., Zhang, J., and Yang, J. (2012b). Histone deacetylase activity is decreased in peripheral blood monocytes in patients with COPD. J Inflamm (Lond) *9*, 10.

Cheng, T. (2014). Chemical evaluation of electronic cigarettes. Tobacco Control *23*, ii11–ii17.

Chun, L., Moazed, F., Matthay, M., Calfee, C., and Gotts, J. (2018). Possible hepatotoxicity of IQOS. Tobacco Control *27*, s39–s40.

Chun, L.F., Moazed, F., Calfee, C.S., Matthay, M.A., and Gotts, J.E. (2017). Pulmonary Toxicity of E-cigarettes. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology ajplung.00071.2017.

Chung, K.F. (2005). Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. Curr Drug Targets Inflamm Allergy *4*, 619–625.

Church, D.F., and Pryor, W.A. (1985). Free-Radical Chemistry of Cigarette Smoke and Its Toxicological Implications. 16.

Churg, A., Dai, J., Tai, H., Xie, C., and Wright, J.L. (2002). Tumor Necrosis Factor-α Is Central to Acute Cigarette Smoke–induced Inflammation and Connective Tissue Breakdown. Am J Respir Crit Care Med *166*, 849–854.

Churg, A., Wang, R., Wang, X., Onnervik, P.-O., Thim, K., and Wright, J.L. (2007). Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. Thorax *62*, 706–713.

Cirillo, S., Vivarelli, F., Turrini, E., Fimognari, C., Burattini, S., Falcieri, E., Rocchi, M.B.L., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M.T., Paolini, M., et al. (2019). The Customizable E-cigarette Resistance Influences Toxicological Outcomes: Lung Degeneration, Inflammation, and Oxidative Stress-Induced in a Rat Model. Toxicological Sciences *172*, 132–145.

Coggins, C.R.E. (2010). A further review of inhalation studies with cigarette smoke and lung cancer in experimental animals, including transgenic mice. Inhalation Toxicology *22*, 974–983.

Cohen, D., Arai, S.F., and Brain, J.D. (1979). Smoking impairs long-term dust clearance from the lung. Science *204*, 514–517.

Commissioner, O. of the (2020). Lung Injuries Associated with Use of Vaping Products. FDA.

Conti, V., Corbi, G., Manzo, V., Malangone, P., Vitale, C., Maglio, A., Cotugno, R., Capaccio, D., Marino, L., Selleri, C., et al. (2018). SIRT1 Activity in Peripheral Blood Mononuclear Cells

Correlates with Altered Lung Function in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity *2018*, 1–8.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J *17*, 1195–1214.

Corbett, S.E. Gene Expression Alterations in the Bronchial Epithelium of e-Cigarette Users. 10.

Cottin, V. (2006). Traitement des pneumopathies interstitielles diffuses. Revue des Maladies Respiratoires *23*, 97–102.

Counts, M.E., Morton, M.J., Laffoon, S.W., Cox, R.H., and Lipowicz, P.J. (2005). Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. Regulatory Toxicology and Pharmacology *41*, 185–227.

Crotty Alexander, L.E., Drummond, C.A., Hepokoski, M., Mathew, D., Moshensky, A., Willeford, A., Das, S., Singh, P., Yong, Z., Lee, J.H., et al. (2018). Chronic inhalation of e-cigarette vapor containing nicotine disrupts airway barrier function and induces systemic inflammation and multiorgan fibrosis in mice. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology *314*, R834–R847.

Cuozzo, C., Porcellini, A., Angrisano, T., Morano, A., Lee, B., Di Pardo, A., Messina, S., Iuliano, R., Fusco, A., Santillo, M.R., et al. (2007). DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation. PLoS Genet *3*, e110.

Czekala, L. (2019). Toxicological comparison of cigarette smoke and e-cigarette aerosol using a 3D in vitro human respiratory model. Regulatory Toxicology and Pharmacology 11.

Dalrymple, A., Ordoñez, P., Thorne, D., Walker, D., Camacho, O.M., Büttner, A., Dillon, D., and Meredith, C. (2016). Cigarette smoke induced genotoxicity and respiratory tract pathology: evidence to support reduced exposure time and animal numbers in tobacco product testing. Inhalation Toxicology *28*, 324–338.

David, S.S., O'Shea, V.L., and Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. Nature *447*, 941–950.

Davis, B., Williams, M., and Talbot, P. (2019). iQOS: evidence of pyrolysis and release of a toxicant from plastic. Tobacco Control *28*, 34–41.

Delmas, M., Pasquereau, A., Roche, N., Andler, R., Richard, J.-B., and Robert, M. (2018). Article - Bulletin épidémiologique hebdomadaire.

DeMarini, D.M. (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. Mutation Research/Reviews in Mutation Research *567*, 447–474.

Di Stefano, A., Caramori, G., Gnemmi, I., Contoli, M., Vicari, C., Capelli, A., Magno, F., D'Anna, S.E., Zanini, A., Brun, P., et al. (2009). T helper type 17-related cytokine expression is

increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. Clinical & Experimental Immunology *157*, 316–324.

Ding, Y.S., Zhang, L., Jain, R.B., Jain, N., Wang, R.Y., Ashley, D.L., and Watson, C.H. (2008). Levels of tobacco-specific nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from different tobacco varieties. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev *17*, 3366–3371.

Djordjevic, M.V., Hoffmann, D., and Hoffmann, I. (1997). Nicotine Regulates Smoking Patterns. Preventive Medicine *26*, 435–440.

Dogan, M.V., Shields, B., Cutrona, C., Gao, L., Gibbons, F.X., Simons, R., Monick, M., Brody, G.H., Tan, K., Beach, S.R.H., et al. (2014). The effect of smoking on DNA methylation of peripheral blood mononuclear cells from African American women. BMC Genomics *15*, 151.

Doll, R., Peto, R., Boreham, J., and Sutherland, I. (2004). Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. J Epidemiol Community Health *58*, 930.

Duell, A.K., Pankow, J.F., Gillette, S.M., and Peyton, D.H. (2018). Boiling points of the propylene glycol + glycerol system at 1 atmosphere pressure: 188.6–292 °C without and with added water or nicotine. Chemical Engineering Communications *205*, 1691–1700.

van Eijl, S., van Oorschot, R., Olivier, B., Nijkamp, F.P., and Bloksma, N. (2006). Stress and Hypothermia in Mice in A Nose-Only Cigarette Smoke Exposure System. Inhalation Toxicology *18*, 911–918.

Eisner, M., and Iribarren, C. (2007). The influence of cigarette smoking on adult asthma outcomes. Nicotine & Tobacco Res. *9*, 53–56.

El Golli, N., Jrad-Lamine, A., Neffati, H., Rahali, D., Dallagi, Y., Dkhili, H., Ba, N., El May, M.V., and El Fazaa, S. (2016). Impact of e-cigarette refill liquid with or without nicotine on liver function in adult rats. Toxicol Mech Methods *26*, 419–426.

Eldridge, A., Betson, T.R., Gama, M.V., and McAdam, K. (2015). Variation in tobacco and mainstream smoke toxicant yields from selected commercial cigarette products. Regulatory Toxicology and Pharmacology *71*, 409–427.

Elliott, H.R., Tillin, T., McArdle, W.L., Ho, K., Duggirala, A., Frayling, T.M., Davey Smith, G., Hughes, A.D., Chaturvedi, N., and Relton, C.L. (2014). Differences in smoking associated DNA methylation patterns in South Asians and Europeans. Clinical Epigenetics *6*, 4.

Evans, W.H., Thomas, N.C., Boardman, M.C., and Nash, S.J. (1993). Relationships of polycyclic aromatic hydrocarbon yields with particulate matter (water and nicotine free) yields in mainstream and sidestream cigarette smoke. 9.

Farsalinos, K.E. (2017). E-cigarettes emit very high formaldehyde levels only in conditions that are aversive to users: A replication study under verified realistic use conditions. Food and Chemical Toxicology 5.

Farsalinos, K.E., and Gillman, G. (2018). Carbonyl Emissions in E-cigarette Aerosol: A Systematic Review and Methodological Considerations. Front. Physiol. *8*, 1119.

Farsalinos, K., Romagna, G., Allifranchini, E., Ripamonti, E., Bocchietto, E., Todeschi, S., Tsiapras, D., Kyrzopoulos, S., and Voudris, V. (2013). Comparison of the Cytotoxic Potential of Cigarette Smoke and Electronic Cigarette Vapour Extract on Cultured Myocardial Cells. IJERPH *10*, 5146–5162.

Farsalinos, K., Poulas, K., and Voudris, V. (2018a). Changes in Puffing Topography and Nicotine Consumption Depending on the Power Setting of Electronic Cigarettes. Nicotine Tob Res *20*, 993–997.

Farsalinos, K.E., Voudris, V., and Poulas, K. (2015). E-cigarettes generate high levels of aldehydes only in "dry puff" conditions. Addiction *110*, 1352–1356.

Farsalinos, K.E., Yannovits, N., Sarri, T., Voudris, V., Poulas, K., and Leischow, S.J. (2018b). Carbonyl emissions from a novel heated tobacco product (IQOS): comparison with an e-cigarette and a tobacco cigarette: Carbonyl emissions in heated tobacco product. Addiction *113*, 2099–2106.

Food and Drug Administration (2012). Harmful and Potentially Harmful Constituents in Tobacco Products and Tobacco Smoke; Established List.

Forster, M., Fiebelkorn, S., Yurteri, C., Mariner, D., Liu, C., Wright, C., McAdam, K., Murphy, J., and Proctor, C. (2018). Assessment of novel tobacco heating product THP1.0. Part 3: Comprehensive chemical characterisation of harmful and potentially harmful aerosol emissions. Regulatory Toxicology and Pharmacology *93*, 14–33.

Fowles, J. (2003). Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. Tobacco Control *12*, 424–430.

Fowles, J.R., Banton, M.I., and Pottenger, L.H. (2013). A toxicological review of the propylene glycols. Critical Reviews in Toxicology *43*, 363–390.

Frank, M.S.B., Nahata, M.C., and Hilty, M.D. (1981). Glycerol: A Review of Its Pharmacology, Pharmacokinetics, Adverse Reactions, and Clinical Use. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy *1*, 147–160.

Frank, R., Braun, H.E., Holdrinet, M., Stonefield, K.I., Elliot, J.M., Zilkey, B., Vickery, L., and Cheng, H.H. (1977). Metal contents and insecticide residues in tobacco soils and cured tobacco leaves collected in southern Ontario. Tob. Sci.; (United States) *21*.

Frei, B., Forte, T.M., Ames, B.N., and Cross, C.E. (1991). Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. Biochem J *277*, 133–138.

Fretland, A.J., and Omiecinski, C.J. (2000). Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. Chemico-Biological Interactions *129*, 41–59.

Freudenheim, J.L., Shields, P.G., Song, M.-A., and Smiraglia, D. (2019). DNA Methylation and Smoking: Implications for Understanding Effects of Electronic Cigarettes. Curr Epidemiol Rep *6*, 148–161.

Furrukh, M. (2013). Tobacco Smoking and Lung Cancer. Sultan Qaboos Univ Med J *13*, 345–358.

Gaffen, S.L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. Nat Rev Immunol *9*, 556–567.

Gao, W., Jin, J., Yin, J., Land, S., Gaither-Davis, A., Christie, N., Luketich, J.D., Siegfried, J.M., and Keohavong, P. (2017). KRAS and TP53 mutations in bronchoscopy samples from former lung cancer patients: KRAS AND TP53 MUTATIONS IN FORMER LUNG CANCER. Mol. Carcinog. *56*, 381–388.

Garcia, C., Jp, A., Fp, F., Of, G., Tf, de O., Ap, L., P, D.M., and Mh, M. (2011). [13C2]-Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine in human cells. J Am Chem Soc *133*, 9140–9143.

Gealy, R., Zhang, L., Siegfried, J.M., Luketich, J.D., and Keohavong, P. (1999). Comparison of mutations in the p53 and K-ras genes in lung carcinomas from smoking and nonsmoking women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev *8*, 297–302.

Geiss, O., Bianchi, I., and Barrero-Moreno, J. (2016). Correlation of volatile carbonyl yields emitted by e-cigarettes with the temperature of the heating coil and the perceived sensorial quality of the generated vapours. International Journal of Hygiene and Environmental Health *219*, 268–277.

Gerloff, J., Sundar, I.K., Freter, R., Sekera, E.R., Friedman, A.E., Robinson, R., Pagano, T., and Rahman, I. (2017). Inflammatory Response and Barrier Dysfunction by Different e-Cigarette Flavoring Chemicals Identified by Gas Chromatography–Mass Spectrometry in e-Liquids and e-Vapors on Human Lung Epithelial Cells and Fibroblasts. Applied In Vitro Toxicology *3*, 28–40.

Gillman, I.G., Kistler, K.A., Stewart, E.W., and Paolantonio, A.R. (2016). Effect of variable power levels on the yield of total aerosol mass and formation of aldehydes in e-cigarette aerosols. Regulatory Toxicology and Pharmacology *75*, 58–65.

Glantz, S.A. (2018). PMI's own in vivo clinical data on biomarkers of potential harm in Americans show that IQOS is not detectably different from conventional cigarettes. Tob Control *27*, s9–s12.

Glynos, C., Bibli, S.-I., Katsaounou, P., Pavlidou, A., Magkou, C., Karavana, V., Topouzis, S., Kalomenidis, I., Zakynthinos, S., and Papapetropoulos, A. (2018). Comparison of the effects of e-cigarette vapor with cigarette smoke on lung function and inflammation in mice. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.

Goniewicz, M.L., Knysak, J., Gawron, M., Kosmider, L., Sobczak, A., Kurek, J., Prokopowicz, A., Jablonska-Czapla, M., Rosik-Dulewska, C., Havel, C., et al. (2014). Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. Tobacco Control *23*, 133–139.

Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., and Harris, C.C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res *54*, 4855–4878.

Guengerich, F.P. (2008). Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. Chem. Res. Toxicol. *21*, 70–83.

Guengerich, F.P., Kim, D.H., and Iwasaki, M. (1991). Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. Chem Res Toxicol *4*, 168–179.

Guerin, M.R., Higgins, C.E., and Jenkins, R.A. (1987). Measuring environmental emissions from tobacco combustion: Sidestream cigarette smoke literature review. Atmospheric Environment (1967) *21*, 291–297.

Guida, F., Sandanger, T.M., Castagné, R., Campanella, G., Polidoro, S., Palli, D., Krogh, V., Tumino, R., Sacerdote, C., Panico, S., et al. (2015). Dynamics of smoking-induced genome-wide methylation changes with time since smoking cessation. Hum Mol Genet *24*, 2349–2359.

Haddad, C., Salman, R., El-Hellani, A., Talih, S., Shihadeh, A., and Saliba, N.A. (2019). Reactive Oxygen Species Emissions from Supra- and Sub-Ohm Electronic Cigarettes. J Anal Toxicol *43*, 45–50.

Hajek, P., Etter, J.-F., Benowitz, N., Eissenberg, T., and McRobbie, H. (2014). Electronic cigarettes: review of use, content, safety, effects on smokers and potential for harm and benefit: Electronic cigarettes: a review. Addiction *109*, 1801–1810.

Hajek, P., Phillips-Waller, A., Przulj, D., Pesola, F., Myers Smith, K., Bisal, N., Li, J., Parrott, S., Sasieni, P., Dawkins, L., et al. (2019). A Randomized Trial of E-Cigarettes versus Nicotine-Replacement Therapy. New England Journal of Medicine *380*, 629–637.

Harris, J.E. (2004). Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8. BMJ *328*, 72–0.

Harrison, O.J., Foley, J., Bolognese, B.J., Long, E., Podolin, P.L., and Walsh, P.T. (2008). Airway infiltration of CD4+ CCR6+ Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement. Immunology Letters *121*, 13–21.

Haswell, L.E., Baxter, A., Banerjee, A., Verrastro, I., Mushonganono, J., Adamson, J., Thorne, D., Gaça, M., and Minet, E. (2017). Reduced biological effect of e-cigarette aerosol compared to cigarette smoke evaluated in vitro using normalized nicotine dose and RNA-seq-based toxicogenomics. Scientific Reports *7*.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R. (2005). GLUTATHIONE TRANSFERASES. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *45*, 51–88.

Hays, A.M., Srinivasan, D., Witten, M.L., Carter, D.E., and Lantz, R.C. (2006). Arsenic and Cigarette Smoke Synergistically Increase DNA Oxidation in the Lung. Toxicol Pathol *34*, 396–404.

Haziza, C., de La Bourdonnaye, G., Merlet, S., Benzimra, M., Ancerewicz, J., Donelli, A., Baker, G., Picavet, P., and Lüdicke, F. (2016a). Assessment of the reduction in levels of exposure to harmful and potentially harmful constituents in Japanese subjects using a novel tobacco heating system compared with conventional cigarettes and smoking abstinence: A randomized controlled study in confinement. Regulatory Toxicology and Pharmacology *81*, 489–499.

Haziza, C., de La Bourdonnaye, G., Skiada, D., Ancerewicz, J., Baker, G., Picavet, P., and Lüdicke, F. (2016b). Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 8: 5-Day randomized reduced exposure clinical study in Poland. Regulatory Toxicology and Pharmacology *81*, S139–S150.

Hecht, S.S. (1999). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. Journal of the National Cancer Institute *91*, 17.

Hecht, S.S., and Hoffmann, D. (1988). Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. Carcinogenesis *9*, 875–884.

Helen, G.St., Ross, K.C., Dempsey, D.A., Havel, C.M., Jacob, P., and Benowitz, N.L. (2016). Nicotine Delivery and Vaping Behavior during <I>ad libitum</I> E-cigarette Access. Tobacco Reg Sci *2*, 363–376.

Hendrick, D.J. (2004). Smoking, cadmium, and emphysema. Thorax *59*, 184–185.

Hernandez-Boussard, T.M., and Hainaut, P. (1998). A specific spectrum of p53 mutations in lung cancer from smokers: review of mutations compiled in the IARC p53 database. Environ Health Perspect *106*, 385–391.

Herrington, J.S., and Hays, M.D. (2012). Concerns regarding 24-h sampling for formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)-coated solid sorbents. Atmospheric Environment *55*, 179–184.

Higham, A. (2016). Electronic cigarette exposure triggers neutrophil inflammatory responses. 11.

Ho, S.S.H. (2011). Unsuitability of using the DNPH-coated solid sorbent cartridge for determination of airborne unsaturated carbonyls. Atmospheric Environment 5.

Hoffmann, D., Djordjevic, M.V., and Hoffmann, I. (1997). The changing cigarette. Prev Med *26*, 427–434.

Hoffmann, D., Hoffmann, I., and El-Bayoumy, K. (2001). The Less Harmful Cigarette: A Controversial Issue. A Tribute to Ernst L. Wynder. Chem. Res. Toxicol. *14*, 767–790.

Hölzle, D., Schlöbe, D., Tricker, A.R., and Richter, E. (2007). Mass spectrometric analysis of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in human lung. Toxicology *232*, 277–285.

Huang, J., Wu, J., Li, Y., Li, X., Yang, T., Yang, Q., and Jiang, Y. Deregulation of Serum MicroRNA Expression Is Associated with Cigarette Smoking and Lung Cancer. BioMed Research International 14.

Hukkanen, J., Jacob, P., and Benowitz, N.L. (2005). Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. Pharmacol Rev *57*, 79–115.

Hutzler, C., Paschke, M., Kruschinski, S., Henkler, F., Hahn, J., and Luch, A. (2014). Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarettes. Arch Toxicol *88*, 1295–1308.

Hwang, J.H., Lyes, M., Sladewski, K., Enany, S., McEachern, E., Mathew, D.P., Das, S., Moshensky, A., Bapat, S., Pride, D.T., et al. (2016). Electronic cigarette inhalation alters innate immunity and airway cytokines while increasing the virulence of colonizing bacteria. J Mol Med *94*, 667–679.

Iskandar, A.R., Gonzalez-Suarez, I., Majeed, S., Marescotti, D., Sewer, A., Xiang, Y., Leroy, P., Guedj, E., Mathis, C., Schaller, J.-P., et al. (2016). A framework for *in vitro* systems toxicology assessment of e-liquids. Toxicology Mechanisms and Methods *26*, 392–416.

Iskandar, A.R., Mathis, C., Schlage, W.K., Frentzel, S., Leroy, P., Xiang, Y., Sewer, A., Majeed, S., Ortega-Torres, L., Johne, S., et al. (2017a). A systems toxicology approach for comparative assessment: Biological impact of an aerosol from a candidate modified-risk tobacco product and cigarette smoke on human organotypic bronchial epithelial cultures. Toxicology in Vitro *39*, 29–51.

Iskandar, A.R., Martinez, Y., Martin, F., Schlage, W.K., Leroy, P., Sewer, A., Torres, L.O., Majeed, S., Merg, C., Trivedi, K., et al. (2017b). Comparative effects of a candidate modified-risk tobacco product Aerosol and cigarette smoke on human organotypic small airway cultures: a systems toxicology approach. Toxicol. Res. *6*, 930–946.

Ito, K., Caramori, G., Hayashi, S., and Barnes, P.J. (2005). Decreased Histone Deacetylase Activity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. The New England Journal of Medicine 10.

Ito, S., Taylor, M., Mori, S., Thorne, D., Nishino, T., Breheny, D., Gaça, M., Yoshino, K., and Proctor, C. (2019). An inter-laboratory in vitro assessment of cigarettes and next generation nicotine delivery products. Toxicology Letters *315*, 14–22.

Izzotti, A., Calin, G.A., Arrigo, P., Steele, V.E., Croce, C.M., and De Flora, S. (2009). Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. FASEB J *23*, 806–812.

Izzotti, A., Larghero, P., Longobardi, M., Cartiglia, C., Camoirano, A., Steele, V.E., and De Flora, S. (2011). Dose-responsiveness and persistence of microRNA expression alterations induced by cigarette smoke in mouse lung. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis *717*, 9–16.

Jaccard, G., Kondylis, A., Gunduz, I., Pijnenburg, J., and Belushkin, M. (2018). Investigation and comparison of the transfer of TSNA from tobacco to cigarette mainstream smoke and to the aerosol of a heated tobacco product, THS2.2. Regul Toxicol Pharmacol *97*, 103–109.

Jackson, S.E., Kotz, D., West, R., and Brown, J. (2019). Moderators of real-world effectiveness of smoking cessation aids: a population study. Addiction *114*, 1627–1638.

Jalas, J.R., Hecht, S.S., and Murphy, S.E. (2005). Cytochrome P450 enzymes as catalysts of metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco specific carcinogen. Chem Res Toxicol *18*, 95–110.

Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin *68*, 167–182.

Jeong, I., Lim, J.-H., Oh, D.K., Kim, W.J., and Oh, Y.-M. (2018). Gene expression profile of human lung in a relatively early stage of COPD with emphysema. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis *13*, 2643–2655.

Jin, B., and Robertson, K.D. (2013). DNA Methyltransferases, DNA Damage Repair, and Cancer. In Epigenetic Alterations in Oncogenesis, A.R. Karpf, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 3–29.

Jo, W.-K., Oh, J.-W., and Dong, J.-I. (2004). Evaluation of exposure to carbon monoxide associated with passive smoking. Environmental Research *94*, 309–318.

