

- THESE DE DOCTORAT -

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur d'Université
en sciences du médicament et autres produits de santé (pharmacie)

Soutenue publiquement par

M. Nicolas BEAUVAL

Le 12 octobre 2018

EVALUATION DE L'IMPACT SANITAIRE DES CIGARETTES ELECTRONIQUES :
CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DES E-LIQUIDES ET E-VAPEURS

Composition du jury

Delphine ALLORGE PU-PH, Faculté de Pharmacie, Lille	Co-directrice
Jean-Pierre GOULLÉ Professeur émérite, UFR de Médecine et de Pharmacie, Rouen	Rapporteur
Nadine LOCOGE Professeur de l'Institut Mines Telecom, Lille – Douai	Co-directrice
Jérémie POURCHEZ Professeur de l'Institut Mines Telecom, Saint-Étienne	Rapporteur
Vincent VARLET Toxicologue forensique, CHUV, CURML, Lausanne, Suisse	Membre extérieur
Marie VERRIÈLE Enseignant-chercheur de l'Institut Mines Telecom, Lille – Douai	Co-encadrante

Direction de la thèse :

Co-directrices : Delphine ALLORGE et Nadine LOCOGE

Co-encadrantes : Anne GARAT et Marie VERRIÈLE

- THESE DE DOCTORAT -

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur d'Université
en sciences du médicament et autres produits de santé (pharmacie)

Soutenue publiquement par

M. Nicolas BEAUVAL

Le 12 octobre 2018

EVALUATION DE L'IMPACT SANITAIRE DES CIGARETTES ELECTRONIQUES :
CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DES E-LIQUIDES ET E-VAPEURS

Composition du jury

Delphine ALLORGE PU-PH, Faculté de Pharmacie, Lille	Co-directrice
Jean-Pierre GOULLÉ Professeur émérite, UFR de Médecine et de Pharmacie, Rouen	Rapporteur
Nadine LOCOGE Professeur de l'Institut Mines Telecom, Lille – Douai	Co-directrice
Jérémie POURCHEZ Professeur de l'Institut Mines Telecom, Saint-Étienne	Rapporteur
Vincent VARLET Toxicologue forensique, CURML, Lausanne, Suisse	Membre extérieur
Marie VERRIÈLE Enseignant-chercheur de l'Institut Mines Telecom, Lille – Douai	Co-encadrante

Direction de la thèse :

Co-directrices : Delphine ALLORGE et Nadine LOCOGE

Co-encadrantes : Anne GARAT et Marie VERRIÈLE

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Pierre GOULLÉ
d'avoir accepté de présider et d'être rapporteur de cette thèse

Je remercie Madame le Professeur Delphine ALLORGE
de m'avoir accueilli au sein de son service, de m'avoir accompagné et soutenu
tout au long de mon cursus et d'avoir encadré ces travaux de thèse

Je remercie Madame le Professeur Nadine LOCOGE
pour son encadrement et ses conseils, et pour avoir permis cette collaboration
avec l'Institut Mines Télécom Lille-Douai

Je remercie Monsieur le Professeur Jérémie POURCHEZ
d'avoir spontanément accepté d'être rapporteur de cette thèse

Je remercie Monsieur le Docteur Vincent VARLET
d'avoir accepté de juger ce travail

Je remercie Madame le Docteur Marie VERRIÈLE
d'avoir encadré et suivi de près ces travaux

Je remercie Madame le Docteur Anne GARAT
pour son encadrement

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Marc LO GUIDICE
de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir soutenu

Je remercie Monsieur le Professeur Patrice CODDEVILLE
de m'avoir accueilli dans son département et son équipe

Je remercie Monsieur le Professeur Guillaume GARÇON
de m'avoir accueilli dans son laboratoire

Je remercie Monsieur le Docteur Michael HOWSAM
pour ses précieux conseils

Je remercie les équipes du laboratoire de Toxicologie du CHRU, de l'EA4483
et du département SAGE de l'IMT Lille-Douai pour leur accueil

A mes parents, qui ont toujours été auprès de moi, malgré la distance ...

A mes grands-parents qui, je l'espère, sont fiers de moi, où qu'ils soient ...

A mes sœurs et toute ma famille pour leur soutien,

A Julie, pour m'avoir supporté et soutenu,

A mes amis, pour leur soutien et leur bonne humeur,

A Charlie.

SOMMAIRE

CONTEXTE.....	15
INTRODUCTION GENERALE	19
1. Le tabagisme.....	21
2. La cigarette électronique	21
2.1. Un nouveau produit de consommation.....	21
2.2. Principe général de fonctionnement	22
2.3. Présentation des modèles.....	23
3. L’e-liquide	26
4. Le cadre règlementaire.....	29
5. La présence et/ou l’émission potentielle de polluants	31
6. Positionnement des travaux	35
TRAVAUX PERSONNELS.....	37
1. Produits et technologies utilisés	39
1.1. Produits testés.....	39
1.2. Machine à fumer/vapoter.....	40
2. Développement et validation d’une méthode de dosage des éléments traces métalliques par ICP-MS pour l’analyse d’e-liquides	43
2.1. Objectif	43
2.2. Les éléments traces métalliques	43
2.3. L’analyse par ICP-MS.....	45
2.4. Limite de la méthode	47
2.5. Analyse des e-liquides.....	48
2.6. Vers l’analyse des e-vapeurs	49
2.7. Article #1	50
3. Evaluation chimique des cigarettes électroniques : analyse multi-composants des e-liquides et de leurs vapeurs respectives et comparaison à la cigarette conventionnelle	67
3.1. Objectif	67
3.2. Les composés d’intérêt.....	67
3.3. La génération des e-vapeurs et fumées de cigarette	68

3.4. La collecte des e-vapeurs et fumées	69
3.5. Les techniques analytiques.....	71
3.6. Vérification de la composition des e-liquides	71
3.7. Vers une estimation de l'exposition aux polluants ?.....	71
3.8. Article #2.....	73
4. Influence des conditions de génération de bouffées sur la composition des e-vapeurs en composés carbonylés	105
4.1. Objectifs.....	105
4.2. Composés carbonylés et cigarette électronique	105
4.3. Principe de l'étude	107
4.4. Des profils « moins à risque » ?.....	109
4.5. Représentativité des résultats.....	110
4.6. Réalisme de l'expérience.....	110
4.7. Article #3.....	111
DISCUSSION GENERALE	149
BIBLIOGRAPHIE	161
ANNEXES.....	175
ANNEXE 1 : Tableaux des paramétrages de l'ICP-MS VARIAN 820-MS pour les analyses des e-liquides et e-vapeurs (sans et avec gaz de collision)....	177
ANNEXE 2 : Evaluation de l'effet de la matrice e-liquide sur l'analyse des ETM par ICP-MS.....	178

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Schéma général d'une cigarette électronique avec l'exemple d'un modèle de 2 ^{ème} génération	23
Figure 2. Cigarette électronique de 1 ^{ère} génération ou "Cig-a-Like"	24
Figure 3. Cigarettes électroniques de 2 ^{ème} génération ou "Mid-size"	24
Figure 4. Cigarettes électroniques de 3 ^{ème} génération ou "Mods"	25
Figure 5. Cigarette électronique de 4 ^{ème} génération, ici avec une forme de boîtier	25
Figure 6. Exemple de présentation d'e-liquide	26
Figure 7. Exemples de saveurs pour e-liquides	28
Figure 8. Modèles de cigarette électronique Lounge (2 ^{ème} génération) et Mod Box TC (4 ^{ème} génération)	40
Figure 9. Smoking machine VC1	41
Figure 10. Schéma du processus d'ionisation de l'échantillon dans le plasma	46
Figure 11. Caractéristiques des profils de génération de bouffée ISO 3308 et CORESTA	69
Figure 12. Exemple de barboteur et de cartouche d'adsorbant	70
Figure 13. Matériel ayant servi au monitoring de la température des e-vapeurs en sortie d'embout buccal de cigarette électronique.....	108
Figure 14. Méthodes de collecte et d'analyse des composés carbonylés.....	108

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Concentrations limites en ETM dans les e-liquides selon la norme XP D90-300-2 de l'AFNOR [37].....	31
Tableau 2. Méthodes analytiques développées pour la nicotine, les nitrosamines spécifiques du tabac, les métaux, les composés organiques volatiles et les phénols d'après Cheng 2014 [52].....	33
Tableau 3. Méthodes analytiques développées pour les HAP, arômes, solvants, alcaloïdes, drogues et particules d'après Cheng 2014 [52]	34
Tableau 4. Comparaison des niveaux de composés toxiques entre les cigarettes conventionnelles et électroniques d'après Goniewicz et al. (2013) [55] ...	35
Tableau 5. Caractéristiques et paramètres des cigarettes électroniques utilisées.....	40
Tableau 6. Classification des ETM (et dérivés) selon leur cancérogénicité d'après le CIRC	45
Tableau 7. Effet de la matrice e-liquide sur le signal des étalons internes par analyse ICP-MS.....	47
Tableau 8. Concentrations en ETM (en µg/L) d'e-liquides rapportées dans la littérature.....	48
Tableau 9. Profils de vapotage étudiés	107
Tableau 10. Comparaison des concentrations en carbonylés (ng/bouffée) identifiés dans les e-vapeurs issues du e-liquide NHOSS « menthe chlorophylle » à 16 mg/mL de nicotine à celles mesurées dans la fumée de la cigarette 3R4F et rapportées par Eldridge et al. (2015) [61].	109

VALORISATION SCIENTIFIQUE DES TRAVAUX

Publications dans des journaux à comité de lecture

Beauval N, Howsam M, Anthérieu S, Allorge D, Soyez M, Garçon G, Goossens JF, Lo-Guidice JM, Garat A. Trace elements in e-liquids-Development and validation of an ICP-MS method for the analysis of electronic cigarette refills. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2016 Aug 1;79:144-8.