Joehanes, R., Just, A.C., Marioni, R.E., Pilling, L.C., Reynolds, L.M., Mandaviya, P.R., Guan, W., Xu, T., Elks, C.E., Aslibekyan, S., et al. (2016). Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. Circ Cardiovasc Genet *9*, 436–447.

Jones, J., Slayford, S., Gray, A., Brick, K., Prasad, K., and Proctor, C. (2020). A cross-category puffing topography, mouth level exposure and consumption study among Italian users of tobacco and nicotine products. Scientific Reports *10*, 12.

Kalra, J., Chaudhary, A.K., and Prasad, K. (1991). Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. Int J Exp Pathol *72*, 1–7.

Kamada, T., Yamashita, Y., and Tomioka, H. (2016). Acute eosinophilic pneumonia following heat-not-burn cigarette smoking. Respirology Case Reports *4*, e00190.

Kim, D., and Guengerich, F.P. (2005). Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. Annu Rev Pharmacol Toxicol *45*, 27–49.

Kim, J.H., Sherman, M.E., Curriero, F.C., Guengerich, F.P., Strickland, P.T., and Sutter, T.R. (2004). Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. Toxicol Appl Pharmacol *199*, 210–219.

King, T.E., Savici, D., and Campbell, P.A. (1988). Phagocytosis and Killing of Listeria monocytogenes by Alveolar Macrophages: Smokers Versus Nonsmokers. Journal of Infectious Diseases *158*, 1309–1316.

Kopa, P.N., and Pawliczak, R. (2018). Effect of smoking on gene expression profile – overall mechanism, impact on respiratory system function, and reference to electronic cigarettes. Toxicology Mechanisms and Methods *28*, 397–409.

Kopa, P.N., and Pawliczak, R. (2020). IQOS – a heat-not-burn (HnB) tobacco product – chemical composition and possible impact on oxidative stress and inflammatory response. A systematic review. Toxicology Mechanisms and Methods *30*, 81–87.

Koppula, P., Zhang, Y., Zhuang, L., and Gan, B. (2018). Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. Cancer Communications *38*, 12.

Korzun, T., Lazurko, M., Munhenzva, I., Barsanti, K.C., Huang, Y., Jensen, R.P., Escobedo, J.O., Luo, W., Peyton, D.H., and Strongin, R.M. (2018). E-Cigarette Airflow Rate Modulates Toxicant Profiles and Can Lead to Concerning Levels of Solvent Consumption. ACS Omega *3*, 30–36.

Kreyling, W.G., Scheuch, G., and Scheuch, G. (2000). Clearance of Particles Deposited in the Lungs (CRC Press).

Kwon, Y.-M., Park, J.H., Kim, H., Shim, Y.M., Kim, J., Han, J., Park, J., and Kim, D.-H. (2007). Different susceptibility of increased DNMT1 expression by exposure to tobacco smoke according to histology in primary non-small cell lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol *133*, 219–226.

Lagrue, G. (2005). Le tabagisme, un problème majeur de santé publique. Raison présente *153*, 73–98.

Laube, B.L., Afshar-Mohajer, N., Koehler, K., Chen, G., Lazarus, P., Collaco, J.M., and McGrath-Morrow, S.A. (2017). Acute and chronic in vivo effects of exposure to nicotine and propylene glycol from an E-cigarette on mucociliary clearance in a murine model. 20.

Lazarević, K., Nikolić, D., Stošić, L., Milutinović, S., Videnović, J., and Bogdanović, D.C. (2012). Determination of Lead and Arsenic in Tobacco and Cigarettes: an Important Issue of Public Health. Cent Eur J Public Health *20*, 62–66.

Le Calvez, F., Mukeria, A., Hunt, J.D., Kelm, O., Hung, R.J., Tanière, P., Brennan, P., Boffetta, P., Zaridze, D.G., and Hainaut, P. (2005). TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. Cancer Res *65*, 5076–5083.

Le Foll, B., and George, T.P. (2007). Treatment of tobacco dependence: integrating recent progress into practice. Canadian Medical Association Journal *177*, 1373–1380.

Lee, H.-W., Park, S.-H., Weng, M., Wang, H.-T., Huang, W.C., Lepor, H., Wu, X.-R., Chen, L.-C., and Tang, M. E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in human lung and bladder cells. MEDICAL SCIENCES 10.

Lee, K.M., Hoeng, J., Harbo, S., Kogel, U., Gardner, W., Oldham, M., Benson, E., Talikka, M., Kondylis, A., Martin, F., et al. (2018). Biological changes in C57BL/6 mice following 3 weeks of inhalation exposure to cigarette smoke or e-vapor aerosols. Inhalation Toxicology *30*, 553–567.

Lee, Y.O., Nonnemaker, J.M., Bradfield, B., Hensel, E.C., and Robinson, R.J. (2017). Examining daily electronic cigarette puff topography among established and nonestablished cigarette smokers in their natural environment. Nicotine and Tobacco Research *20*, 1283–1288.

Leigh, N.J., Lawton, R.I., Hershberger, P.A., and Goniewicz, M.L. (2016). Flavourings significantly affect inhalation toxicity of aerosol generated from electronic nicotine delivery systems (ENDS). Tobacco Control *25*, ii81–ii87.

Leigh, N.J., Tran, P.L., O'Connor, R.J., and Goniewicz, M.L. (2018). Cytotoxic effects of heated tobacco products (HTP) on human bronchial epithelial cells. Tob Control *27*, s26–s29.

Lerner, C.A., Sundar, I.K., Yao, H., Gerloff, J., Ossip, D.J., McIntosh, S., Robinson, R., and Rahman, I. (2015). Vapors Produced by Electronic Cigarettes and E-Juices with Flavorings Induce Toxicity, Oxidative Stress, and Inflammatory Response in Lung Epithelial Cells and in Mouse Lung. PLOS ONE 26.

Leslie, L.J., Bathrinarayanan, P.V., Jackson, P., Pallett, R., Stillman, C.J.P., and Marshall, L.J. (2017). A comparative study of electronic cigarette vapor extracts on airway-related cell lines in vitro. INHALATION TOXICOLOGY 12.

Leuenberger, C., Schuoler, C., Bye, H., Mignan, C., Rechsteiner, T., Hillinger, S., Opitz, I., Marsland, B., Faiz, A., Hiemstra, P.S., et al. (2016). MicroRNA-223 controls the expression of histone deacetylase 2: a novel axis in COPD. J Mol Med *94*, 725–734.

Levy, D.T., Chaloupka, F., and Gitchell, J. (2004). The effects of tobacco control policies on smoking rates: a tobacco control scorecard. J Public Health Manag Pract *10*, 338–353.

Li, M., Huo, X., Davuljigari, C.B., Dai, Q., and Xu, X. (2019a). MicroRNAs and their role in environmental chemical carcinogenesis. Environ Geochem Health *41*, 225–247.

Li, X., Luo, Y., Jiang, X., Zhang, H., Zhu, F., Hu, S., Hou, H., Hu, Q., and Pang, Y. (2018). Chemical analysis and simulated pyrolysis of tobacco heating system 2.2 compared to conventional cigarettes. Nicotine and Tobacco Research *21*, 111–118.

Li, X., Luo, Y., Jiang, X., Zhang, H., Zhu, F., Hu, S., Hou, H., Hu, Q., and Pang, Y. (2019b). Chemical Analysis and Simulated Pyrolysis of Tobacco Heating System 2.2 Compared to Conventional Cigarettes. Nicotine & Tobacco Research *21*, 111–118.

Lino-dos-Santos-Franco, A., Correa-Costa, M., dos Santos Durão, A.C.C., Ligeiro de Oliveira, A.P., Breithaupt-Faloppa, A.C., Bertoni, J. de A., Oliveira-Filho, R.M., Câmara, N.O.S., Marcourakis, T., and Tavares-de-Lima, W. (2011). Formaldehyde induces lung inflammation by an oxidant and antioxidant enzymes mediated mechanism in the lung tissue. Toxicology Letters *207*, 278–285.

Liu, X., Lu, J., and Liu, S. (1999). Synergistic induction of hydroxyl radical-induced DNA single-strand breaks by chromiumžVI/ compound and cigarette smoke solution. 9.

Liu, X., Lugo, A., Spizzichino, L., Tabuchi, T., Gorini, G., and Gallus, S. (2018). Heat-Not-Burn Tobacco Products Are Getting Hot in Italy. Journal of Epidemiology *28*, 274–275.

Lo Sasso, G., Titz, B., Nury, C., Boué, S., Phillips, B., Belcastro, V., Schneider, T., Dijon, S., Baumer, K., Peric, D., et al. (2016). Effects of cigarette smoke, cessation and switching to a candidate modified risk tobacco product on the liver in *Apoe* $^{-/-}$ mice – a systems toxicology analysis. Inhalation Toxicology *28*, 226–240.

Lokke, A., Lange, P., Scharling, H., Fabricius, P., and Vestbo, J. (2006). Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. Thorax *61*, 935–939.

Lüdicke, F., Picavet, P., Baker, G., Haziza, C., Poux, V., Lama, N., and Weitkunat, R. (2018a). Effects of Switching to the Menthol Tobacco Heating System 2.2, Smoking Abstinence, or Continued Cigarette Smoking on Clinically Relevant Risk Markers: A Randomized, Controlled, Open-Label, Multicenter Study in Sequential Confinement and Ambulatory Settings (Part 2). Nicotine & Tobacco Research *20*, 173–182.

Lüdicke, F., Picavet, P., Baker, G., Haziza, C., Poux, V., Lama, N., and Weitkunat, R. (2018b). Effects of Switching to the Tobacco Heating System 2.2 Menthol, Smoking Abstinence, or Continued Cigarette Smoking on Biomarkers of Exposure: A Randomized, Controlled, Open-Label, Multicenter Study in Sequential Confinement and Ambulatory Settings (Part 1). Nicotine & Tobacco Research *20*, 161–172.

Luo, P., Wang, Q., Ye, Y., Zhang, J., Lu, D., Cheng, L., Zhou, H., Xie, M., and Wang, B. (2019). MiR-223-3p functions as a tumor suppressor in lung squamous cell carcinoma by miR-223-3p-mutant p53 regulatory feedback loop. J Exp Clin Cancer Res *38*, 74.

Lv, C., Li, F., Li, X., Tian, Y., Zhang, Y., Sheng, X., Song, Y., Meng, Q., Yuan, S., Luan, L., et al. (2017). MiR-31 promotes mammary stem cell expansion and breast tumorigenesis by suppressing Wnt signaling antagonists. Nat Commun *8*, 1036.

Madison, M.C., Landers, C.T., Gu, B.-H., Chang, C.-Y., Tung, H.-Y., You, R., Hong, M.J., Baghaei, N., Song, L.-Z., Porter, P., et al. (2019). Electronic cigarettes disrupt lung lipid homeostasis and innate immunity independent of nicotine. Journal of Clinical Investigation *129*, 4290–4304.

Malinska, D., Szymański, J., Patalas-Krawczyk, P., Michalska, B., Wojtala, A., Prill, M., Partyka, M., Drabik, K., Walczak, J., Sewer, A., et al. (2018). Assessment of mitochondrial function following short- and long-term exposure of human bronchial epithelial cells to total particulate matter from a candidate modified-risk tobacco product and reference cigarettes. Food and Chemical Toxicology *115*, 1–12.

Mallock, N., Pieper, E., Hutzler, C., Henkler-Stephani, F., and Luch, A. (2019). Heated Tobacco Products: A Review of Current Knowledge and Initial Assessments. Front. Public Health *7*, 287.

Martin, R.R., and Warr, G.A. (1977). Cigarette Smoking and Human Pulmonary Macrophages. Hospital Practice *12*, 97–104.

Martonen, T.B. (1992). Deposition patterns of cigarette smoke in human airways. Am Ind Hyg Assoc J *53*, 6–18.

Marwick, J.A., Kirkham, P.A., Stevenson, C.S., Danahay, H., Giddings, J., Butler, K., Donaldson, K., Macnee, W., and Rahman, I. (2004). Cigarette smoke alters chromatin remodeling and induces proinflammatory genes in rat lungs. Am J Respir Cell Mol Biol *31*, 633–642.

Mascaux, C., Laes, J.F., Anthoine, G., Haller, A., Ninane, V., Burny, A., and Sculier, J.P. (2009). Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis. EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL *33*, 8.

McCrea, K.A., Ensor, J.E., Nall, K., Bleecker, E.R., and Hasday, J.D. (1994). Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. Am J Respir Crit Care Med *150*, 696–703.

McGrath, T.E., Wooten, J.B., Geoffrey Chan, W., and Hajaligol, M.R. (2007). Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from tobacco: The link between low temperature residual solid (char) and PAH formation. Food and Chemical Toxicology *45*, 1039–1050.

Meo, S.A., Ansary, M.A., Barayan, F.R., Almusallam, A.S., Almehaid, A.M., Alarifi, N.S., Alsohaibani, T.A., and Zia, I. (2019). Electronic Cigarettes: Impact on Lung Function and Fractional Exhaled Nitric Oxide Among Healthy Adults. Am J Mens Health *13*, 1557988318806073.

Merecz-Sadowska, A., Sitarek, P., Zielinska-Blizniewska, H., Malinowska, K., Zajdel, K., Zakonnik, L., and Zajdel, R. (2020). A Summary of In Vitro and In Vivo Studies Evaluating the Impact of E-Cigarette Exposure on Living Organisms and the Environment. IJMS *21*, 652.

Meuwissen, R. (2005). Mouse models for human lung cancer. Genes & Development *19*, 643–664.

Miert, E.V., Vanscheeuwijck, P., Meurrens, K., Gomm, W., and Terpstra, P.M. (2008). Evaluation of the micronucleus assay in bone marrow and peripheral blood of rats for the determination of cigarette mainstream-smoke activity. Mutation Research 8.

Milara, J., and Cortijo, J. (2012). Tobacco, Inflammation, and Respiratory Tract Cancer. CPD *18*, 3901–3938.

Min, H., and Yoon, S. (2010). Got target?: computational methods for microRNA target prediction and their extension. Exp Mol Med *42*, 233.

Misra, M., Leverette, R.D., Cooper, B.T., Bennett, M.B., and Brown, S.E. (2014). Comparative In Vitro Toxicity Profile of Electronic and Tobacco Cigarettes, Smokeless Tobacco and Nicotine Replacement Therapy Products: E-Liquids, Extracts and Collected Aerosols. Int. J. Environ. Res. Public Health 23.

Moazed, F., Chun, L., Matthay, M.A., Calfee, C.S., and Gotts, J. (2018). Assessment of industry data on pulmonary and immunosuppressive effects of IQOS. Tob Control *27*, s20–s25.

Morrow, J.D., Frei, B., Longmire, A.W., Gaziano, J.M., Lynch, S.M., Shyr, Y., Strauss, W.E., Oates, J.A., and Roberts, L.J. (1995). Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. N Engl J Med *332*, 1198–1203.

Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M.C., and Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. Proceedings of the National Academy of Sciences *102*, 8905–8909.

Munakata, S., Ishimori, K., Kitamura, N., Ishikawa, S., Takanami, Y., and Ito, S. (2018). Oxidative stress responses in human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke and vapor from tobacco- and nicotine-containing products. Regulatory Toxicology and Pharmacology *99*, 122–128.

Munkholm, M., and Mortensen, J. (2014). Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. Clinical Physiology and Functional Imaging *34*, 171–177.

Nabavizadeh, P., Liu, J., Havel, C.M., Ibrahim, S., Derakhshandeh, R., Jacob III, P., and Springer, M.L. (2018). Vascular endothelial function is impaired by aerosol from a single IQOS HeatStick to the same extent as by cigarette smoke. Tob Control *27*, s13–s19.

Navas-Acien, A., Selvin, E., Sharrett, A.R., Calderon-Aranda, E., Silbergeld, E., and Guallar, E. (2004). Lead, Cadmium, Smoking, and Increased Risk of Peripheral Arterial Disease. Circulation *109*, 3196–3201.

Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., and Gonzalez, F.J. (2004). Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer. J. Biol. Chem. *279*, 23847–23850.

Neilson, L., Mankus, C., Thorne, D., Jackson, G., DeBay, J., and Meredith, C. (2015). Development of an in vitro cytotoxicity model for aerosol exposure using 3D reconstructed human airway tissue; application for assessment of e-cigarette aerosol. Toxicology in Vitro *29*, 1952–1962.

Nishimoto, S., and Nishida, E. (2006). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. EMBO Rep *7*, 782–786.

Noel, J.K., Rees, V.W., and Connolly, G.N. (2011). Electronic cigarettes: a new "tobacco" industry? Tobacco Control *20*, 81–81.

Organization, W.H.W.H. (2020). WHO Report on the Global Tobacco Epidemic 2019: Offer Help to Quit Tobacco Use (World Health Organization).

Oviedo, A., Lebrun, S., Kogel, U., Ho, J., Tan, W.T., Titz, B., Leroy, P., Vuillaume, G., Bera, M., Martin, F., et al. (2016). Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 6: 90-day OECD 413 rat inhalation study with systems toxicology endpoints demonstrates reduced exposure effects of a mentholated version compared with mentholated and non-mentholated cigarette smoke. Regulatory Toxicology and Pharmacology *81*, S93–S122.

Owen, C. (2008). Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. COPD *Volume 3*, 253–268.

Oyabu, T., Morimoto, Y., Izumi, H., Yoshiura, Y., Tomonaga, T., Lee, B.-W., Okada, T., Myojo, T., Shimada, M., Kubo, M., et al. (2016). Comparison between whole-body inhalation and nose-only inhalation on the deposition and health effects of nanoparticles. Environ Health Prev Med *21*, 42–48.

Pääkkö, P., Kokkonen, P., Anttila, S., and Kalliomäki, P.-L. (1989). Cadmium and chromium as markers of smoking in human lung tissue. Environmental Research *49*, 197–207.

Pace, E., Di Vincenzo, S., Ferraro, M., Bruno, A., Dino, P., Bonsignore, M.R., Battaglia, S., Saibene, F., Lanata, L., and Gjomarkaj, M. (2016). Carbocysteine counteracts the effects of cigarette smoke on cell growth and on the SIRT1/FoxO3 axis in bronchial epithelial cells. Experimental Gerontology *81*, 119–128.

Palazzolo, D.L., Nelson, J.M., Ely, E.A., Crow, A.P., Distin, J., and Kunigelis, S.C. (2017). The Effects of Electronic Cigarette (ECIG)-Generated Aerosol and Conventional Cigarette Smoke on the Mucociliary Transport Velocity (MTV) Using the Bullfrog (R. catesbiana) Palate Paradigm. Front. Physiol. *8*.

Palmisano, W.A., Divine, K.K., Saccomanno, G., Gilliland, F.D., Baylin, S.B., Herman, J.G., and Belinsky, S.A. (2000). Predicting Lung Cancer by Detecting Aberrant Promoter Methylation in Sputum. 6.

Pasquereau, A. (2020). CONSOMMATION DE TABAC PARMI LES ADULTES : BILAN DE CINQ ANNÉES DE PROGRAMME NATIONAL CONTRE LE TABAGISME, 2014-2019 / TOBACCO USE AMONG ADULTS: FIVE-YEAR REVIEW OF THE NATIONAL TOBACCO CONTROL PROGRAMME, 2014-2019. 8.

Pasquereau, A., Guignard, R., Andler, R., and Nguyen-Thanh, V. (2017). Electronic cigarettes, quit attempts and smoking cessation: a 6-month follow-up: Electronic cigarettes, quit attempts and smoking cessation. Addiction *112*, 1620–1628.

Pauluhn, J., and Thiel, A. (2007). A simple approach to validation of directed-flow nose-only inhalation chambers. J. Appl. Toxicol. *27*, 160–167.

Pearce, K., Gray, N., Gaur, P., Jeon, J., Suarez, A., Shannahan, J., Pappas, R.S., and Watson-Wright, C. (2020). Toxicological analysis of aerosols derived from three electronic nicotine delivery systems using normal human bronchial epithelial cells. Toxicology in Vitro *69*, 104997.

Pfeifer, G.P., and Hainaut, P. (2003). On the origin of G→T transversions in lung cancer. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis *526*, 39–43.

Pfeifer, G.P., Denissenko, M.F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S.S., and Hainaut, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. Oncogene *21*, 7435–7451.

Philibert, R.A., Sears, R.A., Powers, L.S., Nash, E., Bair, T., Gerke, A.K., Hassan, I., Thomas, C.P., Gross, T.J., and Monick, M.M. (2012). Coordinated DNA methylation and gene expression changes in smoker alveolar macrophages: specific effects on VEGF receptor 1 expression. J Leukoc Biol *92*, 621–631.

Philibert, R.A., Beach, S.R.H., Lei, M.-K., and Brody, G.H. (2013). Changes in DNA methylation at the aryl hydrocarbon receptor repressor may be a new biomarker for smoking. Clin Epigenetics *5*, 19.

Phillips, D.H. (1983). Fifty years of benzo(a)pyrene. Nature *303*, 468–472.

Phillips, D.H. (2002). Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. Carcinogenesis *23*, 1979–2004.

Phillips, D.H. (2007). The Formation of DNA Adducts. In The Cancer Handbook, (American Cancer Society), p.

Phillips, D.H., and Venitt, S. (2012). DNA and protein adducts in human tissues resulting from exposure to tobacco smoke. Int. J. Cancer *131*, 2733–2753.

Phillips, J.M., and Goodman, J.I. (2009). Inhalation of cigarette smoke induces regions of altered DNA methylation (RAMs) in SENCAR mouse lung. Toxicology *260*, 7–15.

Phillips, B., Veljkovic, E., Vuillaume, G., Martin, F., Titz, B., Leroy, P., Buettner, A., Elamin, A., Oviedo, A., and Cabanski, M. (2016). An 8-Month Systems Toxicology Inhalation/Cessation Study in Apoe2/2 Mice to Investigate Cardiovascular and Respiratory Exposure Effects of a Candidate Modified Risk Tobacco Product, THS 2.2, Compared With Conventional Cigarettes. 22.

Picavet, P., Haziza, C., Lama, N., Weitkunat, R., and Lüdicke, F. (2016). Comparison of the Pharmacokinetics of Nicotine Following Single and Ad Libitum Use of a Tobacco Heating System or Combustible Cigarettes. Nicotine Tob Res *18*, 557–563.

Piipari, R. (2004). Smoking and asthma in adults. European Respiratory Journal *24*, 734–739.

Polosa, R., Knoke, J.D., Russo, C., Piccillo, G., Caponnetto, P., Sarvà, M., Proietti, L., and Al-Delaimy, W.K. (2008). Cigarette smoking is associated with a greater risk of incident asthma in allergic rhinitis. Journal of Allergy and Clinical Immunology *121*, 1428–1434.

Polosa, R., Cibella, F., Caponnetto, P., Maglia, M., Prosperini, U., Russo, C., and Tashkin, D. (2017). Health impact of E-cigarettes: a prospective 3.5-year study of regular daily users who have never smoked. Sci Rep *7*, 13825.

Polosa, R., Morjaria, J., Prosperini, U., Russo, C., Pennisi, A., Puleo, R., Caruso, M., and Caponnetto, P. (2018). Health effects in COPD smokers who switch to electronic cigarettes: a retrospective-prospective 3-year follow-up. COPD *Volume 13*, 2533–2542.

Polzin, G.M., Kosa-Maines, R.E., Ashley, D.L., and Watson, C.H. (2007). Analysis of volatile organic compounds in mainstream cigarette smoke. Environ Sci Technol *41*, 1297–1302.

Ponce-Gallegos, M., Ramírez-Venegas, A., and Falfán-Valencia, R. (2017). Th17 profile in COPD exacerbations. COPD *Volume 12*, 1857–1865.

Port, J.L., Yamaguchi, K., Du, B., De Lorenzo, M., Chang, M., Heerdt, P.M., Kopelovich, L., Marcus, C.B., Altorki, N.K., Subbaramaiah, K., et al. (2004). Tobacco smoke induces CYP1B1 in the aerodigestive tract. Carcinogenesis *25*, 2275–2281.

Poussin, C., Laurent, A., Peitsch, M.C., Hoeng, J., and De Leon, H. (2016). Systems toxicology-based assessment of the candidate modified risk tobacco product THS2.2 for the adhesion of monocytic cells to human coronary arterial endothelial cells. Toxicology *339*, 73–86.

Products, C. for T. (2020). Modified Risk Orders. FDA.

Pryor, W.A. (1992). Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. Free Radic Biol Med *13*, 659–676.

Pryor, W.A. (1997). Cigarette Smoke Radicals and the Role of Free Radicals in Chemical Carcinogenicity. Environmental Health Perspectives *105*, 8.

Pryor, W.A., and Stone, K. (1993). Oxidants in Cigarette Smoke Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite. Ann NY Acad Sci *686*, 12–27.

Radicella, J.P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M.S., and Boiteux, S. (1997). Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae. PNAS *94*, 8010–8015.

Rahman, I., and MacNee, W. (1999). Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology *277*, L1067–L1088.

Reznick, A.Z., Cross, C.E., Hu, M.L., Suzuki, Y.J., Khwaja, S., Safadi, A., Motchnik, P.A., Packer, L., and Halliwell, B. (1992). Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. Biochem J *286 (Pt 2)*, 607–611.

Rodgman, A., and Perfetti, T.A. (2016). The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke (CRC Press).

Rojas, M. (2004). High DNA damage by benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide in bronchial epithelial cells from patients with lung cancer: comparison with lung parenchyma. Cancer Letters *207*, 157–163.

Romagna, G., Allifranchini, E., Bocchietto, E., Todeschi, S., Esposito, M., and Farsalinos, K.E. (2013). Cytotoxicity evaluation of electronic cigarette vapor extract on cultured mammalian fibroblasts (ClearStream-LIFE): comparison with tobacco cigarette smoke extract. Inhal Toxicol 8.

Ruprecht, A.A., Marco, C.D., Saffari, A., Pozzi, P., Mazza, R., Veronese, C., Angellotti, G., Munarini, E., Ogliari, A.C., Westerdahl, D., et al. (2017). Environmental pollution and emission factors of electronic cigarettes, heat-not-burn tobacco products, and conventional cigarettes. Aerosol Science and Technology *51*, 674–684.

Ryu, J.H., Colby, T.V., Hartman, T.E., and Vassallo, R. (2001). Smoking-related interstitial lung diseases: a concise review. European Respiratory Journal *17*, 122–132.

Sacks, P.G., Zhao, Z.-L., Kosinska, W., Fleisher, K.E., Gordon, T., and Guttenplan, J.B. (2011). Concentration dependent effects of tobacco particulates from different types of cigarettes on expression of drug metabolizing proteins, and benzo(a)pyrene metabolism in primary normal human oral epithelial cells. Food and Chemical Toxicology *49*, 2348–2355.

Salamanca, J.C., Munhenzva, I., Escobedo, J.O., Jensen, R.P., Shaw, A., Campbell, R., Luo, W., Peyton, D.H., and Strongin, R.M. (2017). Formaldehyde Hemiacetal Sampling, Recovery, and Quantification from Electronic Cigarette Aerosols. Sci Rep *7*, 11044.

Salman, R., Talih, S., El-Hage, R., Haddad, C., Karaoghlanian, N., El-Hellani, A., Saliba, N.A., and Shihadeh, A. (2019). Free-Base and Total Nicotine, Reactive Oxygen Species, and Carbonyl Emissions From IQOS, a Heated Tobacco Product. Nicotine & Tobacco Research *21*, 1285–1288.

Salturk, Z., Çakır, Ç., Sünnetçi, G., Atar, Y., Kumral, T.L., Yıldırım, G., Berkiten, G., and Uyar, Y. (2015). Effects of Electronic Nicotine Delivery System on Larynx: Experimental Study. Journal of Voice *29*, 560–563.

Samaha, A.-N., Yau, W.-Y.W., Yang, P., and Robinson, T.E. (2005). Rapid delivery of nicotine promotes behavioral sensitization and alters its neurobiological impact. Biological Psychiatry *57*, 351–360.

Satarug, S., and Moore, M.R. (2004). Adverse Health Effects of Chronic Exposure to Low-Level Cadmium in Foodstuffs and Cigarette Smoke. Environmental Health Perspectives *112*, 1099–1103.

Schaberg, T., Lauer, C., Lode, H., Fischer, J., and Haller, H. (1992). Increased number of alveolar macrophages expressing adhesion molecules of the leukocyte adhesion molecule family in smoking subjects. Association with cell-binding ability and superoxide anion production. Am Rev Respir Dis *146*, 1287–1293.

Schaller, J.-P., Keller, D., Poget, L., Pratte, P., Kaelin, E., McHugh, D., Cudazzo, G., Smart, D., Tricker, A.R., Gautier, L., et al. (2016a). Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 2: Chemical composition, genotoxicity, cytotoxicity, and physical properties of the aerosol. Regulatory Toxicology and Pharmacology *81*, S27–S47.

Schaller, J.-P., Pijnenburg, J.P.M., Ajithkumar, A., and Tricker, A.R. (2016b). Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 3: Influence of the tobacco blend on the formation of harmful and potentially harmful constituents of the Tobacco Heating System 2.2 aerosol. Regulatory Toxicology and Pharmacology *81*, S48–S58.

Scheffler, S., Dieken, H., Krischenowski, O., Förster, C., Branscheid, D., and Aufderheide, M. (2015). Evaluation of E-Cigarette Liquid Vapor and Mainstream Cigarette Smoke after Direct Exposure of Primary Human Bronchial Epithelial Cells. IJERPH *12*, 3915–3925.

Schembri, F., Sridhar, S., Perdomo, C., Gustafson, A.M., Zhang, X., Ergun, A., Lu, J., Liu, G., Zhang, X., Bowers, J., et al. (2009). MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 2319–2324.

Schramke, H., Roemer, E., Dempsey, R., Hirter, J., Meurrens, K., Berges, A., Weiler, H., Vanscheeuwijck, P., and Schorp, M.K. (2014). Toxicological assessment of kretek cigarettes. Part 7: The impact of ingredients added to kretek cigarettes on inhalation toxicity. Regulatory Toxicology and Pharmacology *70*, S81–S89.

Seeman, J.I., Dixon, M., and Haussmann, H.-J. (2002). Acetaldehyde in mainstream tobacco smoke: formation and occurrence in smoke and bioavailability in the smoker. Chem Res Toxicol *15*, 1331–1350.

Selman, M. (2003). The Spectrum of Smoking-Related Interstitial Lung Disorders: The Never-Ending Story of Smoke and Disease. CHEST *124*, 1185–1187.

Shaykhiev, R., Krause, A., Salit, J., Strulovici-Barel, Y., Harvey, B.-G., O'Connor, T.P., and Crystal, R.G. (2009). Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. J Immunol *183*, 2867–2883.

Shenker, N.S., Ueland, P.M., Polidoro, S., van Veldhoven, K., Ricceri, F., Brown, R., Flanagan, J.M., and Vineis, P. (2013). DNA methylation as a long-term biomarker of exposure to tobacco smoke. Epidemiology *24*, 712–716.

Sherwood, C.L., and Boitano, S. (2016). Airway epithelial cell exposure to distinct e-cigarette liquid flavorings reveals toxicity thresholds and activation of CFTR by the chocolate flavoring 2,5-dimethypyrazine. Respir Res *17*, 57.

Shields, P.G., Berman, M., Brasky, T.M., Freudenheim, J.L., Mathe, E., McElroy, J.P., Song, M.-A., and Wewers, M.D. (2017). A Review of Pulmonary Toxicity of Electronic Cigarettes in the Context of Smoking: A Focus on Inflammation. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev *26*, 1175–1191.

Shiffman, S., and Sembower, M.A. (2020). Dependence on e-cigarettes and cigarettes in a cross-sectional study of US adults. Addiction *115*, 1924–1931.

Shimada, T., and Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and1B1. Cancer Science *95*, 1–6.

Shrivastava, H.Y., Ravikumar, T., Shanmugasundaram, N., Babu, M., and Unni Nair, B. (2005). Cytotoxicity studies of chromium(III) complexes on human dermal fibroblasts. Free Radical Biology and Medicine *38*, 58–69.

Singh, K.P., Lawyer, G., Muthumalage, T., Maremanda, K.P., Khan, N.A., McDonough, S.R., Ye, D., McIntosh, S., and Rahman, I. (2019). Systemic biomarkers in electronic cigarette users: implications for noninvasive assessment of vaping-associated pulmonary injuries. ERJ Open Research *5*.

Singh, K.P., Maremanda, K.P., Li, D., and Rahman, I. (2020). Exosomal microRNAs are novel circulating biomarkers in cigarette, waterpipe smokers, E-cigarette users and dual smokers. BMC Med Genomics *13*, 128.

Sleiman, M., Logue, J.M., Montesinos, V.N., Russell, M.L., Litter, M.I., Gundel, L.A., and Destaillats, H. (2016). Emissions from Electronic Cigarettes: Key Parameters Affecting the Release of Harmful Chemicals. Environmental Science & Technology *50*, 9644–9651.

Smith, M.R., Clark, B., Lüdicke, F., Schaller, J.-P., Vanscheeuwijck, P., Hoeng, J., and Peitsch, M.C. (2016). Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 1: Description of the system and the scientific assessment program. Regulatory Toxicology and Pharmacology *81*, S17–S26.

Sohal, S.S., Eapen, M.S., Naidu, V.G.M., and Sharma, P. (2019). IQOS exposure impairs human airway cell homeostasis: direct comparison with traditional cigarette and e-cigarette. ERJ Open Res *5*, 00159–02018.

Solleti, S.K., Bhattacharya, S., Ahmad, A., Wang, Q., Mereness, J., Rangasamy, T., and Mariani, T.J. (2017). MicroRNA expression profiling defines the impact of electronic cigarettes on human airway epithelial cells. Scientific Reports *7*.

Son, Y., Mishin, V., Laskin, J.D., Mainelis, G., Wackowski, O.A., Delnevo, C., Schwander, S., Khlystov, A., Samburova, V., and Meng, Q. (2019). Hydroxyl Radicals in E-Cigarette Vapor and E-Vapor Oxidative Potentials under Different Vaping Patterns. Chem. Res. Toxicol. *32*, 1087–1095.

Sonett, J., Goldklang, M., Sklepkiewicz, P., Gerber, A., Trischler, J., Zelonina, T., Westerterp, M., Lemaître, V., Okada, Y., and Armiento, J.D. (2018). A critical role for ABC transporters in persistent lung inflammation in the development of emphysema after smoke exposure. FASEB j. *32*, 6724–6736.

Song, M.-A., Reisinger, S.A., Freudenheim, J.L., Brasky, T.M., Mathé, E.A., McElroy, J.P., Nickerson, Q.A., Weng, D.Y., Wewers, M.D., and Shields, P.G. (2020). Effects of Electronic Cigarette Constituents on the Human Lung: A Pilot Clinical Trial. Cancer Prev Res 13.

Steinmaus, C., Yuan, Y., Bates, M.N., and Smith, A.H. (2003). Case-control study of bladder cancer and drinking water arsenic in the western United States. Am J Epidemiol *158*, 1193–1201.

Stephens, W.E. (2018). Comparing the cancer potencies of emissions from vapourised nicotine products including e-cigarettes with those of tobacco smoke. Tob Control *27*, 10–17.

Sugasawa, K., Ng, J.M.Y., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P.M., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H.J. (1998). Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex Is the Initiator of Global Genome Nucleotide Excision Repair. Molecular Cell *2*, 223–232.

Sun, Y.V., Smith, A.K., Conneely, K.N., Chang, Q., Li, W., Lazarus, A., Smith, J.A., Almli, L.M., Binder, E.B., Klengel, T., et al. (2013). Epigenomic association analysis identifies smoking-related DNA methylation sites in African Americans. Hum Genet *132*, 1027–1037.

Sun, Y.-W., Kosinska, W., and Guttenplan, J.B. (2019). E-cigarette Aerosol Condensate Enhances Metabolism of Benzo(a)pyrene to Genotoxic Products, and Induces CYP1A1 and CYP1B1, Likely by Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. IJERPH *16*, 2468.

Sundar, I.K., and Rahman, I. (2016). Gene expression profiling of epigenetic chromatin modification enzymes and histone marks by cigarette smoke: implications for COPD and lung cancer. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology *311*, L1245–L1258.

Sundar, I.K., Chung, S., Hwang, J.-W., Lapek, J.D., Bulger, M., Friedman, A.E., Yao, H., Davie, J.R., and Rahman, I. (2012). Mitogen- and stress-activated kinase 1 (MSK1) regulates

cigarette smoke-induced histone modifications on NF-κB-dependent genes. PLoS One *7*, e31378.

Sundar, I.K., Nevid, M.Z., Friedman, A.E., and Rahman, I. (2014). Cigarette Smoke Induces Distinct Histone Modifications in Lung Cells: Implications for the Pathogenesis of COPD and Lung Cancer. J. Proteome Res. *13*, 982–996.

Sussan, T.E., Gajghate, S., Thimmulappa, R.K., Ma, J., Kim, J.-H., Sudini, K., Consolini, N., Cormier, S.A., Lomnicki, S., Hasan, F., et al. (2015). Exposure to Electronic Cigarettes Impairs Pulmonary Anti-Bacterial and Anti-Viral Defenses in a Mouse Model. PLoS ONE *10*, e0116861.

Szostak, J., Boué, S., Talikka, M., Guedj, E., Martin, F., Phillips, B., Ivanov, N.V., Peitsch, M.C., and Hoeng, J. (2017). Aerosol from Tobacco Heating System 2.2 has reduced impact on mouse heart gene expression compared with cigarette smoke. Food and Chemical Toxicology *101*, 157–167.

Szulakowski, P., Crowther, A.J.L., Jiménez, L.A., Donaldson, K., Mayer, R., Leonard, T.B., MacNee, W., and Drost, E.M. (2006). The Effect of Smoking on the Transcriptional Regulation of Lung Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med *174*, 41–50.

Tabuchi, T., Gallus, S., Shinozaki, T., Nakaya, T., Kunugita, N., and Colwell, B. (2018). Heat-not-burn tobacco product use in Japan: its prevalence, predictors and perceived symptoms from exposure to secondhand heat-not-burn tobacco aerosol. Tob Control *27*, e25–e33.

Takahashi, Y., Kanemaru, Y., Fukushima, T., Eguchi, K., Yoshida, S., Miller-Holt, J., and Jones, I. (2018). Chemical analysis and in vitro toxicological evaluation of aerosol from a novel tobacco vapor product: A comparison with cigarette smoke. Regulatory Toxicology and Pharmacology *92*, 94–103.

Talih, S., Balhas, Z., Salman, R., Karaoghlanian, N., and Shihadeh, A. (2016). "Direct Dripping": A High-Temperature, High-Formaldehyde Emission Electronic Cigarette Use Method. Nicotine Tob Res *18*, 453–459.

Tang, M., Wu, X.-R., Lee, H.-W., Xia, Y., Deng, F.-M., Moreira, A.L., Chen, L.-C., Huang, W.C., and Lepor, H. (2019). Electronic-cigarette smoke induces lung adenocarcinoma and bladder urothelial hyperplasia in mice. Proc Natl Acad Sci USA *116*, 21727–21731.

Taylor, M., Carr, T., Oke, O., Jaunky, T., Breheny, D., Lowe, F., and Gaça, M. (2016). E-cigarette aerosols induce lower oxidative stress in vitro when compared to tobacco smoke. Toxicology Mechanisms and Methods *26*, 465–476.

Taylor, M., Thorne, D., Carr, T., Breheny, D., Walker, P., Proctor, C., and Gaça, M. (2018). Assessment of novel tobacco heating product THP1.0. Part 6: A comparative in vitro study using contemporary screening approaches. Regulatory Toxicology and Pharmacology 9.

Thomson, N.C. (2004). Asthma and cigarette smoking. European Respiratory Journal *24*, 822–833.

Tierney, P.A., Karpinski, C.D., Brown, J.E., Luo, W., and Pankow, J.F. (2016). Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. Tob Control *25*, e10-15.

Ting, W.-J., Yang, J.-J., Kuo, C.-H., Xiao, Z.-J., Lu, X.-Z., Yeh, Y.-L., Day, C.-H., Wen, S.-Y., PadmaViswanadha, V., Jiang, C.-H., et al. (2016). Environmental tobacco smoke increases autophagic effects but decreases longevity associated with Sirt-1 protein expression in young C57BL mice hearts. Oncotarget *7*, 39017–39025.

Titz, B., Vihervaara, T., Schneider, T., Nury, C., Elamin, A., Guedj, E., Peck, M.J., Schlage, W.K., Cabanski, M., Leroy, P., et al. (2016). Effects of Cigarette Smoke, Cessation, and Switching to Two Heat-Not-Burn Tobacco Products on Lung Lipid Metabolism in C57BL/6 and Apoe2/2 Mice—An Integrative Systems Toxicology Analysis. 17.

To, M., Yamamura, S., Akashi, K., Charron, C.E., Haruki, K., Barnes, P.J., and Ito, K. (2012). Defect of adaptation to hypoxia in patients with COPD due to reduction of histone deacetylase 7. Chest *141*, 1233–1242.

Toh, C.-K. (2009). The changing epidemiology of lung cancer. Methods Mol Biol *472*, 397–411.

Tonnesen, P., Carrozzi, L., Fagerstrom, K.O., Gratziou, C., Jimenez-Ruiz, C., Nardini, S., Viegi, G., Lazzaro, C., Campell, I.A., Dagli, E., et al. (2006). Smoking cessation in patients with respiratory diseases: a high priority, integral component of therapy. European Respiratory Journal *29*, 390–417.

van der Toorn, M., Sewer, A., Marescotti, D., Johne, S., Baumer, K., Bornand, D., Dulize, R., Merg, C., Corciulo, M., Scotti, E., et al. (2018). The biological effects of long-term exposure of human bronchial epithelial cells to total particulate matter from a candidate modified-risk tobacco product. Toxicology in Vitro *50*, 95–108.

Torikaiu, K., Uwano, Y., Nakamori, T., Tarora, W., and Takahashi, H. (2005). Study on tobacco components involved in the pyrolytic generation of selected smoke constituents. Food and Chemical Toxicology *43*, 559–568.

Tsuda, S., Matsusaka, N., Ueno, S., Susa, N., and Sasaki, Y.F. (2000). The Influence of Antioxidants on Cigarette Smoke-Induced DNA Single-Strand Breaks in Mouse Organs: A Preliminary Study with the Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis Assay. Toxicol Sci *54*, 104–109.

Uchiyama, S., Senoo, Y., Hayashida, H., Inaba, Y., Nakagome, H., and Kunugita, N. (2016). Determination of Chemical Compounds Generated from Second-generation E-cigarettes Using a Sorbent Cartridge Followed by a Two-step Elution Method. Anal Sci *32*, 549–555.

Uchiyama, S., Noguchi, M., Takagi, N., Hayashida, H., Inaba, Y., Ogura, H., and Kunugita, N. (2018). Simple Determination of Gaseous and Particulate Compounds Generated from Heated Tobacco Products. Chem Res Toxicol *31*, 585–593.

Uchiyama, S., Noguchi, M., Sato, A., Ishitsuka, M., Inaba, Y., and Kunugita, N. (2020). Determination of Thermal Decomposition Products Generated from E-Cigarettes. Chem. Res. Toxicol. *33*, 576–583.

Vardavas, C.I., Anagnostopoulos, N., Kougias, M., Evangelopoulou, V., Connolly, G.N., and Behrakis, P.K. (2012). Short-term Pulmonary Effects of Using an Electronic Cigarette. Chest *141*, 1400–1406.

Voos, N., Goniewicz, M.L., and Eissenberg, T. (2019). What is the nicotine delivery profile of electronic cigarettes? Expert Opinion on Drug Delivery *16*, 1193–1203.

Vu, A.T., Taylor, K.M., Holman, M.R., Ding, Y.S., Hearn, B., and Watson, C.H. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Mainstream Smoke of Popular U.S. Cigarettes. Chemical Research in Toxicology *28*, 1616–1626.

Walele, T., Bush, J., Koch, A., Savioz, R., Martin, C., and O'Connell, G. (2018). Evaluation of the safety profile of an electronic vapour product used for two years by smokers in a real-life setting. Regulatory Toxicology and Pharmacology *92*, 226–238.

Walley, S.C., Wilson, K.M., Winickoff, J.P., and Groner, J. (2019). A Public Health Crisis: Electronic Cigarettes, Vape, and JUUL. Pediatrics *143*, e20182741.

Wan, E.S., Qiu, W., Baccarelli, A., Carey, V.J., Bacherman, H., Rennard, S.I., Agusti, A., Anderson, W., Lomas, D.A., and Demeo, D.L. (2012). Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome. Hum Mol Genet *21*, 3073–3082.

Wan, J., Johnson, M., Schilz, J., Djordjevic, M.V., Rice, J.R., and Shields, P.G. (2009). Evaluation of In Vitro Assays For Assessing the Toxicity of Cigarette Smoke and Smokeless Tobacco. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev *18*, 3263–3304.

Wang, B., Liu, Y., Luo, F., Xu, Y., Qin, Y., Lu, X., Xu, W., Shi, L., Liu, Q., and Xiang, Q. (2016). Epigenetic silencing of microRNA-218 via EZH2-mediated H3K27 trimethylation is involved in malignant transformation of HBE cells induced by cigarette smoke extract. Arch Toxicol *90*, 449–461.

Wang, G., Liu, W., and Song, W. (2019). Toxicity assessment of electronic cigarettes. Inhalation Toxicology *31*, 259–273.

Wang, M., Cheng, G., Balbo, S., Carmella, S.G., Villalta, P.W., and Hecht, S.S. (2009). Clear Differences in Levels of a Formaldehyde-DNA Adduct in Leukocytes of Smokers and Nonsmokers. Cancer Research *69*, 7170–7174.

Ward, A.M., Yaman, R., and Ebbert, J.O. (2020). Electronic nicotine delivery system design and aerosol toxicants: A systematic review. PLoS ONE *15*, e0234189.

Werley, M.S., Kirkpatrick, D.J., Oldham, M.J., Jerome, A.M., Langston, T.B., Lilly, P.D., Smith, D.C., and Jr, W.J.M. (2016). Toxicological assessment of a prototype e-cigaret device and three flavor formulations: a 90-day inhalation study in rats. 18.

White, L.D., Cory-Slechta, D.A., Gilbert, M.E., Tiffany-Castiglioni, E., Zawia, N.H., Virgolini, M., Rossi-George, A., Lasley, S.M., Qian, Y.C., and Basha, Md.R. (2007). New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead☆. Toxicology and Applied Pharmacology *225*, 1–27.