Anthérieu S, Garat A, Beauval N, Soyez M, Allorge D, Garçon G, Lo-Guidice JM. Comparison of cellular and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. Toxicology in vitro. 2017 Dec 1;45:417-25.

Beauval N, Antherieu S, Soyez M, Gengler N, Grova N, Howsam M, Hardy EM, Fischer M, Appenzeller BMR, Goossens JF, Allorge D, Garçon G, Lo-Guidice JM, Garat A. Chemical evaluation of electronic cigarettes: multicomponent analysis of liquid refills and their corresponding aerosols. Journal of Analytical Toxicology. 2017 Oct 1;41(8):670-8.

Beauval N, Verrielle M, Garat A, Fronval I, Dusautoir R, Anthérieu S, Garçon G, Lo-Guidice JM, Allorge D, Locoge N. Influence of puffing conditions on the carbonyl composition of e-cigarette aerosols. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2019 Jan;222(1):136-46

Thèse d'exercice – doctorat de Pharmacie

Évaluation de l'impact sanitaire des cigarettes électroniques : développement et validation de méthodes de dosage des éléments trace métalliques pour la caractérisation des e-liquides et des e-vapeurs. 23 octobre 2017

Communications orales

Beauval N, Howsam M, Anthérieu S, Allorge D, Soyez M, Garçon G, Goossens JF, Lo-Guidice JM, Garat A. Éléments traces métalliques et cigarette électronique: développement et validation de méthodes de dosage par ICP-MS pour l'analyse des e-liquides et de leurs aérosols. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 2016 Jun 1;28(2):S22.

Présentée au 24^{ème} congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique (Perpignan, juin 2016) - Récompensée du prix de la meilleure communication orale

Beauval N, Antherieu S, Soyez M, Gengler N, Grova N, Howsam M, Hardy E, Fischer M, Appenzeller B, Goossens JF, Allorge D, Garçon G, Lo-Guidice JM, Garat A. Développement et validation de méthodes pour l'analyse de la composition chimique des e-liquides et de leurs e-vapeurs, et comparaison à la fumée de cigarette conventionnelle. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 2017 May 1;29(2):S33-4.

Présentée au congrès joint de la Société Française de Toxicologie Analytique et de la Société de Toxicologie Clinique (Avignon, mai 2017)

Communications affichées

Beauval N, Verrielle M, Anthérieu S, Soyez M, Howsam M, Goossens JF, Garçon G, Lo-Guidice JM, Allorge D, Garat A, Locoge N. Etude de la composition chimique des vapeurs de cigarette électronique : analyse des éléments trace métalliques et composés carbonylés.

Présenté à la 1^{ère} Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie de Lille (Lille, juillet 2017)

Beauval N, Verrielle M, Garat A, Lo-Guidice JM, Allorge D, Locoge N. Carbonyl compound generation during vaping: study of the influence of puffing regimen.

Présenté à la 17^{ème} Journée André Verbert (Villeneuve d'Ascq, septembre 2017)

ABBREVIATIONS

AFNOR	=	Agence française de normalisation
AFSSAPS	=	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
ANSM	=	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
CIRC	=	Centre international de recherche sur le cancer
COFRAC	=	Comité français d'accréditation
CORESTA	=	Centre de coopération pour les recherches scientifiques relatives au tabac
DNPH	=	2,4-Dinitrophenylhydrazine
ETINCEL	=	Enquête téléphonique pour l'information sur la cigarette électronique
ETM	=	Eléments traces métalliques
FDA	=	<i>Food and drug administration</i>
GRAS	=	<i>Generally recognized as safe</i>
HAS	=	Haute autorité de santé
HCSP	=	Haut conseil de santé publique
HPLC-UV	=	Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet
ICP-MS	=	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
INPES	=	Institut national de prévention et d'éducation pour la santé
ISO	=	<i>International organization for standardization</i>
OFDT	=	Observatoire français des drogues et des toxicomanies
OFT	=	Office français de prévention du tabagisme
TNS	=	Traitement nicotinique de substitution
USB	=	<i>Universal serial bus</i>
USEPA	=	<i>US Environmental Protection Agency</i>

CONTEXTE

La cigarette électronique est un produit de consommation apparu en France à la fin des années 2000. Elle est vendue comme une alternative au tabac conventionnel et jouit aujourd'hui d'une forte notoriété. Proposant aux consommateurs une gestuelle et des sensations proches de celles d'un fumeur, elle peut être consommée avec ou sans nicotine. En raison de sa popularité croissante, voire même explosive au début des années 2010, de son positionnement concurrentiel face à la cigarette conventionnelle, du manque de données scientifiques concernant son impact sanitaire et du peu de réglementation spécifique, la cigarette électronique est rapidement entrée au cœur de nombreux débats de Santé Publique.

Les méfaits du tabac sont aujourd'hui relativement bien connus. Il est la plus grande cause de mortalité évitable et on lui attribue en France, pour l'année 2013, 73 000 décès dont 46 000 par cancer [1]. Alors que la perspective de disposer d'un nouveau moyen de lutte contre le tabagisme est considérée avec attention, les risques potentiels du vapotage ne sont, encore aujourd'hui, pas clairement caractérisés. Parmi les questions posées les plus préoccupantes : la cigarette électronique présente-elle un risque toxique pour l'utilisateur ? Pour son entourage ? Par rapport au tabac conventionnel ? Constitue-t-elle une aide efficace au sevrage tabagique ? Peut-elle au contraire favoriser l'entrée dans le tabagisme, notamment chez les jeunes ? Peut-elle induire des dépendances à la nicotine ? Peut-elle diminuer les chances de sevrage total ?

Les études scientifiques sur la cigarette électronique se sont multipliées depuis le début des années 2010 et ont abordé un certain nombre de problématiques. Une récente revue de la littérature, publiée en novembre 2016, a recensé 687 articles scientifiques explorant ou décrivant pour les cigarettes électroniques (1) les caractéristiques du produit, (2) les effets sur la santé, (3) la perception des consommateurs, (4) les modes d'utilisation, (5) le potentiel d'induction de dépendance, (6) l'aide au sevrage tabagique, (7) le marketing et la communication, (8) les ventes et (9) les politiques appliquées [2]. Il en ressort qu'il existe encore aujourd'hui un certain nombre de limites à l'interprétation des données disponibles, particulièrement en ce concerne l'étude des émissions : les e-cigarettes et les techniques d'analyse physicochimique des e-vapeurs étudiées sont très variables

d'une étude à l'autre ; il n'existe pas de définition du (ou de plusieurs) profil(s) type(s) de vapoteurs ; l'extrapolation des données *in vitro* et *in vivo* à l'Homme n'est pas évidente et il manque cruellement d'informations sur les effets d'une consommation, à court et long terme, chez l'Homme [2].

Parallèlement aux avancées scientifiques dans ce domaine, l'avis et les recommandations des autorités sanitaires françaises sur l'utilisation de la cigarette électronique ont évolué ces dernières années. En 2011, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Produits de Santé (Afssaps), actuelle Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), recommandait de ne consommer aucun produit s'apparentant aux cigarettes électroniques et avait en outre précisé les critères selon lesquels ces produits seraient considérés comme des médicaments. En effet, les produits revendiquant l'aide au sevrage tabagique ou dont la teneur en nicotine est supérieure à 20 mg/mL relèveraient de la réglementation du médicament [3]. Dans un point d'information du 19 juillet 2016, l'ANSM rappelait qu'aucune demande d'autorisation de mise sur le marché de cigarette électronique ou de flacon de recharge, en tant que médicament ou dispositif médical, n'avait été déposée [4]. En 2014, la Haute Autorité de Santé (HAS) ne recommandait pas l'utilisation de la cigarette électronique pour le sevrage tabagique sans pour autant la décourager chez un fumeur qui a commencé à vapoter et qui veut s'arrêter de fumer [5]. Le discours commence à changer en 2016 lorsque le Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) considère que : « la cigarette électronique est un outil d'aide à l'arrêt du tabac chez les personnes désireuses de sortir du tabagisme et apparaît être un mode de réduction des risques du tabac en usage exclusif ». Le HCSP recommande cependant de rappeler aux professionnels de santé et aux fumeurs, sans en faire la publicité, les avantages et les inconvénients de l'utilisation de la cigarette électronique, et de maintenir les stratégies de prévention en place, telles que l'interdiction de publicité et de vente aux mineurs. Concernant les populations spécifiques, le HCSP recommande l'interdiction de vente aux mineurs, mais ne statue pas clairement sur le cas de la femme enceinte pour lequel le risque pour l'embryon est encore inconnu [6].

La position encore prudente des autorités sanitaires témoigne du manque de recul que nous subissons actuellement sur la connaissance des effets du vapotage chez l'Homme et du besoin de confirmer les données scientifiques existantes, en particulier en termes d'exposition du vapoteur.

INTRODUCTION GENERALE

1. Le tabagisme

Le tabagisme est aujourd'hui la plus grande cause de mortalité évitable dans le monde et est responsable de près de 7 millions de décès chaque année, dont environ 890 000 seraient dus au tabagisme passif [7]. En France, on lui attribue pour l'année 2013, 73 000 décès dont 46 000 par cancer [1]. Au total, 21 pathologies sont formellement associées à la consommation de tabac, un nombre possiblement sous-estimé [8].

En 2017, 36 pourcents de la population française fument la cigarette, le cigare, le cigarillo ou la pipe et 22 % sont d'anciens fumeurs, ce qui classe la France parmi les plus grands consommateurs d'Europe [9]. Un programme national de réduction du tabagisme a été lancé en 2014 et vise à réduire le nombre de fumeurs quotidiens d'au moins 10 % d'ici 2019 et à aboutir à une première génération « sans tabac » d'ici 2032 [10]. Plusieurs leviers d'action sont proposés, incluant notamment l'amélioration de l'encadrement des dispositifs électroniques de vapotage.