Willey, J.C., Coy, E.L., Frampton, M.W., Torres, A., Apostolakos, M.J., Hoehn, G., Schuermann, W.H., Thilly, W.G., Olson, D.E., Hammersley, J.R., et al. (1997). Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. Am J Respir Cell Mol Biol *17*, 114–124.

Williams, M., Villarreal, A., Bozhilov, K., Lin, S., and Talbot, P. (2013). Metal and Silicate Particles Including Nanoparticles Are Present in Electronic Cigarette Cartomizer Fluid and Aerosol. PLoS One *8*.

Williams, M., Bozhilov, K., Ghai, S., and Talbot, P. (2017). Elements including metals in the atomizer and aerosol of disposable electronic cigarettes and electronic hookahs. PLOS ONE *12*, e0175430.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *11*, 7.

Wirth, N., Bohadana, A., Spinosa, A., and Martinet, Y. (2009). Tabagisme et maladies respiratoires. EMC - Pneumologie *6*, 1–20.

Witschi, H. (2002). A Mouse Lung Tumor Model of Tobacco Smoke Carcinogenesis. Toxicological Sciences *68*, 322–330.

Witschi, H. (2005). Carcinogenic Activity of Cigarette Smoke Gas Phase and Its Modulation by Beta-Carotene and N-Acetylcysteine. Toxicological Sciences *84*, 81–87.

Wogan, G.N., Hecht, S.S., Felton, J.S., Conney, A.H., and Loeb, L.A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. Semin Cancer Biol *14*, 473–486.

Wong, E.T. (2016). Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 4: 90-day OECD 413 rat inhalation study with systems toxicology endpoints demonstrates reduced exposure effects compared with cigarette smoke. Regulatory Toxicology and Pharmacology 23.

Wong, H.L., Murphy, S.E., and Hecht, S.S. (2005). Cytochrome P450 2A-catalyzed metabolic activation of structurally similar carcinogenic nitrosamines: N'-nitrosonornicotine enantiomers, N-nitrosopiperidine, and N-nitrosopyrrolidine. Chem Res Toxicol *18*, 61–69.

Woodward, M., and Tunstall-Pedoe, H. (1993). Self-titration of nicotine: evidence from the Scottish Heart Health Study. Addiction *88*, 821–830.

Wu, Q., Jiang, D., Minor, M., and Chu, H.W. (2014). Electronic cigarette liquid increases inflammation and virus infection in primary human airway epithelial cells. PLoS ONE *9*, e108342.

Xi, S., Yang, M., Tao, Y., Xu, H., Shan, J., Inchauste, S., Zhang, M., Mercedes, L., Hong, J.A., Rao, M., et al. (2010). Cigarette Smoke Induces C/EBP-β-Mediated Activation of miR-31 in Normal Human Respiratory Epithelia and Lung Cancer Cells. PLOS ONE *5*, e13764.

Yamazaki, H., Inui, Y., Yun, C.H., Guengerich, F.P., and Shimada, T. (1992). Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-

nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. Carcinogenesis *13*, 1789–1794.

Yan, J.-W., Lin, J.-S., and He, X.-X. (2014). The emerging role of miR-375 in cancer: The emerging role of miR-375 in cancer. Int. J. Cancer *135*, 1011–1018.

Yao, H., and Rahman, I. (2011). Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Toxicology and Applied Pharmacology *254*, 72–85.

Yao, H., Hwang, J., Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., Leitges, M., Kishore, N., Li, X., and Rahman, I. (2010). Protein Kinase Cζ Mediates Cigarette Smoke/Aldehyde- and Lipopolysaccharide-induced Lung Inflammation and Histone Modifications. J Biol Chem *285*, 5405–5416.

Yoo, J.S., Guengerich, F.P., and Yang, C.S. (1988). Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. Cancer Res *48*, 1499–1504.

Yuchuan, H., Ya, D., Jie, Z., Jingqiu, C., Yanrong, L., Dongliang, L., Changguo, W., Kuoyan, M., Guangneng, L., Fang, X., et al. Circulating miRNAs might be promising biomarkers to reflect the dynamic pathological changes in smoking-related interstitial fibrosis. Toxicology and Industrial Health 11.

Zaghlool, S.B., Al-Shafai, M., Al Muftah, W.A., Kumar, P., Falchi, M., and Suhre, K. (2015). Association of DNA methylation with age, gender, and smoking in an Arab population. Clinical Epigenetics *7*, 6.

Zanetti, F. (2017). Comparative systems toxicology analysis of cigarette smoke and aerosol from a candidate modified risk tobacco product in organotypic human gingival epithelial cultures: A 3-day repeated exposure study. Food and Chemical Toxicology 21.

Zeilinger, S., Kühnel, B., Klopp, N., Baurecht, H., Kleinschmidt, A., Gieger, C., Weidinger, S., Lattka, E., Adamski, J., Peters, A., et al. (2013). Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. PLoS One *8*, e63812.

Zhang, S., Zhang, J., Chen, H., Wang, A., Liu, Y., Hou, H., and Hu, Q. (2019). Combined cytotoxicity of co-exposure to aldehyde mixtures on human bronchial epithelial BEAS-2B cells. Environmental Pollution *250*, 650–661.

Zhao, J. (2018). Assessment of reactive oxygen species generated by electronic cigarettes using acellular and cellular approaches. Journal of Hazardous Materials 9.

Zhao, J., Pyrgiotakis, G., and Demokritou, P. (2016). Development and characterization of electronic-cigarette exposure generation system (Ecig-EGS) for the physico-chemical and toxicological assessment of electronic cigarette emissions. Inhalation Toxicology *28*, 658–669.

Zhu, S.-H., Sun, J.Y., Bonnevie, E., Cummins, S.E., Gamst, A., Yin, L., and Lee, M. (2014). Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. Tob Control *23*, iii3–iii9.

Zhu, X., Li, J., Deng, S., Yu, K., Liu, X., Deng, Q., Sun, H., Zhang, X., He, M., Guo, H., et al. (2016). Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and Cigarette Smoking in a Chinese Population. Environ Health Perspect *124*, 966–973.

Ziegel, R., Shallop, A., Jones, R., and Tretyakova, N. (2003). K-ras gene sequence effects on the formation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-DNA adducts. Chem Res Toxicol *16*, 541–550.

Zong, D., Liu, X., Li, J., Ouyang, R., and Chen, P. (2019). The role of cigarette smoke-induced epigenetic alterations in inflammation. Epigenetics & Chromatin *12*, 65.

Zuo, L., He, F., Sergakis, G.G., Koozehchian, M.S., Stimpfl, J.N., Rong, Y., Diaz, P.T., and Best, T.M. (2014). Interrelated role of cigarette smoking, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology *307*, L205–L218.

(2004). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 83, Tobacco smoke and involuntary smoking: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 11 - 18 June 2002.

(2010a). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 92, some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 11 - 18 October 2005 (Lyon: WHO [u.a.]).

(2010b). How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the Surgeon General (Rockville, MD : Washington, DC: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General ; For sale by the Supt. of Docs., U.S. G.P.O).

(2013). Rapport et avis d'experts sur l'e-cigarette – Société de Pneumologie de Langue Française.

Annexes

Annexes

Tableau S 1. Concentrations en composés carbonylés (en ng/µg de nicotine) dans les émissions d'e-cig (Lounge,

Composés carbonylés	Lounge	Mb18W	Mb30W	HTP	3R4F
Formaldéhyde	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,7 ± 0,6
Acétaldéhyde	4,3 ± 0,7	1 ± 0,2	1,2 ± 0,3	369,2 ± 9,7	1665,7 ± 601
Propanone	0,5 ± 0,4	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	45 ± 1,2	361,7 ± 79,8
Propanal	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0	0,2 ± 0	16,1 ± 1,8	68,5 ± 19,8
Méthyl vinyl kétone	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0	5,9 ± 0,8	13,3 ± 2,2
Crotonaldéhyde	0,3 ± 0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	3,7 ± 0,5	19 ± 7,9
Méthyl éthyl kétone	0,1 ± 0,2	0,6 ± 0,4	0,2 ± 0,1	8,7 ± 0,1	89,8 ± 10
Méthylpropénal	~ ± ~	~ ± ~	~ ± ~	4,7 ± 0,3	8,5 ± 3,5
Butanal	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	15,5 ± 1,6	39,4 ± 10,4
Benzaldéhyde	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2,9 ± 2	1 ± 1,8
Isopentanal	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	7,7 ± 1,3	19,2 ± 5,9
Pentanal	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	1,8 ± 1,2	2,7 ± 1,8
Glyoxal	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	1,1 ± 0	2,1 ± 1,5
o-tolualdéhyde	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0 ± 0	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0
m-tolualdéhyde	~ ± ~	0 ± 0	0 ± 0	~ ± ~	~ ± ~
p-tolualdéhyde	0,2 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	3,2 ± 0,4	4,6 ± 3,1
Méthylglyoxal	3,3 ± 0,4	0,2 ± 0	0,3 ± 0,1	6,5 ± 1,1	9,4 ± 2,4
Hexanal	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2,1 ± 2,3	0,1 ± 0,1
2,5 diMlbenzaldéhyde	~ ± ~	0 ± 0	0 ± 0	~ ± ~	~ ± ~
Total	**10,4 ± 1,4**	**3,3 ± 0,8**	**3 ± 0,5**	**496,6 ± 12,5**	**2308 ± 743,6**

Mb18W et Mb30W), de tabac chauffé (HTP) et de cigarette (3R4F). Les données sont représentées en moyenne ± écart-type de 4 mesures indépendantes. « ~ » correspond aux valeurs sous la limite de détection (LOD).

Tableau S 2. Concentrations en HAP (en pg/µg de nicotine) dans les émissions d'e-cig (Lounge, Mb18W et Mb30W), de tabac chauffé (HTP) et de cigarette (3R4F). Les données sont représentées en moyenne ± écart-type de 4 mesures indépendantes. « ~ » correspond aux valeurs sous la limite de détection (LOD).

HAP	Lounge	Mb18W	Mb30W	HTP	3R4F
Naphtalène	8,1 ± 1,3	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,5	38 ± 7,8
Acénapthène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,2	13,9 ± 4,2
Fluorène	0,9 ± 0,4	0,1 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,3	20,9 ± 4,1
Phénanthrène	1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0	0,9 ± 0,4	29,9 ± 5,6
Anthracène	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0	14,3 ± 2,8
Fluoranthène	1,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	2,1 ± 0,9	15,5 ± 3,1
Pyrène	2,4 ± 0,6	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1	2,4 ± 1,1	18,5 ± 3,2
Benzo(c)phenanthrène	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,1	0 ± 0
Cyclopenta(c,d)pyrène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Benzo(a)anthracène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,7 ± 0,2	5,7 ± 1,6
Chrysène	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,1	5 ± 0,8
5-méthylchrysène	0,2 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	11,9 ± 3,1
Benzo(e)pyrène	0,3 ± 0	0,1 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,2	14,2 ± 3,2
Benzo(b)fluoranthène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	3,8 ± 1,3
Benzo(k)fluoranthène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,3
Benzo(a)pyrène	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,1	4,8 ± 1,2
Dibenzo(a,l)pyrène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Dibenzo(a,h)anthracène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,1
Benzo(g,h,i)pérylène	0,2 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0,3 ± 0,1	2,9 ± 0,6
Indeno(1,2,3-c,d)pyrène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	2,3 ± 0,9
Dibenzo(a,e)pyrène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0,5
Anthanthrène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,1	2,5 ± 0,6
Coronène	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0	0,3 ± 0,1
Total	**14,9 ± 2,1**	**3 ± 0,5**	**1,5 ± 0,4**	**10,6 ± 6,2**	**206,8 ± 42,3**

Tableau S 3. Listes des miARN significativement dérégulés d'un facteur au moins 1,5 (p<0,05) après des expositions de 4 jours à 30, 60 ou 90 minutes à des émissions de Mb18W ou de Mb30W ou 60 min à la fumée de cigarette.

	Mb18W 30 min	Mb18W 60 min	Mb18W 90 min	Mb30W 30 min	Mb30W 60 min	Mb30W 90 min	3R4F 60 min
miARN sous-exprimés	mmu-miR-701 hsa-miR-15a hsa-miR-15b mmu-miR-451	hsa-let-7f-1# mmu-miR-592 mmu-miR-203 hsa-miR-330-5p mmu-miR-451 hsa-miR-15b hsa-miR-30c hsa-miR-15a hsa-miR-200b mmu-miR-877# hsa-miR-27a	mmu-miR-543 hsa-let-7f-1 mmu-miR-1959 hsa-miR-193a-3p hsa-miR-199a mmu-miR-466G hsa-miR-15a hsa-miR-425-5p hsa-miR-15b	hsa-miR-367 hsa-miR-27a	mmu-miR-1971 hsa-miR-136 hsa-miR-30c mmu-miR-28	mmu-miR-1971 hsa-let-7f-1 hsa-miR-199a hsa-miR-30c hsa-miR-15b mmu-miR-451 hsa-miR-15a mmu-miR-28	mmu-miR-1971 mmu-miR-1898 mmu-miR-1935 hsa-miR-193a-3p mmu-miR-701 hsa-miR-30c mmu-miR-451 hsa-miR-15a mmu-miR-28 hsa-miR-15b mmu-miR-877 mmu-miR-466G hsa-miR-542-3p
miARN sur-exprimés	mmu-miR-337 mmu-miR-669D hsa-miR-542-3p mmu-miR-125b hsa-miR-450a mmu-miR-374-5p rno-miR-489 hsa-miR-141 mmu-miR-293 hsa-miR-331-5p	hsa-miR-542-3p hsa-miR-190 mmu-miR-376c mmu-miR-337 mmu-miR-136 hsa-miR-133a	hsa-miR-542-3p mmu-miR-376c hsa-let-7e# mmu-miR-293 mmu-miR-330 hsa-miR-154 mmu-miR-155	mmu-miR-374-5p mmu-miR-337 mmu-miR-15a mmu-miR-125b hsa-miR-449 mmu-miR-293 mmu-miR-449b hsa-miR-208b	mmu-miR-15a# mmu-miR-582-5p mmu-miR-376c mmu-miR-374-5p hsa-miR-30e mmu-miR-218-1 hsa-miR-99b rno-miR-339-3p mmu-miR-547 hsa-miR-449 mmu-miR-1188 hsa-miR-487b mmu-miR-293 mmu-miR-449b hsa-miR-154	mmu-miR-489 hsa-miR-99b rno-miR-339-3p hsa-miR-181c hsa-miR-141 mmu-miR-547 mmu-miR-293 hsa-let-7e hsa-miR-148a hsa-miR-154 hsa-miR-302b	mmu-miR-582-5p mmu-miR-489 mmu-miR-467e mmu-miR-376c rno-miR-381 hsa-miR-141 hsa-miR-190b rno-miR-339-3p mmu-miR-345-3p mmu-miR-136 mmu-miR-547 hsa-miR-494 mmu-miR-293 rno-miR-207 mmu-miR-505 mmu-miR-139-3p hsa-miR-154

Tableau S 4. Listes des miARN significativement dérégulés d'un facteur au moins 1,5 (p<0,05) après des expositons de 60 minutes pendant 3 mois à des émissions de Mb18W, de Mb30W ou à la fumée de cigarette.

	Mb18W	**Mb30W**	**3R4F**
miARN sous-exprimés	mmu-miR-673 mmu-miR-150 hsa-miR-189	hsa-miR-189	mmu-miR-330 mmu-let-7d rno-miR-632 hsa-miR-30c-2 hsa-miR-189
miARN sur-exprimés	rno-miR-551B hsa-miR-653	mmu-miR-34b-5p mmu-miR-1949 hsa-miR-223 hsa-miR-190b	hsa-miR-539 hsa-miR-487b hsa-miR-205 mmu-miR-544 hsa-miR-133a hsa-miR-133b

Tableau S 5. Listes des miARN significativement dérégulés d'un facteur au moins 1,5 (p<0,05) après des expositons de 60 minutes pendant 6 mois à des émissions de Mb18W, de Mb30W ou à la fumée de cigarette.

	Mb18W	**Mb30W**	**3R4F**
miARN sous-exprimés	mmu-miR-21 hsa-miR-653	mmu-let-7d hsa-miR-590-5p mmu-miR-10b mmu-miR-499	mmu-miR-1193 hsa-miR-494 mmu-miR-1939 hsa-miR-223
miARN sur-exprimés	hsa-miR-375 hsa-miR-708	hsa-miR-296 hsa-miR-223 mmu-miR-1932 rno-miR-24-1	hsa-miR-375 mmu-miR-34b hsa-miR-448 mmu-miR-764-5p

Article

Journal of Hazardous Materials 401 (2021) 123417

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

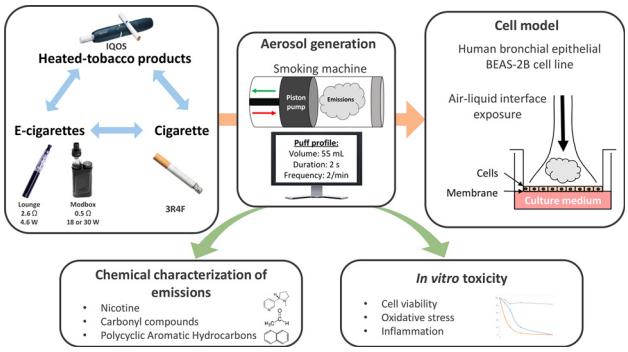
journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat

Comparison of the chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells

Romain Dusautoir[a], Gianni Zarcone[a], Marie Verriele[b], Guillaume Garçon[a], Isabelle Fronval[b], Nicolas Beauval[a], Delphine Allorge[a], Véronique Riffault[b], Nadine Locoge[b], Jean-Marc Lo-Guidice[a], Sébastien Anthérieu[a,*]

[a] Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, ULR 4483, IMPECS - IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000, Lille, France
[b] IMT Lille Douai, Univ. Lille, SAGE, F-59000, Lille, France

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Editor: R Teresa

Keywords:
Heat-not-burn tobacco
e-Cigarette
Lung
PAHs
Carbonyls
Toxicity

ABSTRACT

The electronic cigarettes (e-cigs) and more recently the heated tobacco products (HTP) provide alternatives for smokers as they are generally perceived to be less harmful than conventional cigarettes. However, it is crucial to compare the health risks of these different emergent devices, in order to determine which product should be preferred to substitute cigarette. The present study aimed to compare the composition of emissions from HTP, e-cigs and conventional cigarettes, regarding selected harmful or potentially harmful compounds, and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells. The HTP emitted less polycyclic aromatic hydrocarbons and carbonyls than the conventional cigarette. However, amounts of these compounds in HTP aerosols were still higher than in e-cig vapours. Concordantly, HTP aerosol showed reduced cytotoxicity compared to cigarette smoke but higher than e-cig vapours. HTP and e-cig had the potential to increase oxidative stress and inflammatory response, in a manner similar to that of cigarette smoke, but after more intensive exposures. In

Abbreviations: ALI, air-liquid interface; e-cig, electronic cigarette; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; HTP, heated tobacco products; Mb18W, Modbox e-cig model set at 18 W; Mb30W, Modbox e-cig model set at 30 W; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons

* Corresponding author at: ULR4483 IMPECS, Faculté de Médecine - Pôle Recherche, 1 Place de Verdun, 59045, Lille Cedex, France.
E-mail addresses: dusautoir.romain@gmail.com (R. Dusautoir), gianni.zarcone@univ-lille.fr (G. Zarcone), marie.verriele@imt-lille-douai.fr (M. Verriele), guillaume.garcon@univ-lille.fr (G. Garçon), isabelle.fronval@imt-lille-douai.fr (I. Fronval), nicolas.beauval@chru-lille.fr (N. Beauval), delphine.allorge@univ-lille.fr (D. Allorge), veronique.riffault@imt-lille-douai.fr (V. Riffault), nadine.locoge@imt-lille-douai.fr (N. Locoge), jean-marc.lo-guidice@univ-lille.fr (J.-M. Lo-Guidice), sebastien.antherieu@univ-lille.fr (S. Anthérieu).

https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123417
Received 6 May 2020; Received in revised form 29 June 2020; Accepted 5 July 2020
Available online 07 July 2020
0304-3894/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

addition, increasing e-cig power impacted levels of certain toxic compounds and related oxidative stress. This study provides important data necessary for risk assessment by demonstrating that HTP might be less harmful than tobacco cigarette but considerably more harmful than e-cig.

1. Introduction

The tobacco epidemic causes 8 million deaths each year worldwide. Responsible for almost 30 % of cancer-related deaths (especially 90 % of lung cancers) and being the major risk factor for chronic obstructive pulmonary diseases, smoking is the main single cause of preventable deaths in the world (WHO, 2019). Out of the more than 7000 chemicals present in tobacco smoke, at least 250 are known to be harmful and about 70 can cause cancer: benzene, formaldehyde, acetaldehyde, acrylamide, nitrosamines, arsenic, cadmium… There is no safe level of tobacco use and quitting smoking significantly reduces the risk of developing smoking-related diseases. Although the health benefits are greater for people who stop at earlier ages, benefits exist at any age (Babb et al., 2017). However, smoking cessation is a difficult and challenging task because of the addictive power of nicotine, which is naturally found in tobacco (Benowitz, 2010). Nicotine replacement therapy (mostly available as transdermal patch, nasal spray, inhaler, gum and sublingual tablets) can help to increase chances of sustainable smoking cessation (Stead et al., 2012). However, none of these devices mimic the feeling of satisfaction that occurs with the rapid and abundant delivery of nicotine during smoking. New alternatives to regular cigarettes, such electronic cigarettes (e-cigs) and heated tobacco products (HTP), also called heat-not-burn tobaccos, have emerged on the market over the past decade. The e-cigs and emergent tobacco products are generally perceived as low-risk substitutes for cigarette and have quickly gained popularity, well before sufficient scientific evidence would allow to determine their potential detrimental effects on users.

E-cigs comprise a battery-powered heating element that is designed to vaporize a solution ("e-liquid") made of propylene glycol and/or glycerine and frequently flavouring and nicotine. The vapour is then inhaled by the user. Concerns raised about the levels of some harmful constituents found in e-cig aerosols, such as carbonyl compounds (including formaldehyde, acetaldehyde and acrolein) (Beauval et al., 2017, 2019; Belushkin et al., 2020) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (including benzo[*a*]pyrene) (Beauval et al., 2017; Belushkin et al., 2020), which may be produced by thermal decomposition of e-liquid components. The presence of several trace metals was also reported in e-cig emissions, likely released by cartomizer components (Beauval et al., 2017; Zhao et al., 2019). In parallel, some studies investigated the effects of e-cig vapour exposure on human bronchial epithelial cells cultured at air-liquid interface, and found that e-vapours did not lead to significant cytotoxicity, but induced oxidative stress and/or increased the secretion of pro-inflammatory mediators (Anthérieu et al., 2017; Iskandar et al., 2016; Scheffler et al., 2015). In addition, transcriptomic modifications induced by e-cig vapour exposure were demonstrated to be lesser than those induced by tobacco smoke (Anthérieu et al., 2017; Iskandar et al., 2016). Evolution in e-cig devices (especially the development of a new e-cig generation with high power, sub-Ohm devices) may increase the amounts of harmful and potentially-harmful compounds in emissions (Beauval et al., 2019; Belushkin et al., 2020; Farsalinos et al., 2018c; Zhao et al., 2019). Consequently, further research is needed to better understand the impacts of e-cig model and power output on cellular toxicity.

Although e-cig could help to quit smoking (Kalkhoran et al., 2019; Nelson et al., 2015), some vapers could be unsatisfied because e-cig devices do not use real tobacco ingredients and lack the so-called "throat-hit" or authentic tobacco tastes that cigarettes offer. These elements may encourage some people to go back to conventional cigarettes (Staal et al., 2018). Therefore, tobacco companies developed new tobacco products to keep meeting the changing needs of their consumers. They launched HTP that taste more like conventional cigarettes while still delivering nicotine to consumers. In particular, Philip Morris International created the IQOS device: disposable tobacco sticks soaked in glycerine (called heatsticks) are inserted in a holder in the IQOS device and heated with an electric blade (Smith et al., 2016). These new devices are marketed by Philip Morris International as products that do not combust tobacco, as cigarettes do, but heat it to a lower temperature (less than 350 °C) with the aim to avoid the combustion-related production of harmful compounds. To support the health claims of IQOS, Philip Morris International published several peer-reviewed papers (Malinska et al., 2018; Schaller et al., 2016a,b; Sewer et al., 2016; Smith et al., 2016; van der Toorn et al., 2015; Wong et al., 2016). They showed a reduction of most of the harmful constituents found in tobacco smoke (carbonyl compounds, PAHs, nitrosamines…), as well as a reduction of cytotoxicity and genotoxicity in comparison to cigarette smoke exposure (Schaller et al., 2016a). Today, most data about HTP are published by HTP or tobacco industries themselves and toxicity assessment is limited to a comparison with cigarette smoke. However, it is crucial for smokers to know the toxicity of HTP compared to conventional cigarette and e-cigs.

The aim of this study is to compare the chemical composition and the toxicological effects of aerosols from HTP (iQOS model), conventional cigarette smoke (3R4F) and vapours from one nicotine-containing e-liquid vaporized by different e-cig models or conditions (a second generation "Lounge" model with 2.6 Ohms coil and 4.6 W-fixed power and a third generation "Modbox" model with 0.5 Ohms coil and set at 18 W (Mb18W) or 30 W (Mb30W) power). Chemical characterization analyses focused on nicotine, carbonyl compounds and PAHs. The toxicity of the aerosols was evaluated in the air-liquid interface-cultured BEAS-2B cell line, which is the most commonly used human bronchial epithelial cell line for respiratory toxicological studies. Cellular effects were assessed by measuring cytotoxicity, oxidative stress and inflammatory response, which are key mechanisms leading to chronic respiratory diseases.

2. Material and methods

2.1. Tobacco products and e-cig

The HTP used in this study was the iQOS 2.4 model manufactured by Philip Morris (Neuchâtel, Switzerland), with iQOS heatsticks (amber box from Philip Morris) purchased in a local tobacco shop. IQOS was cleaned regularly after each 20th heatstick, as recommended by the manufacturer. Two models of e-cig from a French manufacturer (NHOSS® brand) were used in these experiments. The first one was the second generation "Lounge" model, equipped with a 2.8 Ω nichrome coil and 4.6 W power supply. The coil heating was triggered by air suction. The second one was the third generation "ModBox" model, used with the "Air Tank" clearomiser equipped with a 0.5 Ω kanthal coil and with a partially closed air flow. Heating was pre-activated 1 s prior the puff, as recommended by the manufacturer and accordingly with the CORESTA standard puffing method CRM81 (CORESTA, 2015). Modbox model was tested at two power settings, 18 W and 30 W. These settings correspond to the lower and upper range power supplies recommended by the manufacturer for the coils used. One e-liquid was used, "blond tobacco" flavoured (NHOSS® brand) and labelled as follows: propylene glycol < 65 %; glycerol < 35 %; food flavourings; nicotine 16 mg/mL. 3R4F research cigarettes were purchased from the University of Kentucky (Lexington, KY, USA).

2.2. Aerosol generation

Aerosols from HTP, e-cig and 3R4F cigarette were generated with a Vitrocell® VC1 smoking machine (Vitrocell, Waldkirch, Germany), as described previously (Anthérieu et al., 2017; Beauval et al., 2017, 2019). All products were tested with Health Canada Intense (HCI) puff profile (55 mL puff volume, 2 s puff duration, 30 s puff period). For 3R4F cigarette, all ventilation holes were blocked using adhesive tape during the experiments to follow the recommendations of this smoking regime (WHO Tobacco Laboratory, 2012). Under these settings, one 3R4F cigarette was completely consumed after 10 puffs and one heatstick was limited to 12 puffs by the IQOS device.

2.3. Quantification of nicotine

Nicotine was collected from aerosols into two glass impingers with fritted nozzle placed in series containing 50 and 25 mL of methanol, respectively, maintained at −40 °C. Quantification of nicotine in aerosol extracts was performed as described previously (Beauval et al., 2017). Each collection was replicated four times.

2.4. Identification and quantification of carbonyl compounds

Carbonyls were collected from aerosols into two silica cartridges coated with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) placed in series, as described previously (Beauval et al., 2019). Sep-Pak DNPH-Silica Plus Short Cartridges containing 350 or 750 mg of sorbent per cartridge (Waters, Guyancourt, France) were used for e-cig and iQOS aerosols or cigarette smoke, respectively. Each collection was replicated four times. Blank collections were performed using the smoking machine working without e-cig, HTP or conventional cigarette connected to and were taken into account for data analysis. DNPH cartridges were eluted with 3 or 6 mL of acetonitrile for short and long cartridges, respectively. Elutions from both cartridges placed in series were pooled and then injected into a Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 UHPLC System with UV/VIS Detector (Thermo Scientific, Waltham, MA). The UHPLC instrument was operated at 28 C° at a constant flow rate of 0.4 mL/min, under a gradient of acetonitrile and water during 15 min. Analysis was performed using Acclaim Carbonyl C18 RSCL 150 mm x 2.1 mm x 5 µM (Thermo Fisher Scientific). Acquisition was performed at 360 nm wavelength. Instrument monitoring and data acquisition were done using Chromeleon 7.0 Data Acquisition System for LC (Thermo Scientific, Waltham, MA). The method allows the detection and quantification of nineteen compounds (Table 1) with limits of quantification (LOQs) ranging from 6 to 15 ng/mL. Acrolein was not measured in this study due to the unsuitability of using the DNPH-coated solid sorbent cartridge for its collection (Ho et al., 2011).

The number of puffs for each collection was determined in preliminary experiments in order to avoid saturation in the cartridges. Finally, for e-cig, HTP and 3R4F analyses, 20, 4 and 1 puff(s) were respectively found to be the best compromise with satisfying efficiency without saturation of the cartridge (data not shown). Moreover, concerning e-cig, we measured carbonyl emissions in the twenty last puffs of one-hour-exposure session (100–120 puffs). To compare the different aerosol samples, the levels of the carbonyls were then expressed in mass of each compounds by puff.

2.5. Identification and quantification of PAHs

PAHs were collected from aerosols simultaneously with nicotine collection in the same impingers, as described previously (Beauval et al., 2017). Each collection was replicated four times. Blank collections were performed using the smoking machine working without e-cig, HTP or conventional cigarette connected to and were taken into account for data analysis. Methanolic samples were first concentrated under a gentle nitrogen flow in a water bath at 45 °C to a final volume of 1 mL in order to subsequently extract PAHs using accelerated solvent extraction with acetonitrile. This extraction was followed by a second concentration step under a gentle nitrogen flow in a water bath at 60 °C to a final volume of 1 mL. Remaining products were then filtrated with a syringe membrane filter before injection into the chromatographic system. The analyses were performed on HPLC Alliance 2695 (Waters Corporation, MA) coupled with a multi-wavelength fluorescence detector. Chromatographic separation was achieved on a EC 250/2 Nucleosil 100 − 5 C18 PAH (Macherey Nagel, Hoerdt, France). The method allows the detection and quantification of twenty-three compounds (Table 2) with LOQs ranging from 1 to 39 pg/mL.

2.6. Cell culture and cell exposure to aerosols

In vitro experiments were performed using the human bronchial epithelial BEAS-2B cell line obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® CRL9609™). Cells were cultured in LHC-9 medium (Life Technologies, Courtabœuf, France) and seeded in CellBIND 75 cm^2

Table 1
Carbonyl concentrations (in ng/puff) in e-cig (Lounge, Mb18W or Mb30W), HTP and 3R4F cigarette aerosols. Data represent the mean ± SD of four independent measurements. "∼" : undetectable as < to LOD.

	Lounge	Mb18W	Mb30W	HTP	3R4F
Formaldehyde	6.0 ± 0.7	25.8 ± 2.8	64.5 ± 23.7	156.9 ± 9.4	255.5 ± 60.8
Acetaldehyde	32.9 ± 5.4	63.0 ± 10.3	160.9 ± 46.4	26,687.7 ± 657.8	16,6345.0 ± 59,540.1
Propanone	3.9 ± 2.7	13.8 ± 3.0	28.5 ± 8.1	3,132.3 ± 149.1	36,075.8 ± 7,896.5
Propanal	2.1 ± 0.7	8.4 ± 2.4	23.2 ± 5.6	1,400.1 ± 205.8	6,924.8 ± 1,688.2
Methyl vinyl ketone	0.2 ± 0.1	6.4 ± 4.2	6.4 ± 2.1	443.1 ± 42.1	1,341.1 ± 219.3
Crotonaldehyde	2.4 ± 0.1	16.1 ± 3.3	38.8 ± 8.1	139.9 ± 10.2	1,697.4 ± 794.5
Methyl ethyl ketone	0.8 ± 1.6	34.7 ± 23.6	23.5 ± 9.5	625.6 ± 26.9	9,005.1 ± 1,097.8
Methylpropenal	∼ ± ∼	∼ ± ∼	∼ ± ∼	334.8 ± 20.6	842.4 ± 350.7
Butanal	0.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1	985.9 ± 94.7	3,653.9 ± 1,055.0
Benzaldehyde	0.5 ± 0.1	2.5 ± 0.3	3.2 ± 0.1	58.9 ± 2.8	63.6 ± 59.3
Isopentanal	0.7 ± 0.1	7.9 ± 1.1	11.5 ± 0.6	391.3 ± 37.6	2,084.9 ± 5,990.0
Pentanal	0.5 ± 1.1	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	25.2 ± 1.4	172.0 ± 50.5
Glyoxal	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	40.7 ± 9.2	308.2 ± 92.0
o-Tolualdehyde	0.7 ± 0.1	2.9 ± 0.5	2.8 ± 0.5	6.3 ± 0.4	29.0 ± 2.8
m-Tolualdehyde	∼ ± ∼	1.0 ± 0.6	1.1 ± 0.8	∼ ± ∼	∼ ± ∼
p-Tolualdehyde	1.7 ± 0.4	0.9 ± 0.6	0.6 ± 0.7	115.0 ± 26.4	291.8 ± 195.8
Methylglyoxal	25.2 ± 3.1	12.2 ± 1.1	44.1 ± 10.9	490.1 ± 69.8	982.0 ± 249.0
Hexanal	0.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1	22.1 ± 11.8	10.4 ± 12.1
2,5-Dimethylbenzaldehyde	∼ ± ∼	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	∼ ± ∼	∼ ± ∼
Total carbonyl compounds	**79 ± 10**	**201 ± 48**	**415 ± 63**	**35,056 ± 825**	**230,083 ± 70,153**

Table 2
PAH concentrations (in pg/puff) in e-cig (Lounge, Mb18W or Mb30W), HTP and 3R4F cigarette aerosols. Data represent the mean ± SD of four independent measurements. "~" : undetectable as < to LOD.

	Lounge	Mb18W	Mb30W	HTP	3R4F
Naphthalene	61.5 ± 9.5	75.9 ± 5.6	92.2 ± 6.2	71.2 ± 38.8	3,598.6 ± 735.4
Acenaphthene	0.2 ± 0.1	2.6 ± 1.1	5.0 ± 1.4	12.5 ± 13.6	1,318.2 ± 397.5
Fluorene	6.7 ± 3.3	6.7 ± 1.5	5.0 ± 1.3	26.0 ± 22.4	1,976.7 ± 387.6
Phenanthrene	7.2 ± 0.7	25.2 ± 8.2	22.8 ± 3.5	55.9 ± 34.7	2,829.4 ± 533.3
Anthracene	0.6 ± 0.1	1.7 ± 0.4	2.8 ± 3.7	4.7 ± 2.3	1,356.2 ± 266.7
Fluoranthene	9.2 ± 1.4	20.1 ± 11.8	11.5 ± 11.8	131.0 ± 79.0	1,463.5 ± 288.7
Pyrene	17.9 ± 4.3	30.9 ± 9.2	30.9 ± 10.9	153.0 ± 98.6	1,752.4 ± 304.4
Benzo(c)phenanthrene	1.9 ± 0.6	4.5 ± 2.1	3.1 ± 4.4	10.2 ± 6.9	1.5 ± 0.6
Benzo(a)anthracene	0.2 ± 0.0	2.6 ± 0.8	3.2 ± 4.0	43.8 ± 23.3	542.5 ± 150.1
Chrysene	0.4 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.5 ± 4.0	26.3 ± 13.8	471.7 ± 72.5
5-Methylchrysene	1.5 ± 0.4	1.0 ± 0.7	0.6 ± 0.4	1.7 ± 1.0	1,130.5 ± 293.9
Benzo(e)pyrene	1.9 ± 0.2	6.1 ± 2.5	5.3 ± 3.6	22.9 ± 17.1	1,343.9 ± 303.1
Benzo(b)fluoranthene	0.3 ± 0.1	1.2 ± 0.2	4.2 ± 7.1	18.9 ± 8.9	358.9 ± 125.6
Benzo(k)fluoranthene	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.4 ± 2.2	18.4 ± 11.1	99.6 ± 28.1
Benzo(a)pyrene	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	1.1 ± 0.3	25.6 ± 13.8	457.6 ± 114.5
Dibenzo(a,l)pyrene	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2
Dibenzo(a,h)anthracene	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.3	0.8 ± 0.4	38.4 ± 11.8
Benzo(g,h,i)perylene	1.5 ± 0.7	0.9 ± 0.2	4.8 ± 3.1	16.6 ± 8.9	276.2 ± 55.9
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	1.5 ± 2.0	6.6 ± 5.6	214.0 ± 81.4
Dibenzo(a,e)pyrene	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.3	0.5 ± 0.3	92.4 ± 43.5
Anthanthrene	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	11.7 ± 6.7	233.9 ± 52.6
Coronene	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	2.8 ± 1.0	5.5 ± 1.8	25.6 ± 5.4
Cyclopenta(c,d)pyrene	~ ± ~	~ ± ~	~ ± ~	~ ± ~	~ ± ~
Total PAHs	**113 ± 16**	**183 ± 29**	**202 ± 57**	**664 ± 389**	**19,582 ± 400**

tissue culture flasks (Corning, Amsterdam, Netherlands) at 37 °C in a humidified incubator with 5 % CO_2 in air and 85 % relative humidity. Cell passaging was performed when cells reached 80–90 % confluence. Following subculture, cells were transferred to an air-liquid interface (ALI) system. Cells were seeded (18 000 cells/cm^2) onto transwell clear culture inserts (4.67 cm^2) with 0.4 µm pore size (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pre-coated with 0.03 mg/mL type I collagen solution (Life Technologies). BEAS-2B cells were firstly maintained submerged, then ALI was established by removing medium from the apical surface, exposing only the basal surface to medium. Cells were then transferred to an exposure module (Vitrocell 6/4 CF module) and exposed to different doses (defined in puff number) of the undiluted HTP, e-cig or cigarette aerosol generated by the Vitrocell® system. Control cells were unexposed cells, which were left in the incubator. Each exposure was replicated in three independent cell cultures.

2.7. Cell viability

BEAS-2B cells were exposed to different puff number of undiluted aerosols (40, 80 and 120 puffs for e-cig; 2, 12, 40, 80 and 120 puffs for HTP and 1, 2, 4 and 10 puffs for 3R4F cigarette) and cell viability was measured 24 h after exposure *via* the Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability assay kit (Promega, Charbonnières, France), as described previously (Anthérieu et al., 2017). Intracellular ATP was determined as percentages related to the ATP content in control cells arbitrarily set at a value of 100 %.

2.8. Glutathione content assay

The GSH/GSSG-Glo™ Assay (Promega) was used following the manufacturer's guidelines for the determination of total glutathione and oxidized glutathione (GSSG). Finally, GSSG/GSH ratios were calculated and results are expressed as fold-change relative to the GSSG/GSH ratio in control cells arbitrarily set at a value of 1.

2.9. Gene expression analysis

The total RNA of BEAS-2B cells was extracted using the RNeasy plus mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. Expression of target genes was measured by quantitative real-time PCR of corresponding reverse-transcribed mRNA. One µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNAs using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied biosystems, CA, USA). qPCRs were carried out with the StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems), using the TaqMan Fast advanced Master Mix (Applied Biosystems) and the following TaqMan Assays: Hs99999901_s1, *18S*; Hs01054797_g1, *CYP1A1*; Hs00164383_m1 *CYP1B1*; Hs01110250_m1, *HMOX1*; Hs01045993_g1, *NQO1*. Amplification curves were read with the StepOne software V2.1 using the comparative cycle threshold method. The relative quantification of the steady-state mRNA levels was normalized against *18S* RNA. Results are expressed as fold-change relative to the levels in control cells arbitrarily set at a value of 1.

2.10. Measurement of secreted mediators of inflammation

Concentrations of ten secreted inflammation mediators were measured in the basolateral media of BEAS-2B cells: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), growth regulated oncogene α (GRO-α), interleukin 1ß (IL-1ß), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), interleukin 13 (IL-13), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 α), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and interferon gamma (INF-γ). The assay has been performed based on the recommendations of the Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel kit (Merck Millipore, Molsheim, France) using the Luminex® xMAP® technology (Luminex Corp., Austin, TX). The capacity of BEAS-2B cells to secrete various mediators of inflammation had been previously tested by treating cells with lipopolysaccharide (Anthérieu et al., 2017).

2.11. Statistical analysis

Data were represented by the mean ± SD of four independent measurements. Statistical analyses were performed using the non-parametric Mann-Whitney test. Data were considered significantly different when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Chemical characterization of aerosols

3.1.1. Nicotine content

The potential of the HTP and e-cig to substitute cigarette smoking is expected to be at least dependent on the level of nicotine delivered in their aerosols and subsequently inhaled by the user (Farsalinos et al., 2018a). Therefore, the levels of nicotine present in the HTP aerosols were determined and compared with those in the tobacco cigarette smoke and vapours from different e-cig models used with an e-liquid containing 16 mg/mL of nicotine. Levels of nicotine delivered to the aerosols are presented in Fig. 1. HTP delivered about 30 % less nicotine to its aerosol (63 µg/puff) than the 3R4F cigarette (95 µg/puff) under the HCI puffing profile, as described in other studies (Belushkin et al., 2020; Farsalinos et al., 2018a; Li et al., 2019; Schaller et al., 2016a). For e-cig emissions, the second generation Lounge model provided strongly less nicotine amounts (8 µg/puff) than the two tobacco products tested, while the third generation Modbox model delivered 60 µg/puff at 18 W setting and 137 µg/puff at 30 W setting. Increasing power supply of e-cig has already been shown to increase nicotine level in vapour, mostly due to a more efficient vaporization of the e-liquid (Talih et al., 2015). In summary, the nicotine delivery is highly variable (from 8 to 137 µg of nicotine/puff) depending on the device in comparable conditions of use (under HCI puffing regime). This parameter is important, while it is expected a phenomenon of nicotine self-titration with smokers who want to switch from cigarette to nicotine-delivering alternatives, such as e-cig or HTP (Farsalinos et al, 2018d; Woodward and Tunstall-Pedoe, 1993). To compensate and obtain a similar nicotine amount from HTP or e-cig as from tobacco cigarette, they might adopt a more intense "puffing regime" and/or consume more puffs with HTP or e-cig. Consequently, the nicotine concentrations in emissions will be used to estimate a "normalized" exposure to other harmful and potentially harmful compounds.

3.1.2. Carbonyl and PAH contents

Carbonyls and PAHs are part of principal compounds released from the tobacco combustion and many of them contribute significantly to the carcinogenic activity of tobacco smoke (IARC, 2004). Indeed, the carbonyl compounds, formaldehyde and acetaldehyde, are respectively classified as carcinogenic (Group 1) and possibly carcinogenic (Group 2B) to humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2016). Among the PAHs, the benzo[*a*]pyrene is classified in Group 1 and the dibenzo[*a*,*h*]anthracene in Group 2A as probably carcinogenic to humans. Within the framework of tobacco harm reduction, it appears interesting to measure and compare the levels of these harmful and potentially harmful compounds in the emissions of HTP and e-cig.

The emission of nineteen carbonyl compounds in the aerosols of HTP, 3R4F cigarette and e-cigs was first analysed and results (expressed in mass of each compound per puff) are reported in Table 1. Fifteen compounds were quantified at levels between 2 and 15 times higher in cigarette smoke than in HTP aerosols. Hexanal was the only compound measured at a higher level in HTP emission (22.1 ng/puff) than in 3R4F tobacco smoke (10.4 ng/puff), and benzaldehyde was generated in almost equivalent amounts by HTP and cigarette. By contrast, all the carbonyl compounds were measured at very lower amounts in vapours from the different tested e-cig conditions in comparison to tobacco products, except for m-tolualdehyde and 2,5 dimethylbenzaldehyde which were only detected in aerosols from the Modbox device, at both low and high-power settings. Fig. 2-A represents the sum of total carbonyl compounds measured in e-cig, HTP and 3R4F emissions. There are much less carbonyl compounds produced in one puff of HTP (35 µg/puff) than in one puff of cigarette smoke (230 µg/puff). Indeed, HTP emitted 84.7 % less carbonyl compounds than 3R4F cigarette (Fig. 2B). Levels of carbonyl compounds measured in vapours from different e-cig models were even at least 98.5 % weaker than in HTP aerosols. Comparison of data between different e-cig devices showed that Lounge and Mb18W emitted respectively 82.3 % and 51.4 % less carbonyl compounds than Mb30W (0.4 µg/puff) (Fig. 2A and B).