Le sevrage tabagique est actuellement la seule mesure efficace pour ralentir le développement des pathologies associées au tabac et diminuer le risque de décès [11]. Or, alors que deux tiers des fumeurs déclarent souhaiter arrêter de fumer, le taux de sevrage à 6–12 mois en absence d'aide, pharmacologique ou autre, est estimé entre 3 et 5 %. La majorité des tentatives d'arrêt aboutissent à une alternance de périodes de rechute et d'abstinence sur plusieurs années [12]. En France, l'aide au sevrage tabagique consiste en un accompagnement psychologique et motivationnel par des professionnels de santé associé, ou non, à un traitement médicamenteux (traitement nicotinique de substitution, varénicline [Champix®] ou bupropion [Zyban®]). Ces stratégies ont aujourd'hui démontré une certaine efficacité, cependant partielle.

2. La cigarette électronique

2.1. Un nouveau produit de consommation

L'origine de la cigarette électronique sous sa forme contemporaine est attribuée à Hon Lik, un pharmacien et ingénieur chinois qui créa, en 2003, un dispositif destiné à simuler l'utilisation d'une cigarette conventionnelle. Son principe

général de fonctionnement est la vaporisation/aérosolisation d'un liquide, appelé « e-liquide » contenant, ou non, de la nicotine [13]. La vapeur (ou aérosol ou « e-vapeur ») ainsi créée, assimilée à la fumée de cigarette conventionnelle, est aspirée par l'utilisateur que l'on nomme « vapoteur ». Par déclinaison, l'action de « vapoter » est le « vapotage ». Aussi appelée « e-cigarette » ou « e-cig », elle est aujourd'hui le principal représentant des « inhalateurs électroniques de nicotine » qui se présentent sous des formes multiples et variées : cigares, cigarillos, pipes, pipes à eau, stylos ou clés USB par exemple [14].

La notoriété de la cigarette électronique a considérablement augmenté ces dernières années jusqu'à atteindre 99 % chez les plus de 15 ans en France et en Europe, d'après les résultats de l'Eurobaromètre 2017 [9]. Selon ces dernières données, les français figurent parmi les plus grands expérimentateurs à l'échelle européenne, avec 24 % des personnes interrogées ayant testé au moins une fois la cigarette électronique, contre une moyenne de 15 % pour l'ensemble des 28 pays inclus dans l'enquête. De même, 4 % des français interrogés ont déclaré utiliser actuellement une cigarette électronique ou un dispositif similaire, contre une moyenne européenne de 2 %. La tendance à l'augmentation ou à la diminution du nombre d'utilisateurs réguliers d'e-cigarette reste néanmoins assez difficile à évaluer sur ces dernières années. En effet, la proportion d'utilisateurs réguliers a été estimée à 3,3 % de la population française selon l'enquête ETINCEL de l'OFDT réalisée entre 2013 et 2014 [13], à 4 % des plus de 15 ans selon l'Eurobaromètre 2014 [15] et à 6,0 % des 15 – 75 ans selon le baromètre santé 2014 de l'INPES [16]. Toutefois, le marché français de la cigarette électronique semble avoir connu une perte de vitesse en 2015 avec un chiffre d'affaires total en baisse de 10 % par rapport à 2014 et avec la disparition de près de 400 points de vente sur un total de 2 400 [17]. Ce ralentissement, supposément la conséquence de la fin d'un effet de mode ou de la saturation inévitable du marché, pourrait ne pas durer, le marché étant prédit à la hausse pour 2018 [17].

2.2. Principe général de fonctionnement

La cigarette électronique est composée de 3 parties principales : une pile ou batterie, un réservoir et un atomiseur [18]. L'e-liquide contenu dans le réservoir est passivement acheminé par capillarité, grâce à un système de mèche ou de bourre,

vers une résistance chauffante (ou « *coil* ») située dans l'atomiseur. Le réservoir est appelé « cartomiseur » lorsqu'il contient l'atomiseur et « clearomiseur » lorsque ses parois sont transparentes. Lors d'une session de vapotage, la batterie alimente la résistance chauffante alors que l'utilisateur aspire une bouffée au niveau de l'embout buccal (ou « *drip tip* ») (Figure 1). Le flux d'air ainsi généré traverse la cheminée de l'atomiseur et entraîne l'e-liquide chauffé sous forme d'aérosol. Le déclenchement de la chauffe peut être activé par un bouton pression (ou « *switch* ») ou par l'aspiration d'une bouffée. Les modèles à déclenchement par aspiration tendent toutefois à disparaître du marché.

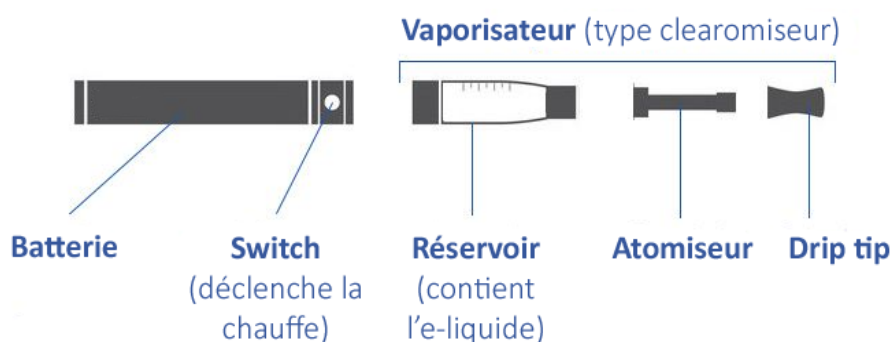


Figure 1. Schéma général d'une cigarette électronique avec l'exemple d'un modèle de 2^{ème} génération (d'après <http://www.cigadvisor.com/cigaretteelectronique>)

2.3. Présentation des modèles

Depuis les premiers modèles commercialisés, la cigarette électronique a connu plusieurs transformations. Taille, technologie, architecture et design ont été adaptés pour satisfaire le plus grand nombre d'utilisateurs. Il est possible à l'heure actuelle de distinguer 4 générations d'e-cigarettes [19] :

- ◆ 1^{ère} génération : les « *Cig-a-Likes* »

Cette première génération de cigarette électronique a pour caractéristique principale de ressembler à une cigarette classique (taille, aspect) (Figure 2). Le détail est parfois poussé jusqu'à la présence d'une diode électroluminescente à l'extrémité de l'e-cigarette qui s'allume à l'aspiration. Elle peut se trouver sous forme jetable ou réutilisable, le consommable principal étant le cartomiseur pré-rempli d'e-liquide.



Figure 2. Cigarette électronique de 1^{ère} génération ou "Cig-a-Like"
(<http://ecigclopedia.com/the-4-generations-of-electronic-cigarettes/>)

◆ 2^{ème} génération : les « Mid-size »

La deuxième génération des cigarettes électronique se détache de la cigarette conventionnelle par un design plus moderne et coloré (Figure 3). Les e-cigarettes sont plus grandes et réutilisables grâce à la transformation de plusieurs pièces en consommables : *drip tip*, atomiseur, réservoir, batterie.



Figure 3. Cigarettes électroniques de 2^{ème} génération ou "Mid-size"
(<http://ecigclopedia.com/the-4-generations-of-electronic-cigarettes/>)

◆ 3^{ème} génération : les modèles personnalisables ou « Mods »

Au-delà d'être réutilisable, la 3^{ème} génération de cigarette électronique, désignée modèle « Mod » pour « modifiée », est personnalisable. Les modèles sont généralement plus imposants et présentent des formes beaucoup plus variées que ceux de 2^{ème} génération (Figure 4). Ces modèles aux caractéristiques plus ou moins modulables permettent d'améliorer les sensations recherchées par l'utilisateur en ajustant les conditions de génération de la vapeur. La valeur de la résistance

chauffante, la puissance appliquée par la batterie et la taille de l'entrée d'air influent notamment sur le volume, la densité et la température de la vapeur.



Figure 4. Cigarettes électroniques de 3^{ème} génération ou "Mods"
(<http://eciglopedia.com/the-4-generations-of-electronic-cigarettes/>)

◆ 4^{ème} génération : Mods optimisés

Davantage une 3^{ème} génération améliorée, certains regroupent dans la 4^{ème} génération les modèles les plus récents de cigarette électronique proposant un maximum de réglages de confort ou de personnalisation sur le même dispositif (Figure 5). Les avantages mis en avant sur ces derniers modèles sont les résistances « *sub-ohm* » permettant une chauffe plus intense, des batteries plus puissantes et de meilleure autonomie, le réglage automatique de la puissance ou l'utilisation de matériaux spécifiques type nickel 200 ou titane pour la résistance. Ces deux matériaux permettraient notamment de régler directement la température de chauffage plutôt que le voltage ou la puissance de la batterie, paramètres plus abstraits pour les utilisateurs.



Figure 5. Cigarette électronique de 4^{ème} génération, ici avec une forme de boîtier
(<http://www.smokstore.us/Joyetech-Cuboid-Tap-Vape-Box-Mod-Starter-Kit>)

3. L'e-liquide



Figure 6. Exemple de présentation d'e-liquide
(<http://www.nhoss.com/les-saveurs-classiques/58-e-liquide-saveur-classic-blond.html>)

L'e-liquide désigne l'ensemble des liquides utilisés avec la cigarette électronique [18]. Il s'agit du consommable qui est transformé en e-vapeur au cours du vapotage. Il est la plupart du temps commercialisé sous forme de flacon de 10 mL (Figure 6), néanmoins des contenants plus volumineux sont disponibles sur Internet. D'une manière générale, l'e-liquide est principalement composé d'un mélange, en proportions variables, de propylène glycol et glycérol, auquel s'ajoutent des arômes divers et des quantités variables de nicotine, d'eau et d'éthanol. Le propylène glycol et le glycérol sont utilisés pour rendre l'e-vapeur visible et comme exhausteur d'arôme. Plus la teneur en propylène glycol est élevée, plus la saveur est prononcée et moins la vapeur est abondante. Inversement, plus la teneur en glycérol est élevée, plus la vapeur est abondante et moins la saveur est prononcée [20]. Les e-liquides commerciaux sont le plus souvent composés d'un mélange propylène glycol/glycérol aux alentours de 70/30 ou 50/50, mais il existe par exemple des e-liquides 100 % glycérol pour les consommateurs souhaitant créer d'importants « nuages de vapeurs ». De plus, il existe des kits « *do-it-yourself* » pour fabriquer soi-même son e-liquide. Ainsi, le consommateur peut s'adonner à tous types de mélanges, ce qui questionne d'autant plus sur la sécurité de ces produits.

◆ *Propylène glycol ou propane-1,2-diol*

Le propylène glycol (N° CAS : 57-55-6) est un liquide incolore, légèrement visqueux, peu volatil et pratiquement inodore. Outre ses utilisations industrielles comme intermédiaire de synthèse ou composant de liquides réfrigérants, il est aussi

utilisé comme solvant, émulsifiant, humectant ou conservateur dans l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique et les cosmétiques [21]. Le propylène glycol est considéré peu toxique pour l'Homme et fait partie de la liste des substances alimentaires GRAS (pour « *generally recognised as safe* ») par la *Food and Drug Administration* (FDA) [22]. Des expositions professionnelles peuvent conduire à des irritations cutanées et des muqueuses et, plus rarement, à des allergies [21]. Il convient toutefois, dans le cas de la cigarette électronique, de nuancer ces informations au regard du mode d'exposition particulier qu'est le vapotage. En effet, il s'agit là d'une exposition répétée par voie pulmonaire à un aérosol fortement concentré en propylène glycol.

◆ *Glycérol ou propane-1,2,3-triol*

Le glycérol (N° CAS : 56-81-5), ou glycérine, est un liquide incolore, visqueux et inodore. Il est aujourd'hui utilisé dans de très nombreux domaines comme excipient dans l'industrie pharmaceutique, intermédiaire de synthèse chimique, composant de fluides industriels, humectant dans les produits du tabac ou additif dans les produits alimentaires. Le glycérol fait aussi partie de la liste des substances alimentaires GRAS et est aussi considéré comme peu toxique pour l'Homme, par inhalation ou contact cutané [22,23]. Encore une fois, le mode d'exposition particulier du vapotage, jusqu'à maintenant peu étudié, est à prendre en considération.

◆ *Nicotine*

La nicotine (N° CAS : 54-11-5) est un alcaloïde issu du tabac et est utilisée dans les produits du tabac, produits connexes ou médicaments du sevrage tabagique. Elle se présente sous la forme d'un liquide huileux incolore à l'odeur âcre. C'est un agoniste des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine présents dans le système nerveux [24]. Sous forme de *shoot via* la cigarette, elle a un effet anxiolytique, coupe-faim et stimulant [25]. Cependant, une intoxication aiguë à la nicotine par voie orale, cutanée ou respiratoire peut se manifester par des signes cliniques généraux non spécifiques d'apparition rapide tels que des crampes abdominales, agitation, faiblesse, nausées, vomissements ou convulsions. Les cas graves d'intoxication peuvent s'avérer fatals. L'exposition répétée à la nicotine *via* la

cigarette favoriserait les processus d'athérosclérose, le développement d'évènements coronaires aigus et pourrait contribuer au développement des pathologies liées au tabac. Cependant, le lien de causalité est difficile à déterminer en raison de l'exposition concomitante aux nombreuses substances nocives émises dans la fumée de tabac [24]. Les données disponibles sont aujourd'hui insuffisantes pour conclure sur la cancérogénicité de la nicotine ou sur ses effets sur la reproduction [6,24]. On attribue à la nicotine un important pouvoir addictogène, participant à la dépendance au tabac [26]. Le syndrome de manque peut se manifester par de l'anxiété, une agitation, une irritabilité, des perturbations du sommeil, une humeur dépressive et des troubles de la concentration [27].

La concentration en nicotine des e-liquides vendus en France est aujourd'hui limitée à 20 mg/mL selon l'arrêté du 19 mai 2016 relatif aux produits du vapotage contenant de la nicotine. Il est donc possible de trouver dans le commerce presque toutes les concentrations allant de 0 à 20 mg/mL mais des produits plus concentrés sont disponibles sur Internet [28]. Selon le rapport de l'office français de prévention du tabagisme (OFT), l'utilisation de nicotine avec l'e-cigarette présente un risque de développer une dépendance chez un non-fumeur, de maintenir la dépendance d'un fumeur ou encore de créer un pont vers le tabagisme [18].

◆ *Arômes*



Figure 7. Exemples de saveurs pour e-liquides
(<https://www.vapoclope.fr/img/cms/AROMES%20 CAPELLA.jpg>)

Les différentes marques d'e-liquides proposent un large choix de saveurs (Figure 7), ce qui constitue un outil marketing puissant. Une étude publiée en 2014 a recensé 7 764 noms uniques de saveurs pour 466 marques d'e-liquides sur des sites

Internet de vente anglosaxons, ce qui représente un nombre considérable de mélanges potentiels de molécules organiques volatiles [29,30]. Ces saveurs étant souvent obtenues par mélange d'arômes alimentaires, elles sont considérées sans danger par ingestion, mais leurs effets par inhalation sont peu connus. Selon leur concentration dans les e-liquides, les arômes pourraient présenter un intérêt sur le plan toxicologique [30]. Des effets cytotoxiques ont par exemple été rapportés pour l'arôme cannelle [31,32]. L'utilisation du diacétyl dans les e-liquides, qui apporte une saveur beurrée aux e-vapeurs, est notamment déconseillée en raison d'un risque accru de pathologies obstructives respiratoires [33].

En Europe, les saveurs les plus populaires sont les saveurs fruitées, suivies des saveurs de tabac, de menthe et sucrées (chocolat par exemple) [9].

4. Le cadre réglementaire

Le statut légal de la cigarette électronique est variable en fonction du pays, à savoir qu'elle est considérée comme un produit de consommation, un produit thérapeutique ou un produit du tabac [14]. En France, initialement classée comme un produit de consommation, l'e-cigarette est devenue depuis le 20 mai 2016 un « produit du vapotage » selon l'ordonnance n° 2016-623 portant transposition de la directive européenne 2014/40/UE [34,35]. Cette modification a notamment eu pour effet d'améliorer les politiques et moyens de prévention en définissant les exigences de fabrication, de présentation, de vente et de propagande de la cigarette électronique et des e-liquides.

L'agence française de normalisation (AFNOR) a par ailleurs publié dès mars 2015 les premières normes, décrivant les exigences et méthodes d'essai de la cigarette électronique et des e-liquides (respectivement XP D90-300-1 et XP D90-300-2) [36,37], qui ont été suivies en juillet 2016 par une troisième norme relative aux émissions (XP D90-300-3) [38]. Ces normes sont expérimentales et volontaires. Les acteurs du marché sont libres de s'auto-déclarer respectueux de la norme, sans contrôle extérieur, mais encourtent des sanctions en cas d'utilisation abusive de la norme.

La norme XP D90-300-1 prévoit notamment de tester l'e-cigarette sur le risque de rupture, de feu, d'explosion ou encore sur les risques chimiques, thermiques et liés à l'étanchéité. Elle décrit aussi le contenu et la forme de l'information mise à la

disposition du consommateur comme la dénomination commerciale du produit, ses caractéristiques physiques (diamètre de l'orifice de remplissage du réservoir par exemple) ou l'identification du responsable de la mise sur le marché.

La norme XP D90-300-2 se focalise sur les e-liquides et définit notamment des exigences de qualité des ingrédients de l'e-liquide : le propylène glycol, le glycérol et la nicotine doivent, par exemple, répondre aux exigences de la pharmacopée européenne ou américaine. Un certain nombre de substances, ou catégories de substances, ne doivent pas être utilisées comme les édulcorants, les parabènes, le diacétyl ou l'éthylène glycol. De même, diverses impuretés ne doivent pas être retrouvées dans les e-liquides ou doivent être en dessous d'une certaine concentration. La norme XP D90-300-2 propose pour l'instant des valeurs limites pour quelques éléments traces métalliques (ETM) (As, Cd, Hg, Pb, Sb - Tableau 1) et quelques composés carbonylés (formaldéhyde, acétaldéhyde et acroléine). En l'absence de méthode de référence, des techniques de dosage sont proposées pour quelques composés, mais uniquement à titre d'exemple. Aussi, la norme XP D90-300-2 propose des essais concernant la sécurité des flacons d'e-liquide et liste les informations qu'ils doivent comporter.

La norme XP D90-300-3 s'attache aux risques liés aux émissions : brûlure des lèvres ou de la bouche, inhalation de nicotine, de substances irritantes, toxiques ou de particules métalliques. Elle prévoit notamment de tester les dispositifs avec deux e-liquides « standards », de formulation différente, pour surveiller les émissions de nicotine, composés carbonylés et ETM. La norme décrit une machine à vapoter « standard » ainsi que les conditions de génération des bouffées (profil de bouffée inspiré du profil recommandé par le CORESTA [39], nombre de séries de bouffées, nombre de bouffées par série, etc.), et propose des valeurs limites de concentration, dans les e-vapeurs, des mêmes composés carbonylés que pour l'e-liquide et de certains ETM (As, Cd, Cr, Ni, Pb, Sb). De la même manière que pour les e-liquides, des exemples de techniques de dosage sont proposés, à titre informatif.

Depuis 2016, les organismes européens et internationaux de normalisation travaillent aussi sur l'élaboration de nouvelles normes relatives aux cigarettes électroniques et produits dérivés [40,41].

5. La présence et/ou l'émission potentielle de polluants

Par analogie avec la fumée de cigarette conventionnelle, qui contient plus de 4 000 composés, la question de l'exposition des vapoteurs à différents composés chimiques potentiellement toxiques s'est rapidement posée. Dans la mesure où la production d'e-vapeur ne requiert aucun phénomène de combustion, les émissions de cigarette électronique sont généralement considérées comme moins nocives que la fumée de tabac. Néanmoins, il convient de vérifier si les e-liquides et les e-vapeurs ne contiennent pas de molécules ou éléments « inattendus », potentiellement toxiques, que l'on peut associer à des « polluants » ou « impuretés ».