These different tobacco products and e-cigs produced carbonyls at very different levels in emissions, probably because they generat aerosols *via* different processes and from diverse materials (tobacco fillers or e-liquid). During smoking, carbonyls are mainly produced by the pyrolysis of carbohydrates contained in tobacco (Seeman et al., 2002) at high temperature (up to 900 °C). The aerosolization process of HTP operates at temperatures less than 350 °C with the use of heatsticks containing tobacco leaves soaked in propylene glycol. These devices are often referred to as "heat-not-burn" tobacco products with a reduction of the user's exposure to carcinogenic chemicals usually produced by the combustion of tobacco (Schaller et al., 2016a). We effectively observed a reduction of about 90 % in carbonyl emissions in accordance with data from the IQOS manufacturer (Schaller et al., 2016a,b) and two independent studies (Farsalinos et al., 2018b; Li et al., 2019). However, several harmful carbonyls were still measured in HTP aerosol, such as acetaldehyde and formaldehyde, which are carcinogenic compounds. The presence of high levels of acetaldehyde is the mark of pyrolysis and thermogenic degradation of tobacco (Auer et al., 2017). By contrast, the main source of carbonyls in e-cig emissions is the thermal degradation of glycerol and propylene glycol contained in the e-liquid (Uchiyama et al., 2020). Some carbonyls were quantifiable in the different vapours of tested e-cig, but several times far lower than in the emissions from both tested tobacco products (Table 1). In addition, there is a relation between the operating power or the e-cig model and the concentrations of carbonyl compounds detected in the e-cig aerosols. The power of e-cig, and therefore ultimately the heat generated on the evaporation coil, has been reported to affect the quantity of carbonyls formed (Geiss et al., 2016; Kosmider et al., 2014; Talih et al., 2016). Some studies reported higher carbonyl amounts in e-cig emissions (Goniewicz et al., 2014; Hutzler et al., 2014; Sleiman et al., 2016; Talih et al., 2015). However, these findings have been questioned as they could be the consequence of using unrealistic or extreme conditions (low interpuff interval or high power generating high temperatures, drypuff phenomenon) (Farsalinos et al., 2015, 2017). Indeed, e-cig can release high levels of aldehydes if the e-liquid is overheated, but the overheating generates an aversive taste that would secure such emissions to be avoided. To ensure realistic experimental conditions, two regular e-cig users tested the e-cigs used in our study for the generation of dry puffs, using the puff duration and power settings as tested with the smoking machine. The users confirmed no dry puff sensation and sufficient vapour production. In addition, the temperature of the generated aerosol was also considered as an indicator of experimental

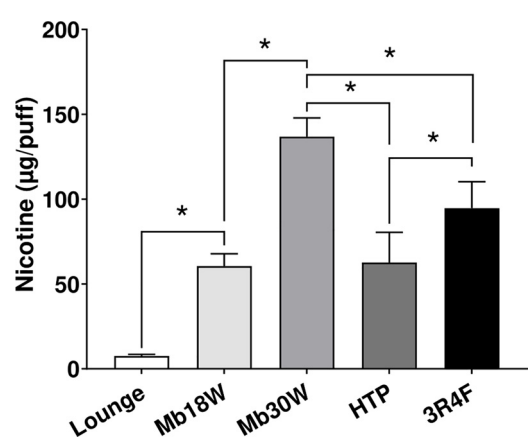


Fig. 1. Nicotine levels (in µg/puff) in e-cig (Lounge, Mb18W or Mb30W), HTP and 3R4F cigarette aerosols. Data represent the mean ± SD of four independent measurements. *$p < 0.05$.

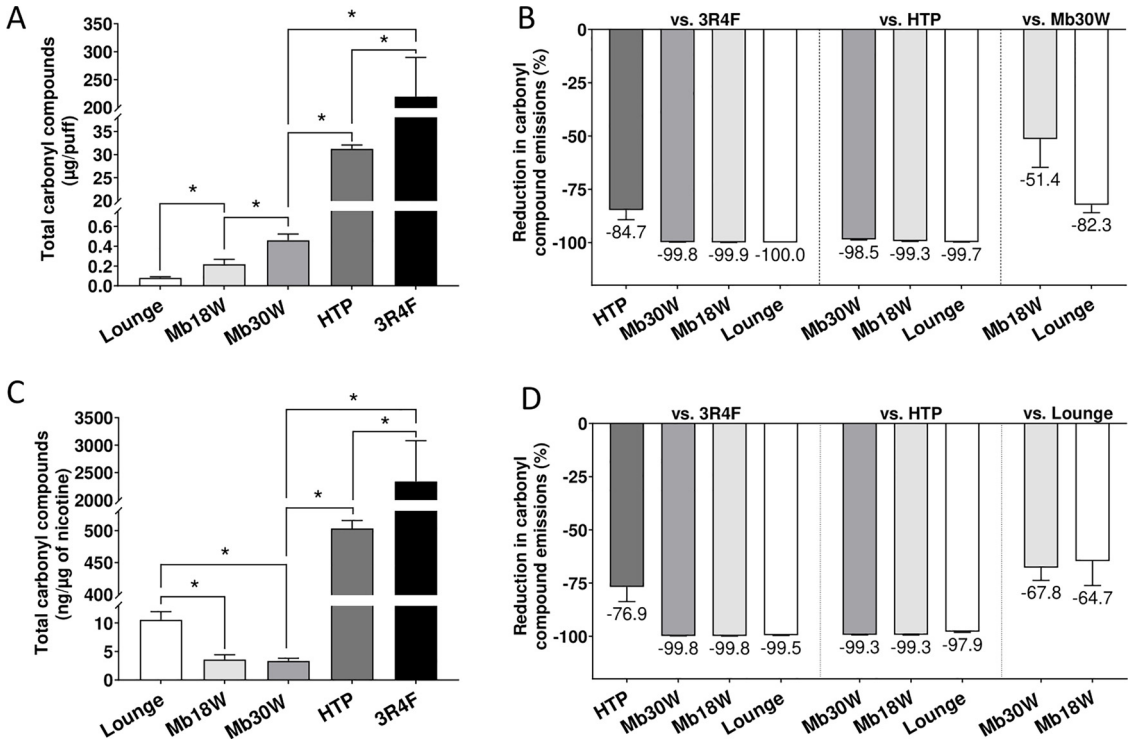


Fig. 2. Total content of carbonyl compounds in e-cig (Lounge, Mb18W or Mb30W), HTP and 3R4F cigarette aerosols. Data represent the mean ± SD of four independent measurements (*$p < 0.05$) and are expressed in µg/puff (A) or in ng/µg of nicotine (C). The corresponding reduction (%) in emissions of total carbonyl compounds (B and D, respectively) was compared to that of the 3R4F cigarette, HTP or e-cig.

relevance and realism. The temperature of the aerosols generated from each device did not exceed 60 °C during all the collection periods (Supplemental Fig. 1), following the recommendations of the French national organisation and standardization (AFNOR, 2016). Overall, our data thus demonstrate that, at normal vaping temperatures, carbonyl content in e-cig emissions represents only a small fraction of levels inhaled by users of tobacco products.

In parallel, the emission of twenty-three PAHs in the aerosols of

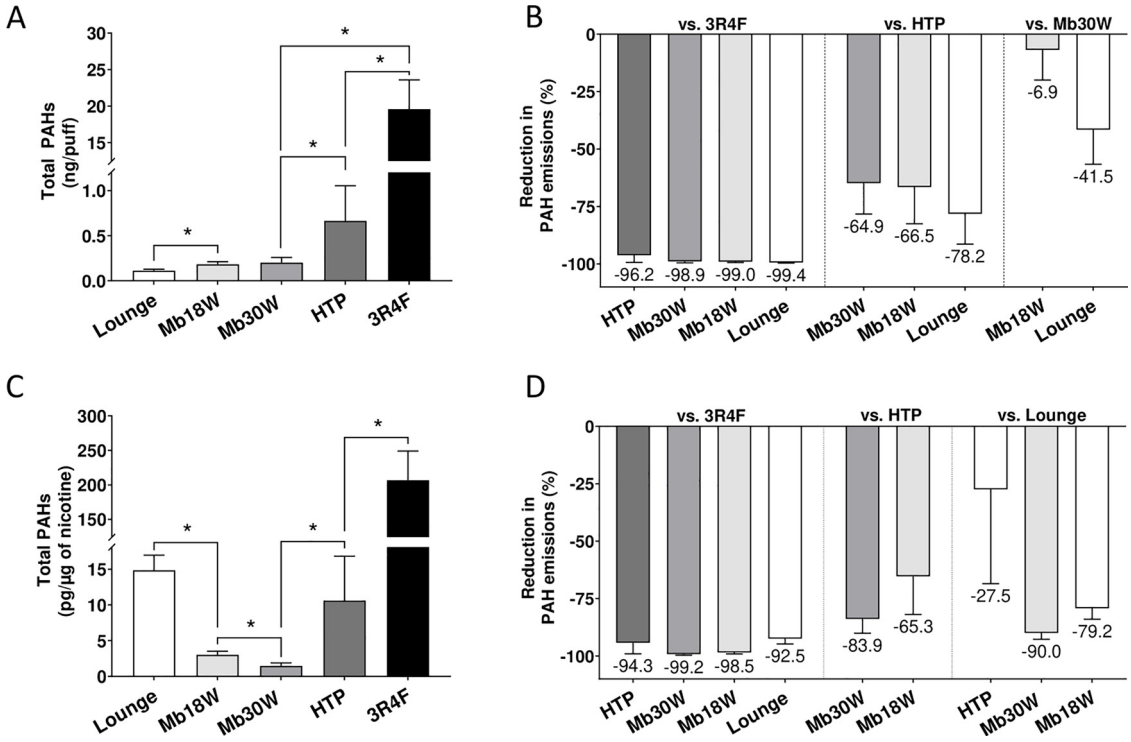


Fig. 3. Total content of PAHs in e-cig (Lounge, Mb18W or Mb30W), HTP and 3R4F cigarette aerosols. Data represent the mean ± SD of four independent measurements (*$p < 0.05$) and are expressed in ng/puff (A) or in pg/µg of nicotine (C). The corresponding reduction (%) in emissions of total PAHs (B and D, respectively) was compared to that of the 3R4F cigarette, HTP or e-cig.

HTP, 3R4F cigarette and e-cigs was analysed and results expressed in pg/puff are reported in Table 2. A similar pattern than that seen for carbonyl compounds was observed for almost all emitted PAHs: the concentrations of twenty-one compounds were markedly lower in HTP emissions than in 3R4F cigarette smoke (from 2 to 676 times depending on the compound), and were even lesser in e-cig vapours. Only benzo(c) phenanthrene was reported to be higher in HTP emissions, compared to all other aerosols. The sum of total PAHs measured was calculated for each aerosol (Fig. 3A) and the reduction rate is indicated in Fig. 3B: HTP (0.7 ng/puff) emitted 96.2 % less PAHs than 3R4F cigarette (19.6 ng/puff), but e-cig emitted 64.9–78.2 % less PAHs than HTP. Comparison of e-cig models showed no significant difference in PAH content between Mb18W and Mb30W, and about 40 % less of total PAHs in Lounge than in the Modbox model. These results support that the pyrolysis process is limited with e-cigs. The e-liquid used for vaping is generally free of tobacco ingredients which contain the PAH precursors. Moreover, the temperature required to produce an e-cig aerosol from a e-liquid is depending of the proportion in propylene glycol and glycerol. This temperature ranges from 188.6 °C to 292 °C, but water and alcohol used as additives, decrease this boiling point (Duell et al., 2018). By comparison, IQOS operates at temperatures between 330 °C and 349 °C (Davis et al., 2019). PAH emissions released by HTP were lower than combustible cigarette but still contained harmful elements from thermal degradation that are also found in cigarette smoke (Li et al., 2019; Rodgman et al., 2000), including the carcinogenic benzo[*a*] pyrene.

The quantifications of carbonyl and PAH compounds were first presented in mass of analysed compounds per puff to compare devices with each other. However, users do not necessarily consume the same number of puffs when using HTP, e-cig or conventional cigarettes. They appear to self-regulate their consumption (number, frequency and volume of puffs, notably) according to their needed quantity of nicotine (Farsalinos et al., 2018c). To take into consideration this nicotine self-titration, it appears relevant to also report all the amounts of harmful and potentially harmful compounds per nicotine yield. Detailed data for carbonyl and PAH levels, normalized by the level of emitted nicotine in aerosols, are reported in Tables S1 and S2 (supplementary materials), respectively. The comparison of total carbonyl compounds after nicotine normalization (Fig. 2C and D) showed, according to previous conclusions, that the HTP emitted 76.9 % less carbonyl compounds (497 ng/µg of nicotine) than the combustible cigarette (2308 ng/µg of nicotine), but at least 97.9 % higher levels than the e-cig vapours (< 10 ng/µg of nicotine). However, comparing the e-cig models, Lounge emitted more carbonyl compounds than the Modbox model and no significant difference was reported between Mb18W and Mb30W. The comparison of total PAHs after nicotine normalization (Fig. 3C and D) also showed substantial reduction (94.3 %) in the PAH content of HTP emissions (11 pg/µg of nicotine) in comparison to cigarette smoke (207 pg/µg of nicotine). The pattern of PAH content between the different e-cig models was different after nicotine normalization: the Lounge model emitted more PAHs (15 pg/µg of nicotine) than the Modbox model (79.2–90 %) and even 27.5 % more than HTP. These results showed that the way of expressing data (emissions per puff *vs* emissions per nicotine yield) can influence their interpretation. Today, there is no standardized manner to express the amount of emitted compounds in aerosols. Indeed, data can be expressed in amount per puff (Beauval et al., 2019), per mL of puff (Beauval et al., 2017), per cigarette or per IQOS heatstick (Li et al., 2019), per mass of nicotine (Farsalinos et al., 2018b), per liquid consumption for e-cig (Beauval et al., 2017), thus hampering comparisons between studies and making interpretations difficult. In addition, it is still unclear to which extent vapor generation, collection and analysis procedures could affect results of chemical characterization. Harmonized protocols to determine the chemical composition of emissions and to express results are crucially needed to establish and compare risk profiles of each emergent tobacco products in terms of chemical composition and user exposure.

3.2. *In vitro toxicity*

The apparent reduction of some harmful constituents in HTP and e-cig emissions in comparison to tobacco cigarette cannot be directly extrapolated to a proportionate harm reduction for smokers. Today, research is needed about toxicological impacts of these products on human airway epithelial cells in comparison with tobacco cigarette. The use of undiluted aerosols is described as a more sensitive method to compare responses from aerosols produced from emergent products, such as HTP and e-cig (Bishop et al., 2019). Thus, human bronchial epithelial BEAS-2B cells cultured at ALI were exposed to undiluted emissions from HTP, e-cig and 3R4F cigarette and effects of those emissions were evaluated on cytotoxicity, oxidative stress and

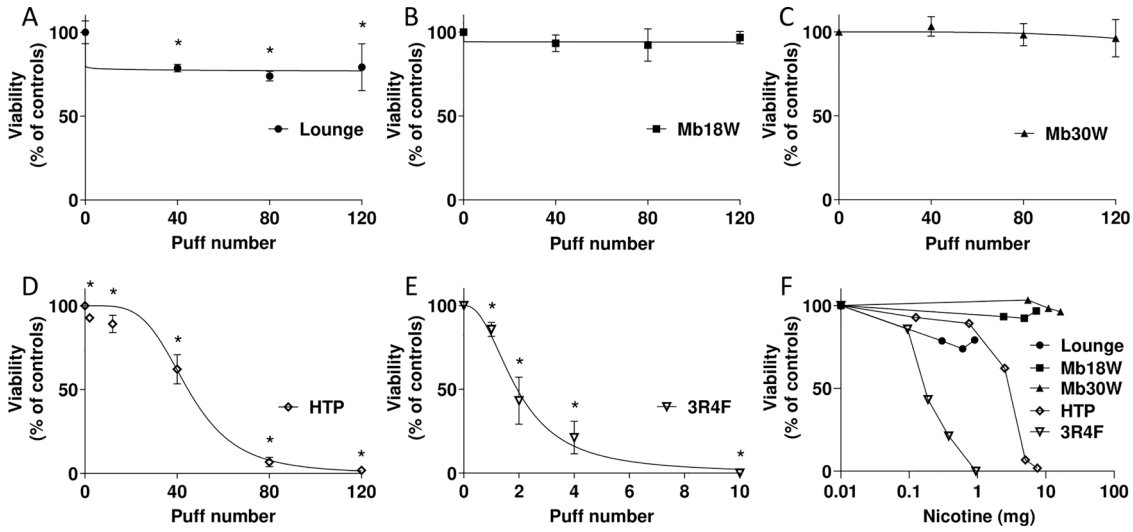


Fig. 4. Cell viability after exposure of BEAS-2B cells to different puff numbers of e-cigs [Lounge (A), Mb18W (B) or Mb30W (C)], HTP (D) and 3R4F cigarette (E). The viability was assessed by measuring intracellular ATP content in cells 24 h after exposure. Results are expressed as percentages relative to the ATP content in control cells arbitrarily set at a value of 100 %. Data represent the mean ± SD of three independent culture replicates. *p < 0.05 compared to control cells. (F) Cell viability expressed as a function of nicotine content (mg) in aerosols from each device. Nicotine content is determined by the nicotine concentration per puff (depending of the device) multiplied by the number of puffs.

inflammatory response, which are key mechanisms leading to chronic airway diseases.

3.2.1. Cell viability

Cell viability was assessed 24 h after aerosol exposure by measuring intracellular ATP content, which is directly proportional to the number of living cells. Data displayed in Fig. 4(A–E) show that e-cig vapours had no significant (Modbox model) or low (Lounge model: > 75 % cell viability) cytotoxic effects up to a 120-puff-exposure. In comparison, HTP emissions caused intracellular ATP changes from 12 puffs (89 % viability) to a strong reduction of cell viability that reached 2 % after 120 puffs. Cigarette smoke demonstrated also a full dose-response curve, but its cytotoxicity appeared within fewer puffs (< 10 puffs). In order to better compare the different devices, the effective dose of aerosol which results in a 50 % reduction of cell viability (ED50, expressed here in puff number) was calculated. Although the e-cig vapours did not induce sufficient cell mortality to calculate an ED50 (whatever the tested e-cig power or model), ED50 was 45 puffs for HTP aerosol and 2 puffs for 3R4F cigarette smoke. Bishop et al. have exposed a 3D-reconstituted human airway epithelium to undiluted cigarette smoke and e-cig aerosol (Bishop et al., 2019). They fund ED50 equal to 4 puffs and 60 puffs under HCI regime for cigarette and e-cig exposures, respectively. However, they voluntarily used extreme conditions for e-cig exposure with an airflow vent closed to achieve a worst case for carbonyl production and, consequently, higher cytotoxicity. In a previous study using diluted aerosols (Anthérieu et al., 2017), we have tested the Lounge model with different e-liquids (with or without nicotine, flavoured or unflavoured) and demonstrated that none of the aerosols induced cytotoxicity in BEAS-B cell line up to an exposure of 576 puffs. Today, few *in vitro* studies have compared the relative cytotoxicity of HTP aerosols with both cigarette smoke and e-cig vapours, and most of these assays have been performed using submersed cultures exposed to aerosol extracts (Ito et al., 2019; Munakata et al., 2018; Sohal et al., 2019). ALI exposures provide a more pertinent approach to perform toxicological studies related to inhalation of emerging e-cigs or novel tobacco products (Johnson et al., 2009). Our present results are in agreement with a study performed in ALI-cultured human bronchial epithelial H292 cells, demonstrating that HTP show reduced cytotoxicity relative to combustible cigarette, but higher cytotoxicity than e-cig (Leigh et al., 2018). There is no standardized approach to compare the *in vitro* toxicity between emergent tobacco products, e-cigs and tobacco cigarette. Some authors used the same exposure time or the same puff number between the different aerosols while some used comparable nicotine exposure (Wang et al., 2019). Therefore, we also reported cell viability as a function of emitted nicotine (Fig. 4F). The results were equivalent with or without nicotine normalization: a higher cytotoxicity for tobacco cigarette (ED50 = 0.2 mg of nicotine) than for HTP (ED50 = 2.8 mg of nicotine) and low cytotoxicity for e-cig. These differences in cytotoxic effects are probably attributable to lower concentrations of potentially harmful chemicals in HTP and especially e-cig aerosols. Based on these cytotoxicity data, sub-toxic (> 75 % cell viability) or toxic doses were chosen for the further analyses that assessed oxidative stress and inflammation: 40 and 120 puffs for e-cig; 2, 12 and 40 puffs for HTP; 1 and 2 puffs for 3R4F cigarette.

3.2.2. Oxidative stress

The generation of oxidative stress was first assessed by measuring the intracellular content of oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione. GSH is considered to be one of the most important scavengers of reactive oxygen species (ROS), and the ratio GSSG/GSH may be used as a marker of oxidative stress. We have previously described that the generation of oxidative stress was transient and no change in glutathione levels was found in BEAS-2B cells 3 h after the end of cigarette smoke exposure (Anthérieu et al., 2017). Consequently, we have measured GSH and GSSG contents immediately (0 h) after cell exposures (Fig. 5). In these experimental conditions, HTP induced a significant increase of GSSG/GSH ratio in comparison to control cells (2.7 and 4.5 fold-changes after 12 and 40 puffs, respectively). 3R4F cigarette also

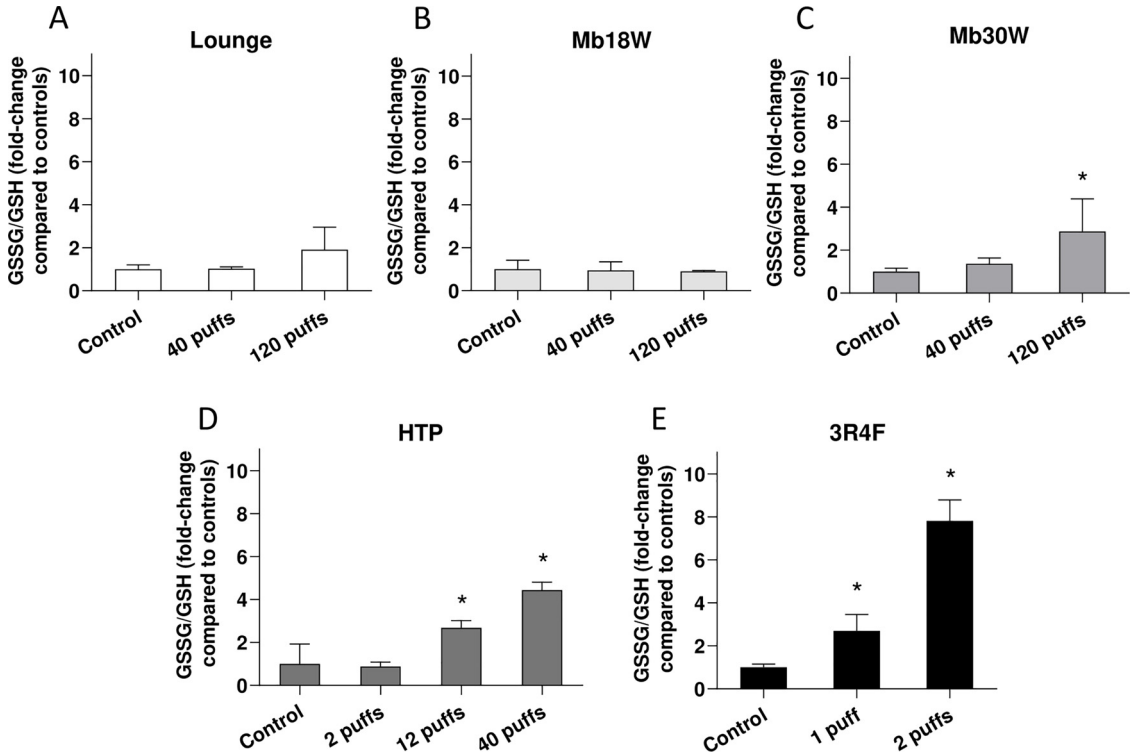


Fig. 5. Glutathione ratio (GSSG/GSH) in BEAS-2B cells after exposure to e-cig [Lounge (A), Mb18W (B) or Mb30W (C)], HTP (D) and 3R4F cigarette (E) aerosols. The GSSG and GSH contents were measured immediately after cell exposure. Results are expressed as fold-change relative to the GSSG/GSH ratio in control cells arbitrarily set at a value of 1. Data represent the mean ± SD of three independent culture replicates. * $p < 0.05$ compared to control cells.

induced an increase of the GSSG/GSH ratio but already after only 1 puff (2.7 fold-change) and a 7.8 fold-change was observed after an exposure to 2 puffs. For e-cig exposures, anti-oxidative response was evidenced only after a longer exposure of 120 puffs with Mb30W (2.9 fold-change), although no significant change in the GSSG/GSH ratio was observed with Mb18W and Lounge.