Par exemple, l'éthylène glycol, molécule irritante dont l'exposition est susceptible de provoquer des troubles neurologiques, digestifs et rénaux [42] et dont l'utilisation dans les e-liquides est proscrite par l'AFNOR [38], a été retrouvé dans des e-liquides à des proportions pouvant atteindre 76 % [43]. Hess *et al.* (2017) ont rapporté la présence de cadmium, chrome, plomb, manganèse et nickel, dans des e-liquides de *cig-a-likes*, à des concentrations allant respectivement de 0,137 à 755, 41,5 à 16 900, 3,17 à 4 870, 11,8 à 31 500 et 13,7 à 72 700 µg/L [44]. Certaines de ces concentrations sont notablement supérieures aux valeurs cibles actuellement proposées par l'AFNOR (Tableau 1) et donc très préoccupantes. D'autres composés, comme des composés carbonylés (formaldéhyde, acétaldéhyde, etc.) ou des solvants (acétone, acétate d'éthyle, etc.) ont aussi été retrouvés par Varlet *et al.* (2015), à des concentrations oscillant de quelques dixièmes de µg/g à quelques centaines de µg/g d'e-liquide [45]. Ces différents polluants, retrouvés dans les e-liquides, peuvent ainsi passer dans les e-vapeurs au cours du vapotage et être aspirés par le consommateur.

Tableau 1. Concentrations limites en ETM dans les e-liquides selon la norme XP D90-300-2 de l'AFNOR [37]

ETM	Valeur limite AFNOR (µg/L)
As	3000
Cd	1000
Hg	1000
Pb	10000
Sb	5000

L'e-vapeur pourrait être considérée, à tort, comme étant le reflet de l'e-liquide consommé. Cependant, différents phénomènes peuvent intervenir au cours de la vaporisation et influencer sur la composition de l'e-vapeur : transformation (décomposition ou dénaturation) d'une molécule [46], relargage par des composants de l'e-cigarette [47,48] ou vaporisation non totale de certains composés [49]. En conséquence, la composition des e-vapeurs est potentiellement différente de celle de l'e-liquide et doit alors être étudiée.

Pour cela, il faut mettre en place une chaîne complète de mesure réalisant, dans l'ordre, la génération, l'acheminement, la collecte et l'analyse des e-vapeurs et des composés chimiques qu'elles contiennent. Il s'avère, d'après l'analyse de la littérature, que les différentes combinaisons de cette chaîne de mesure sont susceptibles de générer d'importantes variations dans les compositions observées des e-vapeurs.

La chaîne de mesure commence par l'e-cigarette elle-même. Comme présenté précédemment, il existe différents modèles et technologies d'e-cigarette. Des auteurs comme Uchiyama *et al.* (2013) et Gillman *et al.* (2016) ont constaté que des écarts importants de composition d'e-vapeur pouvaient être observés non seulement entre différents modèles de cigarette électronique, mais aussi entre plusieurs exemplaires d'un même modèle [50,51]. Il convient donc, aussi, d'être attentif au nombre de dispositifs utilisés, et potentiellement à leur lot de provenance.

Ensuite, il faut être capable, à partir de l'e-cigarette, de générer artificiellement une ou plusieurs bouffée(s). C'est le rôle de la machine à fumer/vapoter, qui permet de générer des bouffées de manière contrôlée et reproductible, l'objectif étant aussi d'être le plus réaliste possible. Il existe toutefois différentes machines à fumer/vapoter et différentes manières de les configurer. Un travail de revue de Tianrong Cheng (2014) rapporte justement que les paramètres de génération des e-vapeurs sont très variables d'une étude à une autre : le volume des bouffées varie de 35 à 498 mL, la durée d'aspiration varie de 1,8 à 4 s et l'intervalle entre deux bouffées varie de 8 à 60 s [52]. Des dispositifs « faits-maison » sont parfois utilisés, tels que des seringues à gaz [53], limitant cependant les expériences en termes d'automatisation et de reproductibilité.

L'acheminement des e-vapeurs vers le dispositif de collecte est souvent dépendant du dispositif de génération, donc de la machine à fumer/vapoter. Le délai

et la distance d'acheminement de l'e-vapeur devraient être, dans l'idéal, les plus courts possibles.

Les dispositifs de collecte sont spécifiques des composés recherchés et des techniques analytiques utilisés. Cependant, pour une même molécule recherchée, il peut exister plusieurs méthodes de collecte (et plusieurs méthodes de dosage). Les composés carbonylés, par exemple, ont déjà été récupérés sur des cartouches de gel de silice imprégné de 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH), par des barboteurs remplis d'une solution de DNPH ou encore sur des cartouches de charbon actif. Or, il n'existe pas suffisamment d'argument aujourd'hui pour considérer que ces différentes techniques soient équivalentes. De plus, le nombre de bouffées échantillonnées pour les analyses d'e-vapeurs, pouvant aller de 1 à 150, questionne aussi sur la représentativité de l'échantillonnage [54,55]. De manière plus anecdotique, le nombre de bouffées peut aussi conditionner l'unité de rendu du résultat et sa facilité d'interprétation. En effet, il est possible d'observer des résultats rendus en µg/bouffée, µg/10 bouffées, µg/150 bouffées, ppm/bouffée de 38 mL ou encore mg/m³ [52].

Enfin, les techniques de dosage des composés ciblés sont très variées, comme le rapporte Tianrong Cheng dans son travail de revue (Tableaux 2 et 3) [52].

Tableau 2. Méthodes analytiques développées pour la nicotine, les nitrosamines spécifiques du tabac, les métaux, les composés organiques volatiles et les phénols d'après Cheng 2014 [52]

Literature	Nicotine	TSNAs	Aldehydes	Metals	VOCs	Phenols
Cameron <i>et al</i> ¹⁵	LC/MS/MS					
Etter <i>et al</i> ¹³	UHPLC/DAD, GC/FID, GC/MS					
Goniewicz <i>et al</i> ⁴	GC/TSD					
Goniewicz <i>et al</i> ²⁰		UPLC/MS	HPLC/DAD	ICP/MS	GC/MS	
Kim and Shin ²¹		LC/MS/MS				
Kubica <i>et al</i> ¹⁴	LC/MS/MS/trap					
Lim and Shin ²⁵			HS GC/MS			
Kirschner <i>et al</i> ¹⁶	LC/TOF					
Schripp <i>et al</i> ²⁷			HPLC/UV		GC/MS	
Uryupin <i>et al</i> ³⁰	NMR					
Williams <i>et al</i> ²⁶				ICP/OES		
Cheah <i>et al</i> ¹⁷	GC/FID, GC/MS					
McAuley <i>et al</i> ¹¹	GC/NPD	GC/MS	HPLC/UV		HS GC/MS	
Ohta <i>et al</i> ²³			HPLC/UV			
Trehy <i>et al</i> ⁷	HPLC/DAD					
Uchiyama <i>et al</i> ²⁴			HPLC/UV			
Westenberger ⁹	HPLC/UV, GC/MS	LC/MS/MS				
Westenberger ¹⁰	HPLC/UV	LC/MS/MS				
Laugesen ²²		LC/MS/MS	SIFTMS	ICP/MS	SIFTMS	SIFTMS

GC/FID, gas chromatography coupled with flame ionization detector; GC/MS, gas chromatography coupled with mass spectrometry; GC/NPD, gas chromatography coupled with nitrogen-phosphorus detector; GC/TSD, gas chromatography coupled with thermionic specific detector; HPLC/DAD, high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector; HPLC/UV, high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet/visible spectroscopic detector; HS GC/MS, head space gas chromatography coupled with mass spectrometry; ICP/MS, inductively coupled plasma coupled with mass spectrometry; ICP/OES, inductively coupled plasma coupled with optical emissions spectroscopy; LC/MS/MS, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; LC/TOF, liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; SIFTMS, selected ion flow tube and mass spectrograph; Trap, ion trap; TSNAs, tobacco-specific nitrosamines; UHPLC/DAD, ultra high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector; VOCs, volatile organic compounds.

Tableau 3. Méthodes analytiques développées pour les HAP, arômes, solvants, alcaloïdes, drogues et particules d'après Cheng 2014 [52]

Literature	PAHs	Flavours	Solvents	Alkaloids	Drugs	Particles
Etter <i>et al</i> ¹³			GC/FID, MS-EI			
Schripp <i>et al</i> ²⁷						EMA
Uryupin <i>et al</i> ²⁰			ESI/MS, NMR			
Williams <i>et al</i> ²⁶						SMPS-CPC
Zhang <i>et al</i> ²¹						SMPS
Cheah <i>et al</i> ¹⁷			GC/FID, GC/MS			
Ingebretsen <i>et al</i> ²⁹						ST
McAuley <i>et al</i> ¹¹	GC/MS		GC/MS			WPS
Pellegrino <i>et al</i> ⁶		GC/MS	GC/MS			Aerocet
Trehy <i>et al</i> ⁷				HPLC/DAD		
Hadwiger <i>et al</i> ¹⁸					HPLC/DAD or MSMS	
Westenberger ⁹			NMR, GC/MS	HS GC/MS or MSMS		
Westenberger ¹⁰			GC/MS	HPLC/UV, GC/MS		
Laugesen ²²	GC/MS		SIFTMS			

Aerocet, aerosol mass analyzer; Drugs, amino-tadalafil and rimonabant; EMA, electrical mobility analyzer; ESI/MS, electro-spray ionization mass spectrometry; GC/FID, gas chromatography coupled with flame ionization detector; GC/MS, gas chromatography coupled with mass spectrometry; GC/NPD, gas chromatography coupled with nitrogen-phosphorus detector; GCTSD, gas chromatography coupled with thermionic specific detector; HPLC/DAD, high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector; HPLC/UV, high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet/visible spectroscopic detector; HS GC/MS, head space gas chromatography coupled with mass spectrometry; MS-EI, electron impact mass spectrometry; MSMS, tandem mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; SIFTMS, selected ion flow tube and mass spectrometry; SMPS, scanning mobility particle sizer; SMPS-CPC, scanning mobility particle sizer and condensation particle counter; ST, spectral transmission method; WPS, wide range particle spectrometer.