The cellular defense mechanisms against toxic substances also include transcriptomic regulations of genes involved in detoxification processes and the anti-oxidative response. Thus, the expression of selected genes involved in xenobiotic metabolism (cytochrome P450 1A1, *CYP1A1*; cytochrome P450 1B1, *CYP1B1*) and the anti-oxidative response (heme oxygenase 1, *HMOX1*; NADPH Quinone Dehydrogenase 1, *NQO1*) was quantified 4 or 24 h after exposure to 120 puffs of e-cig vapours, 12 puffs of HTP aerosol or 1 puff of 3R4F cigarette smoke (Fig. 6). For all the products and both time points, an increase of *CYP1A1* and *CYP1B1* expression was observed, with a higher induction for *CYP1A1* than for *CYP1B1*. PAHs contained in cigarette smoke are known to induce expression of *CYP1A1/1B1 via* the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) pathway and, subsequently, to affect the metabolism of tobacco carcinogens (Sacks et al., 2011). The CYP1A1/1B1 expression is also induced in the lungs of smokers (Kim et al., 2004). E-cig aerosols can also induce *CYP1A1* and *CYP1B1* and enhance the metabolism of some PAHs (*e.g.* benzo[*a*]pyrene) to genotoxic products by activating AhR (Sun et al., 2019). Furthermore, the expression of the downstream target genes of the nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), *NQO1* and *HMOX1*, was up-regulated 4 h after exposure to the Lounge model vapours and at both time points for all other emissions. The up-regulation of NQO1 and HMOX1 levels 4 h after exposure increased with the e-cig power, reaching a 3.3 or 95-fold-change, respectively, for Mb30W. Some smoke compounds, including carbonyls, PAHs, quinones, naphthoquinones and benzenediols, were identified as activators of the Nrf2/antioxidant response element (ARE) pathway and *HMOX1* induction in response to oxidative stress (Chan et al., 2013; Sekine et al., 2016; Zhang et al., 2019). Some of these different components of cigarette smoke were also found in aerosols of HTP or e-cig, which can explain the up-regulation of *NQO1* and *HMOX1* in BEAS-2B cells whatever the products. Almost all of these transcriptomic modulations were higher after 4 h exposure than after 24 h and correspond to early adaptive mechanisms set up by BEAS-2B cells in response to a cellular stress after aerosol exposure. It is important to note that these transcriptomic mechanisms were globally similar for all the devices tested, demonstrating that all products have the potential to induce detoxification and an anti-oxidative response. However, these molecular and cellular responses were observed for highly different exposure levels (from 120 puffs for e-cig, 12 puffs for HTP and only 1 puff for tobacco cigarette). In addition, an exposure of 120 puffs in one hour is representative of an intense exposure session, compared to data from topography studies with e-cig users (Jones et al., 2020; Lee et al., 2018).

These results are in accordance with other studies demonstrating that the generation of ROS is observed in HTP emissions after a more intensive use than with cigarette smoke (Munakata et al., 2018). ROS would be mainly generated by exposure to chemicals derived from

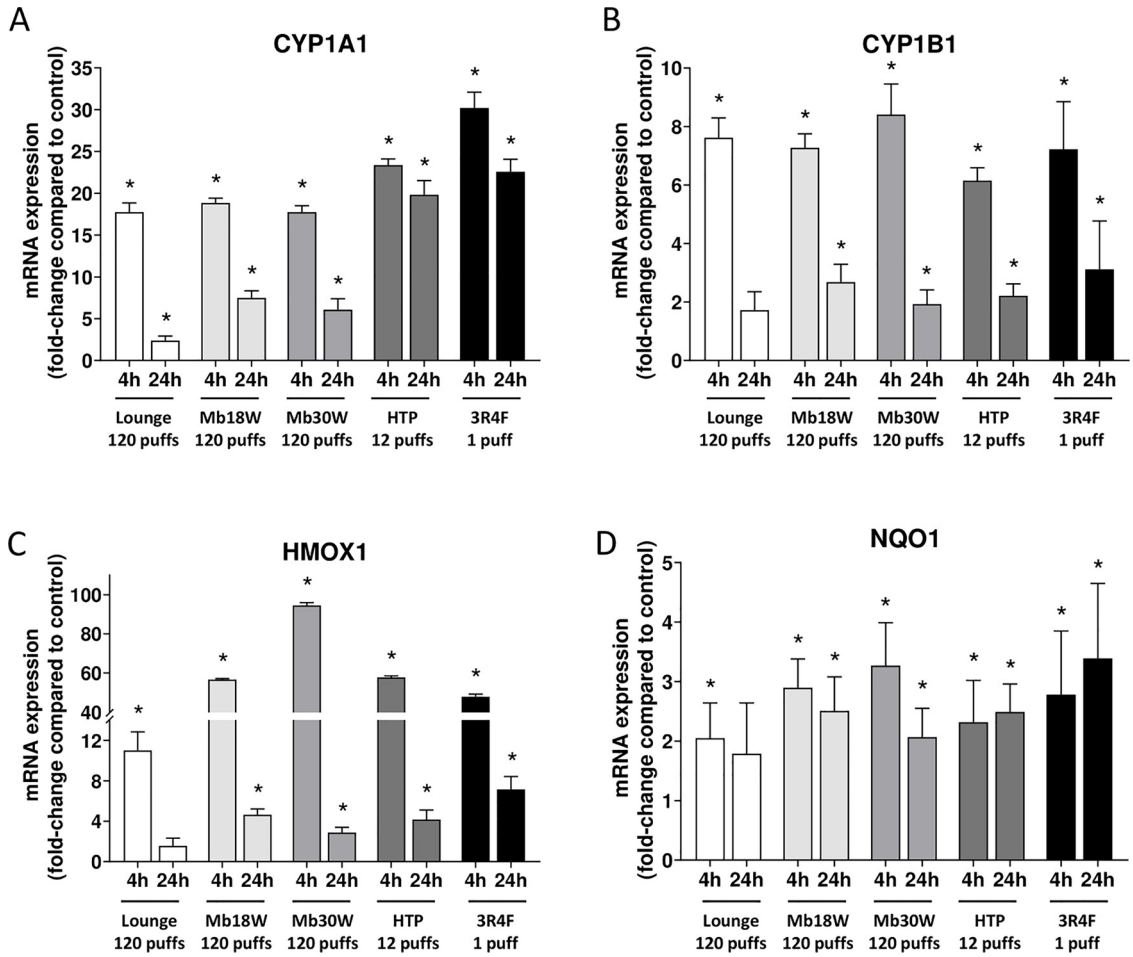


Fig. 6. Expression of mRNAs encoding genes related to metabolism [*CYP1A1* (A), *CYP1B1* (B)] and oxidative stress [*HMOX1* (C), *NQO1* (D)] in BEAS-2B cells. The gene expression was analysed 4 h or 24 h after exposure to 120 puffs of e-cig (Lounge, Mb18W or Mb30W), 12 puffs of HTP or 1 puff of 3R4F cigarette. Data represent the mean ± SD of three independent culture replicates. Results are expressed as fold-change relative to control cells, arbitrarily set at a value of 1. Data represent the mean ± SD of three independent culture replicates. * $p < 0.05$ compared to control cells.

combustion processes (Kopa and Pawliczak, 2020) and, therefore, can be directly linked to the relative amounts of carbonyls and PAHs measured in HTP and cigarette smoke emissions (Figs. 2 and 3). The increase in the amount of carbonyl compounds produced when Modbox was used under high power setting could explain, at least in part, the greater induction of ROS production that would contribute to alter the oxidative/antioxidative balance. Indeed, higher power leads to higher filament temperature, which enhances the e-liquid vaporization process, pyrolysis and chain reactions with the production of hydroxide and superoxide free radicals (Haddad et al., 2019; Son et al., 2019; Zhao et al., 2018). However, Son et al. reported that the dose of free radicals per puff associated with e-cig vaping was 10–1000 times lower than the reported dose generated by cigarette smoking (Son et al., 2019).

3.2.3. Inflammatory response

The inflammatory response of BEAS-2B cells was assessed by measuring the secretion of ten cytokines and chemokines 24 h after exposure to defined subtoxic doses of HTP, 3R4F cigarette smoke or e-cig emissions. Only four mediators were found in quantifiable levels (IL-6, IL-8, GROα, and MCP-1) after exposure. GM-CSF, IL-13, IL-1ß, MIP-1α, RANTES and TNF-α were not detected in cell culture medium of BEAS-2B cells exposed to aerosols, despite the capacity of these cells to secrete these mediators after treatment with lipopolysaccharide (Anthérieu et al., 2017). The results for the four detected mediators were expressed in fold-change relative to control cells (Table 3). A significant increase of IL-6 secretion was observed in the culture medium of cells exposed to Mb18W (for 120 puffs) and Mb30W (for both 40 and 120 puffs) aerosols, while no significant change was evidenced for IL-8 secretion. Increase of IL-6 and/or IL-8 had already been described in different cell models after e-cig exposures (Merecz-Sadowska et al., 2020), and more remarkably in the plasma of e-cig users (Singh et al., 2019), demonstrating that e-cig vapors could induce a pro-inflammatory response. For HTP, a biphasic response was observed for IL-6 and IL-8 with a greater increase in secretion after 12 puffs (3 and 3.3 fold-change, respectively) than after 40 puffs (1.3 fold-change). A comparable biphasic response in IL-8 secretion was previously described in BEAS-2B cells exposed to HTP aerosol or tobacco smoke and a similar trend was also observed for GM-CSF (Munakata et al., 2018), which was undetectable in our study. These differences in results could be explained by the different protocols of cell exposure. Indeed, Munataka et al. exposed submerged BEAS-2B cells to aerosol extracts, while ALI-cultured cells were exposed directly to aerosols in our study. Finally, the secretion of MCP-1 and GRO-α was significantly decreased for the longer exposures to HTP aerosol, 3R4F cigarette smoke and Mb30W vapour (Table 3). A down-regulation of GRO-α and MCP-1 was also demonstrated after exposure to cigarette smoke in human endothelial cells (Allam et al., 2013). GRO-α plays a significant role in the chemotaxis of neutrophils to the site of inflammation and MCP-1 is a potent chemoattractant for monocytes and macrophages. This recruitment and subsequent activation of monocytes into the inflamed tissues play a central role in determining the outcomes of the immune responses of the tissues. Thus, alteration of GRO-α and MCP-1 secretion after aerosol exposure could affect the tissue immune and protective responses.

These different modulations in inflammatory mediators can be explained partially by the carbonyl and PAH levels measured in the different emissions. Indeed, some carbonyls found in aerosols or smoke (such as acrolein, acetaldehyde and formaldehyde) are known strong irritants that may cause inflammation (Lino-dos-Santos-Franco et al., 2011; Shields et al., 2017). The benzo[*a*]pyrene is also known as an inducer of the secretion of pro-inflammatory cytokines (Chen et al., 2012). Other constituents of aerosols or smoke could play a major role in the inflammatory response. Metals are capable of causing inflammatory cytokine induction (Lerner et al., 2015). In addition, propylene glycol and glycerol produce a hygroscopic/hyperosmolar aerosol which could deposit on the surface of lung cells and trigger local inflammation (Chaumont et al., 2019).

Carbonyls and PAHs represent only a part of the complex mixture constituting the cigarette smoke or the HTP and e-cig aerosols. Therefore, these pollutants take part in the cellular response but all the changes observed in BEAS-2B cells (cytotoxicity, oxidative stress, inflammation) cannot be explained solely by PAH and carbonyl emissions. A multitude of other harmful compounds comprising other volatile organic compounds, metals, nitrosamines *etc.* (Li et al., 2019; Schaller et al., 2016a,b; Zhao et al., 2019) should be taken into account to better characterize the toxic profile of these novel tobacco products and e-cigs in comparison to tobacco cigarette.

4. Conclusion

Within the framework of tobacco harm reductions, in which smokers ideally should be able to freely choose from a variety of alternatives for smoking, emerging tobacco products (such as HTP) and e-cig seem to have potential of a promising new offering. However, it is fundamental for smokers to know and compare the health risks of these different emergent devices in order to determine which product should be preferred for smoking cessation. Our study provides comparative data on both chemical composition of HTP, e-cig and tobacco cigarette emissions and their toxicological impacts on human bronchial epithelial cells. We first report that HTP deliver slightly less nicotine and emit much lower amounts of carbonyl and PAH compounds than tobacco cigarette. However, HTP emissions still contain carcinogenic compounds (*e.g.* formaldehyde, acetaldehyde and benzo[*a*]pyrene) and the amounts of carbonyls and PAHs in HTP aerosols are higher than in e-cig vapours. In accordance with the levels of toxic compounds in each aerosol, HTP aerosol exhibits reduced cytotoxicity compared to cigarette smoke but higher than e-cig vapours. HTP and e-cig have the potential to increase oxidative stress and inflammatory response, in a manner very similar to that of cigarette smoke, but only after a more intensive exposure. In addition, our data support that e-cig use at higher power settings emit higher carbonyl and PAH compounds and, consequently, generate more oxidative stress. Finally, this study contributes to a better understanding of HTP and e-cig emission properties and their related toxicological impacts and provides important data needed for risk assessment purposes, by demonstrating that HTP might be less harmful than tobacco cigarette but considerably more harmful than e-cig. Further long-term studies in animal models should be conducted to confirm these *in vitro* findings and to allow the assessment of chronic

Table 3
Profile of inflammatory mediators (IL-6, IL-8, MCP-1 and GROα) secreted by BEAS-2B cells 24 h after exposure to the emissions of e-cigs (Lounge, Mb18W or Mb30W), HTP or 3R4F cigarette. Data represent the mean ± SD of three independent culture replicates. Results are expressed as fold-change relative to control cells, arbitrarily set at a value of 1. Data in bold are significantly different from controls ($p < 0.05$).

	IL-6	IL-8	MCP-1	GRO-α
Lounge				
40 puffs	2.1 ± 0.6	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1
120 puffs	2.2 ± 1.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Mb18W				
40 puffs	2.5 ± 1.1	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2
120 puffs	**2.3 ± 0.6**	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Mb30W				
40 puffs	**3.3 ± 0.4**	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.2
120 puffs	**2.4 ± 0.1**	0.6 ± 0.1	**0.6 ± 0.1**	**0.4 ± 0.1**
HTP				
2 puffs	0.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	**0.6 ± 0.0**	0.9 ± 0.1
12 puffs	3.0 ± 3.0	**3.3 ± 0.4**	**0.6 ± 0.1**	**0.7 ± 0.1**
40 puffs	1.3 ± 1.0	1.3 ± 1.5	**0.2 ± 0.1**	**0.2 ± 0.1**
3R4F				
1 puff	1.4 ± 0.5	1.4 ± 0.3	1.0 ± 0.1	**0.7 ± 0.1**
2 puffs	1. 5 ± 0.5	1.8 ± 0.8	**0.2 ± 0.1**	**0.2 ± 0.1**

exposures to emergent tobacco products. In addition to the toxic impacts of these products, comparison of their addictiveness is another key element to take into account in the tobacco harm-reduction strategy.

Funding

This work was supported by the French Institute of Cancer (INCa) and the French Institute for Public Health Research (IResP): Contracts n°INCa_11505 and n°INCa_13648.

CRediT authorship contribution statement

Romain Dusautoir: Investigation, Conceptualization, Visualization, Writing - review & editing. **Gianni Zarcone:** Investigation, Conceptualization. **Marie Verriele:** Conceptualization, Writing - review & editing. **Guillaume Garçon:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing - review & editing. **Isabelle Fronval:** Investigation, Methodology. **Nicolas Beauval:** Investigation, Writing - review & editing. **Delphine Allorge:** Writing - review & editing. **Véronique Riffault:** Writing - review & editing. **Nadine Locoge:** Conceptualization, Writing - review & editing. **Jean-Marc Lo-Guidice:** Supervision, Conceptualization, Funding acquisition, Writing - review & editing. **Sébastien Anthérieu:** Supervision, Conceptualization, Funding acquisition, Writing - original draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest with tobacco, HTP or e-cig industries.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123417.

References

AFNOR, 2016. Association Française de Normalisation. Norme XP D90-300-3 Cigarettes électroniques et e-liquides.

Allam, E., Delacruz, K., Ghoneima, A., Sun, J., Windsor, L.J., 2013. Effects of tobacco on cytokine expression from human endothelial cells. Oral Dis. 19 (7), 660–665. https://doi.org/10.1111/odi.12050.

Anthérieu, S., Garat, A., Beauval, N., Soyez, M., Allorge, D., Garçon, G., Lo-Guidice, J.-M., 2017. Comparison of cellular and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. Toxicol. In Vitro 45 (Pt 3), 417–425. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.015.

Auer, R., Concha-Lozano, N., Jacot-Sadowski, I., Cornuz, J., Berthet, A., 2017. Heat-not-burn tobacco cigarettes: smoke by any other name. JAMA Intern. Med. 177 (7), 1050–1052. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2017.1419.

Babb, S., Malarcher, A., Schauer, G., Asman, K., Jamal, A., 2017. Quitting smoking among adults — United States, 2000–2015. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 65 (52), 1457–1464. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6552a1.

Beauval, N., Antherieu, S., Soyez, M., Gengler, N., Grova, N., Howsam, M., Hardy, E.M., Fischer, M., Appenzeller, B.M.R., Goossens, J.F., Allorge, D., Garçon, G., Lo-Guidice, J.M., Garat, A., 2017. Chemical evaluation of electronic cigarettes: multicomponent analysis of liquid refills and their corresponding aerosols. J. Anal. Toxicol. 41 (8), 670–678. https://doi.org/10.1093/jat/bkx054.

Beauval, N., Verrièle, M., Garat, A., Fronval, I., Dusautoir, R., Anthérieu, S., Garçon, G., Lo-Guidice, J.-M., Allorge, D., Locoge, N., 2019. Influence of puffing conditions on the carbonyl composition of e-cigarette aerosols. Int. J. Hyg. Environ. Health 222 (1), 136–146. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.08.015.

Belushkin, M., Tafin Djoko, D., Esposito, M., Korneliou, A., Jeannet, C., Lazzerini, M., Jaccard, G., 2020. Selected harmful and potentially harmful constituents levels in commercial e-Cigarettes. Chem. Res. Toxicol. 33 (2), 657–668. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00470.

Benowitz, N.L., 2010. Nicotine addiction. N. Engl. J. Med. 362 (24), 2295. https://doi.org/10.1056/NEJMra0809890. Massachussetts Medical Society.

Bishop, E., Haswell, L., Adamson, J., Costigan, S., Thorne, D., Gaca, M., 2019. An approach to testing undiluted e-cigarette aerosol in vitro using 3D reconstituted human airway epithelium. Toxicol. In Vitro 54, 391–401. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.010.

Chan, J.K.W., Charrier, J.G., Kodani, S.D., Vogel, C.F., Kado, S.Y., Anderson, D.S., Anastasio, C., Van Winkle, L.S., 2013. Combustion-derived flame generated ultrafine soot generates reactive oxygen species and activates Nrf2 antioxidants differently in neonatal and adult rat lungs. Part. Fibre Toxicol. 10, 34. https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-34.

Chaumont, M., van de Borne, P., Bernard, A., Van Muylem, A., Deprez, G., Ullmo, J., Starczewska, E., Briki, R., de Hemptinne, Q., Zaher, W., Debbas, N., 2019. Fourth generation e-cigarette vaping induces transient lung inflammation and gas exchange disturbances: results from two randomized clinical trials. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. 316 (5), L705–L719. https://doi.org/10.1152/ajplung.00492.2018.

Chen, W., Xu, X., Bai, L., Padilla, M.T., Gott, K.M., Leng, S., Tellez, C.S., Wilder, J.A., Belinsky, S.A., Scott, B.R., Lin, Y., 2012. Low-dose Gamma-irradiation Inhibits IL-6 Secretion From Human Lung Fibroblasts That Promotes Bronchial Epithelial Cell Transformation by Cigarette-smoke Carcinogen. https://doi.org/10.1093/carcin/bgs159.

CORESTA, 2015. E-cigarette Task Force Technical Report, 2014 Electronic Cigarette Aerosol Parameters Study.

Davis, B., Williams, M., Talbot, P., 2019. iQOS: evidence of pyrolysis and release of a toxicant from plastic. Tob. Control 28 (1), 34–41. https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2017-054104.

Duell, A.K., Pankow, J.F., Gillette, S.M., Peyton, D.H., 2018. Boiling points of the propylene glycol + glycerol system at 1 atmosphere pressure: 188.6–292 °C without and with added water or nicotine. Chem. Eng. Commun. 205 (12), 1691–1700. https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1468758.

Farsalinos, K.E., Voudris, V., Poulas, K., 2015. E-cigarettes generate high levels of aldehydes only in "dry puff" conditions. Addiction 110 (8), 1352–1356. https://doi.org/10.1111/add.12942.

Farsalinos, K.E., Voudris, V., Spyrou, A., Poulas, K., 2017. E-cigarettes emit very high formaldehyde levels only in conditions that are aversive to users: a replication study under verified realistic use conditions. Food Chem. Toxicol. 109, 90–94. https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.044.

Farsalinos, K.E., Yannovits, N., Sarri, T., Voudris, V., Poulas, K., 2018a. Nicotine delivery to the aerosol of a heat-not-burn tobacco product: comparison with a tobacco cigarette and E-cigarettes. Nicotine Tob. Res. 20 (8), 1004–1009. https://doi.org/10.1093/ntr/ntx138.

Farsalinos, K.E., Yannovits, N., Sarri, T., Voudris, V., Poulas, K., Leischow, S.J., 2018b. Carbonyl emissions from a novel heated tobacco product (IQOS): comparison with an e-cigarette and a tobacco cigarette. Addiction 113 (11), 2099–2106. https://doi.org/10.1111/add.14365.

Farsalinos, K.E., Yannovits, N., Sarri, T., Voudris, V., Poulas, K., Leischow, S.J., 2018c. Carbonyl emissions from a novel heated tobacco product (IQOS): comparison with an e-cigarette and a tobacco cigarette. Addiction 113 (11), 2099–2106. https://doi.org/10.1111/add.14365.

Farsalinos, K., Poulas, K., Voudris, V., 2018d. Changes in puffing topography and nicotine consumption depending on the power setting of electronic cigarettes. Nicotine Tob. Res. 20 (8), 993–997. https://doi.org/10.1093/ntr/ntx219.

Geiss, O., Bianchi, I., Barrero-Moreno, J., 2016. Correlation of volatile carbonyl yields emitted by e-cigarettes with the temperature of the heating coil and the perceived sensorial quality of the generated vapours. Int. J. Hyg. Environ. Health 219 (3), 268–277. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.01.004.

Goniewicz, M.L., Knysak, J., Gawron, M., Kosmider, L., Sobczak, A., Kurek, J., Prokopowicz, A., Jablonska-Czapla, M., Rosik-Dulewska, C., Havel, C., Jacob, P., Benowitz, N., 2014. Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. Tob. Control 23 (2), 133–139. https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2012-050859.