Il est, par conséquent, aisément concevable que de telles différences, notamment méthodologiques, entre les études puissent être à l'origine d'une variabilité, plus ou moins importante, de la composition chimique observée des e-vapeurs. En tenant compte de l'ensemble des biais potentiels (connus et supposés) et en attendant la publication de méthodes de référence et l'harmonisation des pratiques, il convient donc d'interpréter les valeurs publiées sur la composition chimique des e-vapeurs avec précaution.

La présence dans les e-vapeurs de composés carbonylés, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), d'autres composés organiques volatils (toluène, xylène, etc.), de nitrosamines ou d'ETM a ainsi été rapportée par plusieurs études [43,44,46,47,50,54–59]. Le plus souvent, ces composés mis en évidence dans les e-vapeurs sont à des concentrations inférieures, voire largement inférieures, à celles mesurées dans la fumée de cigarette conventionnelle (exemple des résultats de Goniewicz *et al.* (2013), Tableau 4). Toutefois, des concentrations très importantes en composés carbonylés, dépassant notamment la centaine de µg/bouffée pour le formaldéhyde, soit 100 fois la valeur cible proposée par l'AFNOR, ont déjà été observées [54,59].

Tableau 4. Comparaison des niveaux de composés toxiques entre les cigarettes conventionnelles et électroniques d'après Goniewicz et al. (2013) [55]

Toxic compound	Conventional cigarette (μg in mainstream smoke) ³⁵	Electronic cigarette (μg per 15 puffs)	Average ratio (conventional vs electronic cigarette)
Formaldehyde	1.6–52	0.20–5.61	9
Acetaldehyde	52–140	0.11–1.36	450
Acrolein	2.4–62	0.07–4.19	15
Toluene	8.3–70	0.02–0.63	120
NNN	0.005–0.19	0.00008–0.00043	380
NNK	0.012–0.11	0.00011–0.00283	40

NNK, N'-nitrosornicotine (NNN) and 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; NNN, N'-nitrosornicotine.

6. Positionnement des travaux

Dans ce contexte général de la pratique croissante du vapotage, un projet de recherche a été initié en 2014 par l'équipe d'accueil EA4483 (IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine – IMPECS, dirigée par le Dr JM Lo-Guidice), en partenariat avec la société Innova qui commercialise les cigarettes électroniques et e-liquides de la marque NHOSS®. A travers l'étude des produits de cette marque, l'objectif principal de ce projet était de participer à l'évaluation de l'impact sanitaire de la cigarette électronique au moyen d'une approche pluridisciplinaire combinant l'analyse physicochimique et la toxicologie expérimentale. Le volet physicochimique du projet s'est consacré à la caractérisation de la composition chimique des e-liquides et de leurs e-vapeurs respectives, alors que le volet expérimental a évalué la toxicité potentielle de ces mêmes e-vapeurs sur un modèle cellulaire. Ces deux parties de l'étude sont complémentaires et ont été réalisées en parallèle, avec les mêmes e-cigarettes et e-liquides. Une cigarette conventionnelle de référence a aussi été étudiée dans ces deux volets, en tant que témoin positif de génération de composés chimiques et de toxicité sur le modèle cellulaire.

Au sein de ce projet, mes travaux ont porté sur la caractérisation physicochimique des e-liquides et des e-vapeurs, notamment sur la recherche de différents polluants choisis sur la base de leur présence dans la fumée de cigarette conventionnelle et/ou de leur toxicité potentielle pour l'Homme. Pour cela, ces travaux ont mis l'accent sur la robustesse de l'analyse et l'interprétabilité des résultats. En effet, à ce jour, il n'existe toujours pas de méthode de référence pour

l'analyse des e-liquides et des e-vapeurs. Ainsi, dans la phase de développement de notre étude, mes premiers travaux ont consisté à développer et valider une méthode de dosage d'ETM dans les e-liquides par ICP-MS, cette technique étant très sujette aux effets de matrice. Dans un deuxième temps, j'ai participé à la mise en place, la réalisation, la compilation et l'interprétation des analyses physicochimiques multi-composants d'e-liquides et de leurs vapeurs respectives. Ces analyses ont permis, d'une part, de vérifier la composition des e-liquides en propylène glycol, glycérol et nicotine, au regard de la composition annoncée par le fabricant, et d'autre part, de rechercher dans ces e-liquides et leurs e-vapeurs une liste de polluants. Ces travaux ont notamment nécessité l'utilisation de techniques analytiques variées et d'une machine à fumer/vapoter acquise spécifiquement pour cette étude. Suite à cette expérience et ayant constaté que les conditions de génération des e-vapeurs tenaient un rôle majeur dans les résultats des analyses, mes travaux les plus récents se sont orientés vers l'étude de l'impact des conditions de vapotage sur la composition des e-vapeurs. Plus précisément, cette dernière étude s'est focalisée sur l'impact du profil de vapotage sur l'émission et/ou la génération des composés carbonylés.

Dans une moindre mesure, j'ai aussi participé à la partie expérimentale du projet dans laquelle des cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B) cultivées en interface air-liquide ont été exposées de manière aiguë et répétée aux e-vapeurs et à la fumée de cigarette conventionnelle. Les effets cellulaires ont été évalués par l'analyse de la cytotoxicité, des réponses au stress oxydant et inflammatoire et par l'analyse du transcriptome.

Actuellement, l'EA4483 poursuit l'étude de l'impact sanitaire de la cigarette électronique avec un nouveau projet financé par l'Institut National du Cancer dans le cadre de l'appel à projets 2016 Priorité Cancers Tabac. Ce nouveau volet du projet porte notamment sur les effets toxiques aigus et chroniques des e-vapeurs dans un modèle murin et en comparaison à ceux de la fumée de la cigarette conventionnelle.

TRAVAUX PERSONNELS

1. Produits et technologies utilisés

1.1. *Produits testés*

Dans le cadre du partenariat avec l'entreprise Innova, les travaux ont été réalisés avec des produits de même source commerciale : la marque NHOSS®.

Pour les analyses multi-composants, le choix s'est porté sur une e-cigarette de 2^{ème} génération, le modèle « Lounge » (Figure 8) et 6 e-liquides. Ont été sélectionnées les saveurs menthe chlorophylle et tabac blond, deux saveurs parmi les meilleures ventes de l'entreprise, ainsi qu'un e-liquide sans arôme en tant que « témoin arôme négatif ». Chacune de ces « saveurs » a été étudiée sans et avec 16 mg/mL de nicotine. *Nota bene* : un panel plus large d'e-liquides (54 au total) a été testé uniquement pour la recherche d'éléments traces métalliques.

La cigarette conventionnelle sélectionnée est la cigarette de référence 3R4F (Lexington KY). Elle est fabriquée dans le but d'être utilisée pour la recherche scientifique. Ainsi, elle présente deux avantages non négligeables : son mode de fabrication et sa composition sont connus [60] et une certaine masse de données scientifiques est disponible dans la littérature, pour comparaison notamment [61–65].

Ces produits ont aussi été utilisés dans la partie expérimentale *in vitro* du projet de l'EA4483, ainsi les données physicochimiques et toxicologiques ont pu être confrontées.

Pour l'étude des conditions de vapotage sur l'émission de composés carbonylés, il paraissait cohérent de poursuivre avec le même matériel. D'une part, celui-ci était déjà connu et maîtrisé, d'autre part, nous avons souhaité restreindre au minimum le nombre de facteurs potentiels de variabilité pour faciliter l'interprétation des données. Néanmoins, désirant étudier un modèle d'e-cigarette plus récent et supposant une grande disparité entre les différentes technologies, un second modèle d'e-cigarette de la marque NHOSS®, de 4^{ème} génération, a été ajouté à l'étude : le modèle « Mod Box TC » associé à un clearomiseur « Air Tank » (Figure 8).

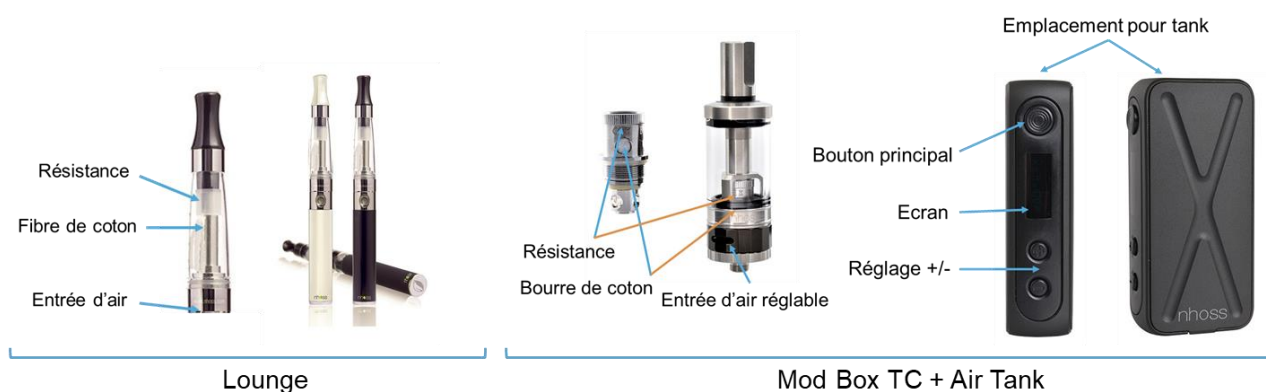


Figure 8. Modèles de cigarette électronique Lounge (2^{ème} génération) et Mod Box TC (4^{ème} génération)
D'après <https://www.nhoss.com/>

Les technologies des deux e-cigarettes utilisées sont remarquablement différentes. Les configurations utilisées au cours de nos travaux sont décrites dans le Tableau 5.