Haddad, C., Salman, R., El-Hellani, A., Talih, S., Shihadeh, A., Saliba, N.A., 2019. Reactive oxygen species emissions from supra- and sub-ohm electronic cigarettes. J. Anal. Toxicol. 43 (1), 45–50. https://doi.org/10.1093/jat/bky065.

Ho, S.S.H., Ho, K.F., Liu, W.D., Lee, S.C., Dai, W.T., Cao, J.J., Ip, H.S.S., 2011. Unsuitability of using the DNPH-coated solid sorbent cartridge for determination of airborne unsaturated carbonyls. Atmos. Environ. 45 (1), 261–265. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.09.042.

Hutzler, C., Paschke, M., Kruschinski, S., Henkler, F., Hahn, J., Luch, A., 2014. Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarettes. Arch. Toxicol. 88 (7), 1295–1308. https://doi.org/10.1007/s00204-014-1294-7.

IARC, 2004. Tobacco Smoking - IARC Monographs.

Iskandar, A.R., Gonzalez-Suarez, I., Majeed, S., Marescotti, D., Sewer, A., Xiang, Y., Leroy, P., Guedj, E., Mathis, C., Schaller, J.-P., Vanscheeuwijck, P., Frentzel, S., Martin, F., Ivanov, N.V., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2016. A framework for in vitro systems toxicology assessment of e-liquids. Toxicol. Mech. Methods 26 (6), 389–413. https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1170251.

Ito, S., Taylor, M., Mori, S., Thorne, D., Nishino, T., Breheny, D., Gaça, M., Yoshino, K., Proctor, C., 2019. An inter-laboratory in vitro assessment of cigarettes and next generation nicotine delivery products. Toxicol. Lett. 315, 14–22. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.08.004.

Johnson, M.D., Schilz, J., Djordjevic, M.V., Rice, J.R., Shields, P.G., 2009. Evaluation of in vitro assays for assessing the toxicity of cigarette smoke and smokeless tobacco. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 18 (12), 3263–3304. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0965.

Jones, J., Slayford, S., Gray, A., Brick, K., Prasad, K., Proctor, C., 2020. A cross-category puffing topography, mouth level exposure and consumption study among Italian users of tobacco and nicotine products. Sci. Rep. 10 (1), 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-55410-5.

Kalkhoran, S., Chang, Y., Rigotti, N.A., 2019. E-cigarettes and smoking cessation in smokers with chronic conditions. Am. J. Prev. Med. 57 (6), 786–791. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2019.08.017.

Kim, J.H., Sherman, M.E., Curriero, F.C., Guengerich, F.P., Strickland, P.T., Sutter, T.R., 2004. Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers,

non-smokers, and ex-smokers. Toxicol. Appl. Pharmacol. 199 (3), 210–219. https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.015.
Kopa, P.N., Pawliczak, R., 2020. IQOS - a heat-not-burn (HnB) tobacco product - chemical composition and possible impact on oxidative stress and inflammatory response. A systematic review. Toxicol. Mech. Methods 30 (2), 81–87. https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1669245.
Kosmider, L., Sobczak, A., Fik, M., Knysak, J., Zaciera, M., Kurek, J., Goniewicz, M.L., 2014. Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: effects of nicotine solvent and battery output voltage. Nicotine Tob. Res. 16 (10), 1319–1326. https://doi.org/10.1093/ntr/ntu078.
Lee, Y.O., Nonnemaker, J.M., Bradfield, B., Hensel, E.C., Robinson, R.J., 2018. Examining daily electronic cigarette puff topography among established and nonestablished cigarette smokers in their natural environment. Nicotine Tob. Res. 20 (10), 1283–1288. https://doi.org/10.1093/NTR/NTX222.
Leigh, N.J., Tran, P.L., O'Connor, R.J., Goniewicz, M.L., 2018. Cytotoxic effects of heated tobacco products (HTP) on human bronchial epithelial cells. Tob. Control 27 (Suppl 1), s26–s29. https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2018-054317.
Lerner, C.A., Sundar, I.K., Watson, R.M., Elder, A., Jones, R., Done, D., Kurtzman, R., Ossip, D.J., Robinson, R., McIntosh, S., Rahman, I., 2015. Environmental health hazards of e-cigarettes and their components: oxidants and copper in e-cigarette aerosols. Environ. Pollut. 198, 100–107. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.033.
Li, X., Luo, Y., Jiang, X., Zhang, H., Zhu, F., Hu, S., Hou, H., Hu, Q., Pang, Y., 2019. Chemical analysis and simulated pyrolysis of tobacco heating system 2.2 compared to conventional cigarettes. Nicotine Tob. Res. 21 (1), 111–118. https://doi.org/10.1093/ntr/nty005.
Lino-dos-Santos-Franco, A., Correa-Costa, M., Dos Santos Durão, A.C.C., Ligeiro de Oliveira, A.P., Breithaupt-Faloppa, A.C., de A.Bertoni, J., Oliveira-Filho, R.M., Câmara, N.O.S., Marcourakis, T., Tavares-de-Lima, W., 2011. Formaldehyde induces lung inflammation by an oxidant and antioxidant enzymes mediated mechanism in the lung tissue. Toxicol. Lett. 207 (3), 278–285. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.026.
Malinska, D., Szymański, J., Patalas-Krawczyk, P., Michalska, B., Wojtala, A., Prill, M., Partyka, M., Drabik, K., Walczak, J., Sewer, A., Johne, S., Luettich, K., Peitsch, M.C., Hoeng, J., Duszyński, J., Szczepanowska, J., van der Toorn, M., Wieckowski, M.R., 2018. Assessment of mitochondrial function following short- and long-term exposure of human bronchial epithelial cells to total particulate matter from a candidate modified-risk tobacco product and reference cigarettes. Food Chem. Toxicol. 115, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.013.
Merecz-Sadowska, A., Sitarek, P., Zielinska-Blizniewska, H., Malinowska, K., Zajdel, K., Zakonnik, L., Zajdel, R., 2020. A summary of in vitro and in vivo studies evaluating the impact of E-Cigarette exposure on living organisms and the environment. Int. J. Mol. Sci. 21 (2). https://doi.org/10.3390/ijms21020652. MDPI AG.
Munakata, S., Ishimori, K., Kitamura, N., Ishikawa, S., Takanami, Y., Ito, S., 2018. Oxidative stress responses in human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke and vapor from tobacco- and nicotine-containing products. Regul. Toxicol. Pharmacol. 99, 122–128. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.09.009.
Nelson, V.A., Goniewicz, M.L., Beard, E., Brown, J., Sheals, K., West, R., Shahab, L., 2015. Comparison of the characteristics of long-term users of electronic cigarettes versus nicotine replacement therapy: a cross-sectional survey of English ex-smokers and current smokers. Drug Alcohol Depend. 153, 300–305. https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.05.005.
Rodgman, A., Smith, C.J., Perfetti, T.A., 2000. The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. Hum. Exp. Toxicol. 19 (10), 573–595. https://doi.org/10.1191/096032700701546514.
Sacks, P.G., Zhao, Z.-L., Kosinska, W., Fleisher, K.E., Gordon, T., Guttenplan, J.B., 2011. Concentration dependent effects of tobacco particulates from different types of cigarettes on expression of drug metabolizing proteins, and benzo(a)pyrene metabolism in primary normal human oral epithelial cells. Food Chem. Toxicol. 49 (9), 2348–2355. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.037.
Schaller, J.-P., Keller, D., Poget, L., Pratte, P., Kaelin, E., McHugh, D., Cudazzo, G., Smart, D., Tricker, A.R., Gautier, L., Yerly, M., Reis Pires, R., Le Bouhellec, S., Ghosh, D., Hofer, I., Garcia, E., Vanscheeuwijck, P., Maeder, S., 2016a. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 2: Chemical composition, genotoxicity, cytotoxicity, and physical properties of the aerosol. Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP, 81 Suppl 2, S27–S47. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.10.001.
Schaller, J.-P., Pijnenburg, J.P.M., Ajithkumar, A., Tricker, A.R., 2016b. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 3: influence of the tobacco blend on the formation of harmful and potentially harmful constituents of the Tobacco Heating System 2.2 aerosol. Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP, 81 Suppl 2, S48–S58. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.10.016.
Scheffler, S., Dieken, H., Krischenowski, O., Förster, C., Branscheid, D., Aufderheide, M., 2015. Evaluation of E-cigarette liquid vapor and mainstream cigarette smoke after direct exposure of primary human bronchial epithelial cells. Int. J. Environ. Res. Public Health 12 (4), 3915–3925. https://doi.org/10.3390/ijerph120403915.
Seeman, J.I., Dixon, M., Haussmann, H.J., 2002. Acetaldehyde in mainstream tobacco smoke: formation and occurrence in smoke and bioavailability in the smoker. Chem. Res. Toxicol. 15 (11), 1331–1350. https://doi.org/10.1021/tx020069f.
Sekine, T., Hirata, T., Mine, T., Fukano, Y., 2016. Activation of transcription factors in human bronchial epithelial cells exposed to aqueous extracts of mainstream cigarette smoke in vitro. Toxicol. Mech. Methods 26 (1), 22–31. https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1123788.
Sewer, A., Kogel, U., Talikka, M., Wong, E.T., Martin, F., Xiang, Y., Guedj, E., Ivanov, N.V., Hoeng, J., Peitsch, M.C., 2016. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2 (THS2.2). Part 5: microRNA expression from a 90-day rat inhalation study indicates that exposure to THS2.2 aerosol causes reduced effects on lung tissue compared with cigarette smoke. Regul. Toxicol. Pharmacol. 81, S82–S92. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.018.
Shields, P.G., Berman, M., Brasky, T.M., Freudenheim, J.L., Mathe, E., McElroy, J.P., Song, M.A., Wewers, M.D., 2017. A review of pulmonary toxicity of electronic cigarettes in the context of smoking: a focus on inflammation. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 26 (8), 1175–1191. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0358. American Association for Cancer Research Inc.
Singh, K.P., Lawyer, G., Muthumalage, T., Maremanda, K.P., Khan, N.A., McDonough, S.R., Ye, D., McIntosh, S., Rahman, I., 2019. Systemic biomarkers in electronic cigarette users: implications for noninvasive assessment of vaping-associated pulmonary injuries. ERJ Open Res. 5 (4). https://doi.org/10.1183/23120541.00182-2019. 00182–02019.
Sleiman, M., Logue, J.M., Montesinos, V.N., Russell, M.L., Litter, M.I., Gundel, L.A., Destaillats, H., 2016. Emissions from electronic cigarettes: key parameters affecting the release of harmful chemicals. Environ. Sci. Technol. 50 (17), 9644–9651. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01741.
Smith, M.R., Clark, B., Lüdicke, F., Schaller, J.P., Vanscheeuwijck, P., Hoeng, J., Peitsch, M.C., 2016. Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 1: description of the system and the scientific assessment program. Regul. Toxicol. Pharmacol. 81, S17–S26. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.07.006.
Sohal, S.S., Eapen, M.S., Naidu, V.G.M., Sharma, P., 2019. IQOS exposure impairs human airway cell homeostasis: direct comparison with traditional cigarette and e-cigarette. ERJ Open Res. 5 (1), 00159–02018. https://doi.org/10.1183/23120541.00159-2018.
Son, Y., Mishin, V., Laskin, J.D., Mainelis, G., Wackowski, O.A., Delnevo, C., Schwander, S., Khlystov, A., Samburova, V., Meng, Q., 2019. Hydroxyl radicals in E-cigarette vapor and E-vapor oxidative potentials under different vaping patterns. Chem. Res. Toxicol. 32 (6), 1087–1095. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00400.
Staal, Y.C., van de Nobelen, S., Havermans, A., Talhout, R., 2018. New tobacco and tobacco-related products: early detection of product development, marketing strategies, and consumer interest. JMIR Public Health Surveill. 4 (2), e55. https://doi.org/10.2196/publichealth.7359.
Stead, L.F., Perera, R., Bullen, C., Mant, D., Hartmann-Boyce, J., Cahill, K., Lancaster, T., 2012. Nicotine replacement therapy for smoking cessation. Cochrane Database Syst. Rev. 2017 (12). https://doi.org/10.1002/14651858.CD000146.pub4. John Wiley and Sons Ltd.
Sun, Y.-W., Kosinska, W., Guttenplan, J.B., 2019. E-cigarette aerosol condensate enhances metabolism of benzo(a)pyrene to genotoxic products, and induces CYP1A1 and CYP1B1, likely by activation of the aryl hydrocarbon receptor. Int. J. Environ. Res. Public Health 16 (14). https://doi.org/10.3390/ijerph16142468.
Talih, S., Balhas, Z., Eissenberg, T., Salman, R., Karaoghlanian, N., El Hellani, A., Baalbaki, R., Saliba, N., Shihadeh, A., 2015. Effects of user puff topography, device voltage, and liquid nicotine concentration on electronic cigarette nicotine yield: measurements and model predictions. Nicotine Tob. Res. 17 (2), 150–157. https://doi.org/10.1093/ntr/ntu174.
Talih, S., Balhas, Z., Salman, R., Karaoghlanian, N., Shihadeh, A., 2016. Direct dripping": a high-temperature, high- formaldehyde emission electronic cigarette use method. Nicotine Tob. Res. 18 (4), 453–459. https://doi.org/10.1093/ntr/ntv080.
Uchiyama, S., Noguchi, M., Sato, A., Ishitsuka, M., Inaba, Y., Kunugita, N., 2020. Determination of thermal decomposition products generated from E-cigarettes. Chem. Res. Toxicol. 33 (2), 576–583. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00410.
van der Toorn, M., Frentzel, S., De Leon, H., Goedertier, D., Peitsch, M.C., Hoeng, J., 2015. Aerosol from a candidate modified risk tobacco product has reduced effects on chemotaxis and transendothelial migration compared to combustion of conventional cigarettes. Food Chem. Toxicol. 86, 81–87. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.09.016.
Wang, G., Liu, W., Song, W., 2019. Toxicity assessment of electronic cigarettes. Inhal. Toxicol. 31 (7), 259–273. https://doi.org/10.1080/08958378.2019.1671558. Taylor and Francis Ltd.
WHO, 2019. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic.
WHO Tobacco Laboratory, 2012. WHO SOP 01Standard Operating Procedure for Intense Smoking of Cigarettes. WorldHealth Organization, Geneva, Switzerland.
Wong, E.T., Kogel, U., Veljkovic, E., Martin, F., Xiang, Y., Boue, S., Vuillaume, G., Leroy, P., Guedj, E., Rodrigo, G., Ivanov, N.V., Hoeng, J., Peitsch, M.C., Vanscheeuwijck, P., 2016. Evaluation of the tobacco heating system 2.2. Part 4: 90-day OECD 413 rat inhalation study with systems toxicology endpoints demonstrates reduced exposure effects compared with cigarette smoke. Regul. Toxicol. Pharmacol. 81 (Suppl 2), S59–S81. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.10.015.
Woodward, M., Tunstall-Pedoe, H., 1993. Self-titration of nicotine: evidence from the Scottish Heart Health Study. Addiction 88 (6), 821–830. https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1993.tb02096.x.
Zhang, S., Zhang, J., Chen, H., Wang, A., Liu, Y., Hou, H., Hu, Q., 2019. Combined cytotoxicity of co-exposure to aldehyde mixtures on human bronchial epithelial BEAS-2B cells. Environ. Pollut. (Barking, Essex : 1987) 250, 650–661. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.118.
Zhao, J., Zhang, Y., Sisler, J.D., Shaffer, J., Leonard, S.S., Morris, A.M., Qian, Y., Bello, D., Demokritou, P., 2018. Assessment of reactive oxygen species generated by electronic cigarettes using acellular and cellular approaches. J. Hazard. Mater. 344, 549–557. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.057.
Zhao, D., Navas-Acien, A., Ilievski, V., Slavkovich, V., Olmedo, P., Adria-Mora, B., Domingo-Relloso, A., Aherrera, A., Kleiman, N.J., Rule, A.M., Hilpert, M., 2019. Metal concentrations in electronic cigarette aerosol: effect of open-system and closed-system devices and power settings. Environ. Res. 174, 125–134. https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.003.

Abstract

Smoking is responsible for 8 million deaths a year worldwide. Currently, smoking cessation is the only solution to lower this mortality, but is made difficult by nicotine addiction. In recent years, new nicotine delivery devices have come onto the market: the electronic cigarette (e-cig) and heated tobacco. Although they are generally perceived as healthier alternatives to cigarettes, their precise impact on human health remains to be determined.

The first objective of this thesis was to analyze the chemical composition and the *in vitro* toxicity of e-cig emissions of different powers (a second-generation model and a third-generation model (Modbox) set at low power, Mb18W, or high power, Mb30W) and heated tobacco emissions to compare them to cigarette smoke. We have been able to show that heated tobacco generates much less carbonyl compounds and PAHs than cigarettes, but much more than e-cig, regardless of the model. Consistently, the exposure of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) cultured at the air-liquid interface to the emissions from the different devices showed that heated tobacco emissions induced less cytotoxicity than cigarette smoke, but much more than e-cig emissions. In addition, exposures to 12 puffs of heated tobacco or 120 puffs of e-cig induce oxidative stress and the secretion of some pro-inflammatory cytokines. Similar effects were observed for cigarette smoke but only after one puff. Interestingly, for e-cig, we have demonstrated that the amount of carbonyl compounds emitted and induced oxidative stress increase with the power of the device.

The second objective of this doctoral project was to evaluate on a mouse model the long-term respiratory toxicity of aerosols generated by a third-generation model of e-cig. BALB/c mice were nose-only exposed for 4 days, 3 months or 6 months to Mb18W or Mb30W emissions or to cigarette smoke. Our *in vivo* experiments have shown that, on the one hand, e-cig emissions generated at 18 W and 30 W were responsible for epigenetic modifications inducing long-term DNA hypermethylation and deregulation of certain miRNAs at all exposure times, but that, on the other hand, only those generated at 30 W were capable of causing oxidative DNA damage, without leading to chromosomal aberrations or gene mutations. Transcriptomic data obtained after 6 months of exposure to e-cig emissions have shown the deregulation of several signaling pathways involved, in particular, in the inflammatory response, oxidative stress and metabolism of carbonyl compounds and, in particular, of propylene glycol metabolites. However, the low number of genes impacted in each of these pathways does not guarantee that the observed deregulations have a real biological impact. By comparison, cigarette smoke induced, under the same exposure conditions, the deregulation of a greater number of signaling pathways, particularly in relation to inflammation and PAH metabolism, each involving a larger number of genes.

Overall, our chemical and *in vitro* analyses suggest that heated tobacco emissions are less toxic than conventional cigarette smoke but much more harmful than those of e-cigs, regardless of their power. Moreover, the *in vivo* experiments described in this work did not reveal a proven long-term toxicity of e-cig emissions. However, a more in-depth study of our transcriptomic data and their comparison with future complementary results from histological analyses of exposed animals, their respiratory function and their pulmonary and systemic inflammatory response should allow us to confirm or invalidate this preliminary conclusion.

Keywords: cigarette, electronic cigarette, heated tobacco, chemical characterization, experimental toxicology in vitro and in vivo.

Résumé

Le tabagisme est responsable de 8 millions de morts par an dans le monde. Le sevrage tabagique est actuellement la seule solution pour endiguer cette mortalité mais il est rendu difficile du fait de l'addiction à la nicotine. Depuis quelques années, de nouveaux dispositifs de délivrance de nicotine sont arrivés sur le marché : la cigarette électronique (e-cig) et le tabac chauffé. Bien qu'ils soient généralement perçus comme des alternatives plus saines à la cigarette, leur impact précis sur la santé humaine reste à déterminer.

Le premier objectif de cette thèse était d'analyser la composition chimique et la toxicité *in vitro* des émissions d'e-cig de différentes puissances (un modèle de deuxième génération et un modèle de troisième génération (Modbox) réglé à une puissance faible, Mb18W, ou forte, Mb30W) et du tabac chauffé et de les comparer à la fumée de cigarette. Nous avons pu montrer que le tabac chauffé génère beaucoup moins de composés carbonylés et de HAP que la cigarette, mais bien plus que l'e-cig, quel que soit le modèle. De manière concordante, l'exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) cultivées à l'interface air-liquide aux émissions des différents dispositifs a permis de mettre en évidence que les émissions de tabac chauffé induisent une cytotoxicité réduite par rapport à la fumée de cigarette, mais bien plus élevée que les émissions d'e-cig. De plus, des expositions à 12 bouffées de tabac chauffé ou à 120 bouffées d'e-cig induisent un stress oxydant et la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires. Des effets similaires sont observés pour la fumée de cigarette mais seulement après 1 bouffée. De manière intéressante, en ce qui concerne l'e-cig, nous avons pu démontrer que la quantité de composés carbonylés émis et le stress oxydant augmentent avec la puissance du dispositif.

Le deuxième objectif de mon projet doctoral consistait à évaluer sur un modèle murin la toxicité respiratoire sur le long terme des émissions d'e-cig de troisième génération. Des souris BALB/c ont été exposées exclusivement par voie nasale pendant 4 jours, 3 mois ou 6 mois aux aérosols de Mb18W ou de Mb30W, ou à la fumée de cigarette. Nos expérimentations *in vivo* ont montré que, d'une part, les émissions d'e-cig générées à 18 W et 30 W sont responsables de modifications épigénétiques induisant sur le long terme une hyper méthylation de l'ADN et la dérégulation de certains miARN à tous les temps d'exposition, mais que, d'autre part, seules celles générées à 30 W sont capables de provoquer des lésions oxydatives de l'ADN, sans pour autant aboutir à des aberrations chromosomiques ou des mutations géniques. Les données transcriptomiques obtenues après 6 mois d'exposition aux aérosols d'e-cig ont mis en évidence la dérégulation de plusieurs voies de signalisation impliquées notamment dans la réponse inflammatoire, le stress oxydant et le métabolisme de composés carbonylés et, en particulier, des métabolites du propylène glycol. Cependant, le faible nombre de gènes impactés dans chacune de ces voies ne garantit pas que les dérégulations observées aient un réel impact biologique. Par comparaison, la fumée de cigarette a induit, dans les mêmes conditions d'exposition, la dérégulation d'un nombre plus important de voies de signalisation, notamment en lien avec l'inflammation et le métabolisme des HAP, et impliquant chacune un nombre de gènes plus conséquent.

Globalement, nos analyses chimiques et *in vitro* suggèrent que les émissions de tabac chauffé sont moins toxiques que la fumée de cigarette conventionnelle mais bien plus nocives que celles des e-cig, quelle que soit leur puissance. Par ailleurs, les expérimentations *in vivo* décrites dans ce travail n'ont pas permis de mettre en évidence une toxicité avérée des émissions d'e-cig sur le long terme. Cependant une étude plus approfondie de nos données transcriptomiques et leur confrontation à des résultats complémentaires à venir issues d'analyses histologiques des animaux exposés, de leur fonction respiratoire et de leur réponse inflammatoire pulmonaire et systémique devraient permettre de confirmer ou d'infirmer cette conclusion préliminaire.

Mots-clés : cigarette, cigarette électronique, tabac chauffé, caractérisation chimique, toxicologie expérimentale in vitro et in vivo.