Tableau 5. Caractéristiques et paramètres des cigarettes électroniques utilisées

Paramètre	Lounge	Mod Box TC + Air tank
Type	<i>Bottom coil</i>	<i>Top coil</i>
Résistance	2,8 Ω	0,5 Ω
Puissance	4,6 W	18 et 30 W
Alimentation	Cable USB	Batterie
Déclenchement	Automatique (aspiration)	Manuel (bouton)

1.2. Machine à fumer/vapoter

Grâce au partenariat avec l'entreprise Innova, notre laboratoire a pu faire l'acquisition d'une machine à fumer/vapoter : la *Smoking Machine VC1* (Vitrocell®, Waldkirch, Allemagne) (Figure 9). Concrètement, la machine à fumer reproduit l'action d'un consommateur humain et fonctionne sur des cycles « d'aspiration » et « d'expiration ». En phase d'aspiration, une bouffée est déclenchée par un phénomène de dépression créé par le déplacement d'un piston à l'intérieur d'un cylindre (Figure 9, Point 2). L'e-vapeur, ou la fumée, ainsi générée au niveau de la buse d'aspiration (Figure 9, Point 1) est acheminée vers l'espace créé par le déplacement du piston (Figure 9, Point 2). En phase d'expiration, l'e-vapeur, ou la fumée, contenue dans le cylindre est repoussée par le piston vers la sortie de la machine à fumer (Figure 9, Point 3).

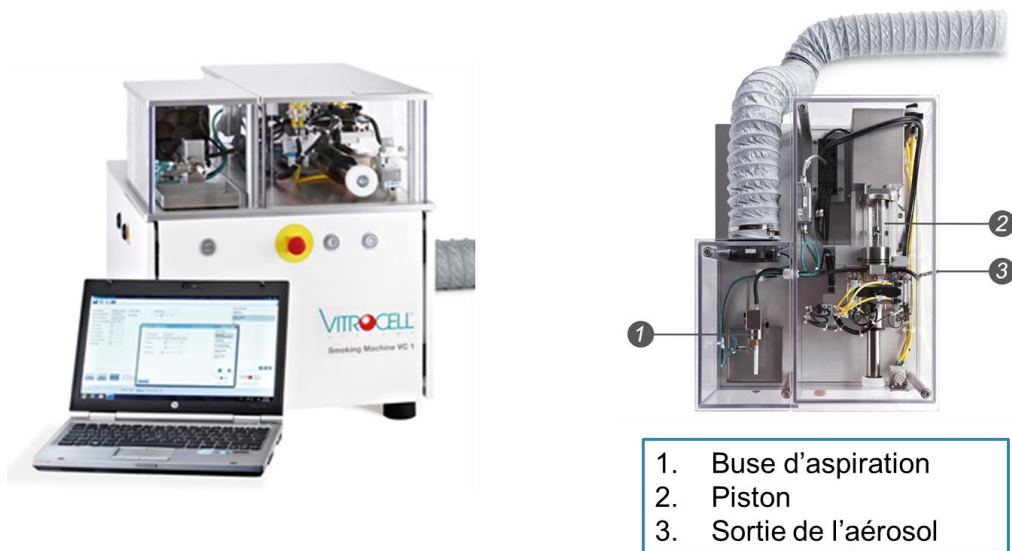


Figure 9. Smoking machine VC1
(d'après <https://www.vitrocell.com/inhalation-toxicology/smoking-machines/vc-1>)

La machine est pilotée informatiquement par un logiciel dédié qui permet notamment de paramétrer les conditions d'une série de bouffée : nombre, volume, durée et fréquence des bouffées.

2. Développement et validation d'une méthode de dosage des éléments traces métalliques par ICP-MS pour l'analyse d'e-liquides

2.1. Objectif

Devant le peu de données disponibles sur la présence potentielle d'éléments traces métalliques (ETM) dans les e-liquides et en l'absence de méthode de référence connue, l'inclusion de ces paramètres dans nos analyses parut tout à fait justifiée. En effet, une contamination ou une mauvaise qualité des e-liquides, ainsi que le relargage d'ETM par les composants des e-cigarettes, pourraient exposer les utilisateurs par l'intermédiaire des e-vapeurs.

Ne connaissant pas les gammes de concentrations en ETM qu'il était possible d'observer dans les e-liquides, ni l'intensité des effets de matrice potentiels que pouvait générer le mélange propylène glycol / glycérol sur l'analyse en ICP-MS, le but de ces travaux fut de développer et valider une méthode de dosage par ICP-MS, rapide, robuste et utilisable en routine. Les critères de validation, décrits dans l'article ci-après, ont été fixés selon les recommandations du guide technique d'accréditation SH GTA 04 du comité français d'accréditation (COFRAC) [66] et de l'*US Environmental Protection Agency* (USEPA) [67].

2.2. Les éléments traces métalliques

Ce terme générique désigne indistinctement des métaux et métalloïdes réputés toxiques et remplace de manière plus appropriée l'appellation « métaux lourds » encore couramment utilisée. En effet, alors que certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement lourds (comme le Zn), certains éléments toxiques ne sont pas des métaux (comme l'As qui est un métalloïde).

Les ETM sont des éléments minéraux naturels. Ils se retrouvent dans l'air, l'eau, les sols ou les sédiments. L'Homme y est exposé par l'intermédiaire de son environnement, de son alimentation et parfois plus spécifiquement *via* son activité professionnelle, le plus fréquemment par ingestion, inhalation ou contact cutané [68]. Plusieurs ETM exercent des fonctions biologiques chez l'Homme. Certains sont qualifiés « d'oligo-éléments essentiels » lorsqu'ils répondent à 3 critères : (1) ils sont présents dans les tissus vivants à une concentration relativement constante, (2) ils

provoquent, par leur retrait de l'organisme, des anomalies structurelles et physiologiques de façon similaire dans plusieurs espèces et (3) ils préviennent ou guérissent ces troubles par leur seule présence. Toutefois, plusieurs ETM, y compris ces oligo-éléments essentiels, peuvent présenter des effets toxiques, au-delà d'un certain seuil d'exposition ou même sans notion de seuil. En outre, les effets toxiques des ETM sont variés, dépendent de la voie d'exposition et parfois de la forme de l'élément (ou de la molécule s'il s'agit d'un dérivé) [68–70].

Dans cette étude, nous avons ciblé 15 ETM : aluminium, antimoine, arsenic, béryllium, cadmium, chrome, cobalt, cuivre, manganèse, mercure, nickel, plomb, thallium, vanadium et zinc. Parmi ces éléments, plusieurs sont notamment retrouvés dans la fumée de cigarette conventionnelle (arsenic, cadmium, cobalt, manganèse, nickel, plomb [63]) ; nickel, chrome et aluminium sont les composants des résistances chauffantes et sont donc susceptibles d'être relargués dans les vapeurs ; plusieurs éléments (ou leurs dérivés) sont toxiques à faible dose et peuvent être cancérigènes pour l'Homme selon le CIRC (Tableau 6).

Tableau 6. Classification des ETM (et dérivés) selon leur cancérogénicité d'après le CIRC

Élément (et dérivés)	Classement CIRC [71]
Aluminium (production)	1
Antimoine (trioxyde)	2B
Antimoine (sulfate d'antimoine (III))	3
Arsenic (et composés inorganiques)	1
Béryllium (et composés)	1
Cadmium (et composés)	1
Chrome métallique	3
Composés chrome (III)	3
Composés chrome (VI)	1
Cobalt (et composés)	2B
Cuivre	Non disponible
Manganèse	Non disponible
Mercure (et composés inorganiques)	3
Composés de méthylmercure	2B
Nickel (métal et alliages)	2B
Nickel (composés évalués en groupe)	1
Plomb (composés inorganiques)	2A
Plomb (dérivés organiques)	3
Thallium	Non disponible
Vanadium (oxide de vanadium (IV))	2B
Zinc	Non disponible

Nomenclature : 1 = cancérogène avéré pour l'Homme ; 2A = probablement cancérogène pour l'Homme ; 2B = peut-être cancérogène pour l'Homme ; 3 = inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme ; 4 = probablement pas cancérogène pour l'Homme

2.3. L'analyse par ICP-MS

L'ICP-MS est aujourd'hui une technique de choix pour le dosage des ETM. Par rapport aux autres techniques d'analyse élémentaire qui incluent la spectrométrie d'absorption atomique en flamme (FAAS) ou en four graphite (GFAAS) et la spectrométrie d'émission atomique couplée à une torche à plasma (ICP-AES), l'ICP-MS dispose à la fois d'un large spectre d'éléments détectables, d'une bonne sensibilité et de la capacité de réaliser une analyse simultanée multi-élémentaire [72]. A côté de ces avantages, l'analyse par ICP-MS présente toutefois quelques contraintes. En effet, la manipulation d'échantillons à très faibles concentrations nécessite l'utilisation de réactifs de haute pureté et un contrôle optimal des risques

de contamination. Aussi, la présence d'interférences isobariques ou polyatomiques, ainsi que la forte sensibilité de l'analyse à des effets de matrice, demandent une attention particulière et des adaptations méthodologiques.

L'effet de matrice fut l'une des difficultés majeures rencontrées au cours de ce développement. Lors de son passage à travers le plasma, l'échantillon, sous forme d'aérosol, est séché, décomposé, dissocié, atomisé et ionisé avec si possible 100 % de conversion en ions monochargés (Figure 10). L'effet de matrice affecte ce processus et déplace l'équilibre ion/atome de l'analyte, faussant potentiellement la quantification de celui-ci [73]. Il convient alors de vérifier, pour toute nouvelle matrice, son impact sur la quantification de chaque analyte.

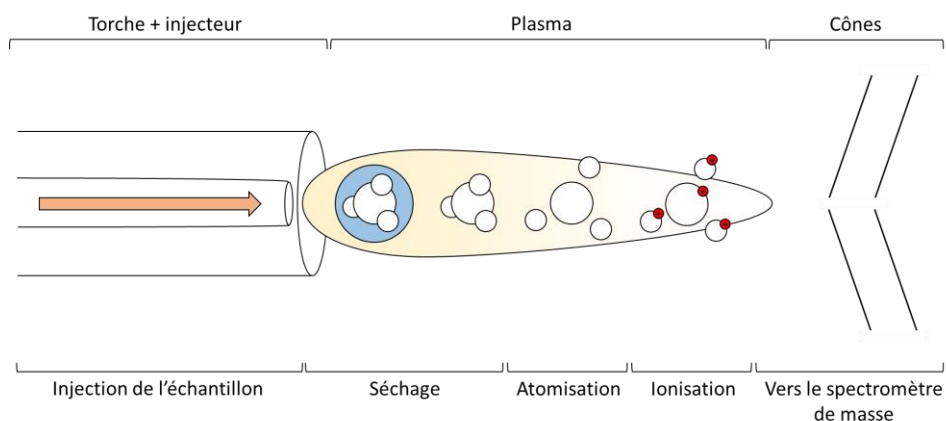


Figure 10. Schéma du processus d'ionisation de l'échantillon dans le plasma

Les premiers tests ont évalué la possibilité d'utiliser une calibration sans matrice, plus rapide et plus simple à mettre en œuvre.

Pour cela, l'effet de la matrice sur le signal des ETM a été testé à plusieurs dilutions en solution aqueuse : 1/5^{ème}, 1/10^{ème} et 1/20^{ème}. Il s'avère, tout d'abord, que la présence de matrice affecte l'intensité du signal des étalons internes (EI) utilisés dans cette méthode (Rh^{103} , Sc^{45} et Y^{89}), en fonction de sa proportion dans le mélange et du débit de gaz de collision (Tableau 7). D'autre part, l'utilisation seule des EI ne permet pas de corriger de manière efficace l'effet de la matrice e-liquide sur l'analyse des ETM d'intérêt (ANNEXE 2).

Tableau 7. Effet de la matrice e-liquide sur le signal des étalons internes par analyse ICP-MS

Dilution de la matrice	Signal dans matrice diluée / Signal dans diluant sans matrice (%)								
	Sans gaz de collision			75 mL/min (He)			130 mL/min (He)		
	Sc ⁴⁵	Y ⁸⁹	Rh ¹⁰³	Sc ⁴⁵	Y ⁸⁹	Rh ¹⁰³	Sc ⁴⁵	Y ⁸⁹	Rh ¹⁰³
1/5 ^{ème}	146	63	66	38	38	43	21	27	37
1/10 ^{ème}	205	108	106	67	64	67	41	47	61
1/20 ^{ème}	190	117	114	87	80	81	65	64	80

En conséquence, la calibration sans matrice a été abandonnée. Il a été décidé de combiner l'analyse par ajouts dosés à l'analyse par calibration externe. Pour cela, une calibration externe a été réalisée en présence de matrice, en même proportion que dans les échantillons. La proportion de matrice dans la gamme de calibration et les échantillons a été fixée à 5 %, compromis acceptable entre la limitation des effets de la matrice sur la stabilité du signal et l'objectif d'obtenir des limites de quantification satisfaisantes.

2.4. Limite de la méthode

Bien qu'ayant démontré un certain nombre de critères de robustesse, cette méthode n'est potentiellement pas applicable directement à tous les e-liquides existants. Il est notamment probable que l'effet matrice généré par des e-liquides contenant des proportions différentes de propylène glycol et de glycérol, voire uniquement l'un des deux composés, soit significativement différent de celui mis en évidence dans cette étude. L'application directe de la méthode développée ici pour des e-liquides de composition autre nécessiterait alors la réalisation préalable de plusieurs tests incluant la comparaison de l'influence des différentes matrices et la vérification des paramètres critiques de robustesse tels que les limites de quantification, la répétabilité et la justesse. La méthodologie développée reste néanmoins applicable et transposable à d'autres e-liquides et à d'autres laboratoires, le message principal étant de souligner l'importance de vérifier la robustesse de la méthode.

2.5. Analyse des e-liquides

Cinquante-quatre e-liquides (correspondant aux 26 saveurs de la gamme d'Innova, ainsi qu'à l'e-liquide sans arôme, chacun sans et avec 16 mg/mL de nicotine) ont été analysés.

Les concentrations mesurées en ETM de ces e-liquides sont relativement faibles et homogènes. Seul l'e-liquide saveur cerise présentait des concentrations notablement plus élevées que le reste de la gamme en Sb et en Zn (jusqu'à 214 et 510 µg/L, respectivement). Des concentrations comparables à celles observées dans cette étude ont été rapportées par Palazollo *et al.* (2016) et Saffari *et al.* (2014) (Tableau 8). Pour le moment, seule l'AFNOR a proposé des valeurs limites acceptables de concentration de quelques ETM (*cf.* article). Les concentrations mesurées dans cette étude sont largement inférieures aux recommandations de l'AFNOR et suggèrent un faible risque d'exposition aux ETM par les e-liquides. Toutefois, l'exemple de l'e-liquide saveur cerise suggère qu'une contamination de l'e-liquide en ETM par l'arôme ne peut être exclue, ce qui doit être confirmé par une analyse plus large d'autres e-liquides, d'autres marques.

Tableau 8. Concentrations en ETM (en µg/L) d'e-liquides rapportées dans la littérature

Référence	Présente étude [74]	Saffari <i>et al.</i> [57]	Palazollo <i>et al.</i> [75]	Hess <i>et al.</i> [44]
E-liquide	54 e-liquides	1 e-liquide	1 e-liquide saveur tabac	10 e-liquides dans cartomiseur
Al	8,82 – 12,9	10,2	7,7	-
As	< 1 – 3,42	-	0,08	-
Be	< 0,1	-	-	-
Cd	< 0,4	0,08	< 0,01	0,137 – 755
Co	< 0,1 – 0,88	0,09	-	-
Cr	4,08 – 11,5	2,37	-	41,5 – 16900
Cu	< 20 – 30,6	0,54	< 0,01	-
Hg	< 4 – 4,5	-	-	-
Mn	< 1,6 – 8,4	1,84	0,159	11,8 – 31500
Ni	< 16	-	0,161	13,7 – 72700
Pb	< 1	0,16	< 0,01	3,17 – 4870
Sb	0,40 – 214	1,02	-	-
Tl	< 0,1	-	-	-
V	< 0,4	1,61	-	-
Zn	< 200	2,88	0,51	-
Autres éléments	-	Ag, B, Ca, Fe, K, La, Mg, Mo, Rb, S, Sn, Ti, W	Fe	-

" - " : non réalisé

Alors que les observations précédentes s'appliquent pour des e-liquides vendus en flacon, Hess *et al.* (2017) ont rapporté des concentrations en Cd, Cr, Mn, Ni et Pb très variables et parfois très élevées dans des e-liquides issus de cartomiseurs pré-remplis (Tableau 8) [44]. Certaines e-cigarettes ne sont pas rechargeables en e-liquide, notamment les produits de 1^{ère} génération, et utilisent comme consommables des cartomiseurs pré-remplis. Comme l'avancent les auteurs, l'origine de ces ETM pourrait être un défaut de qualité des ingrédients utilisés ou la conséquence du contact prolongé de l'e-liquide avec les composants du cartomiseur. A titre d'exemple, les résistances chauffantes sont majoritairement fabriquées en alliage chrome/nickel ou fer/chrome/aluminium. Williams *et al.* (2013) ont par ailleurs montré la présence de plusieurs métaux dans différents composants d'une e-cigarette [47]. Les résultats de Hess *et al.* (2017) suggèrent un risque potentiellement plus important d'exposition aux ETM des consommateurs utilisant des cartomiseurs pré-remplis et méritent d'être confirmés par d'autres études. En supposant un relargage d'ETM par des composants en contact avec l'e-liquide (cartomiseur ou flacon plastique par exemple), il serait aussi intéressant d'étudier l'effet de la durée de conservation des e-liquides sur leur composition. Dans nos travaux, ne connaissant pas la date exacte de fabrication et de conditionnement des e-liquides, nous avons systématiquement utilisé des flacons non ouverts précédemment et ayant une date de péremption éloignée (plus de 6 mois).

2.6. Vers l'analyse des e-vapeurs

La concentration en ETM des e-liquides est un premier élément de discussion pour l'évaluation de l'exposition potentielle des consommateurs. Dans l'idéal, ces concentrations devraient être les plus faibles possibles. Cependant, le relargage d'ETM par les composants des cigarettes électroniques au cours du vapotage étant fortement soupçonné, l'évaluation de l'exposition potentielle du vapoteur à des ETM nécessite de mesurer leurs concentrations dans les e-vapeurs. De plus, la comparaison des concentrations des ETM dans les e-liquides et leurs e-vapeurs correspondantes permettrait d'évaluer les phénomènes de relargage potentiels par les composants de l'e-cigarette utilisée et, ainsi, d'envisager à terme des recommandations ou réglementations concernant les composants utilisables pour la fabrication des cigarettes électroniques. L'analyse élémentaire des e-vapeurs d'un

certain nombre d'e-liquides a donc été réalisée par la suite et les résultats de ces analyses sont présentés et discutés dans la partie suivante.

2.7. Article #1

Publié dans *Regulatory Toxicology and Pharmacology* :

Beauval N, Howsam M, Anthérieu S, Allorge D, Soyez M, Garçon G, Goossens JF, Lo-Guidice JM, Garat A. Trace elements in e-liquids-Development and validation of an ICP-MS method for the analysis of electronic cigarette refills. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2016 Aug 1;79:144-8.

Trace elements in e-liquids - Development and validation of an ICP-MS method for the analysis of electronic cigarette refills

Beauval N¹, Howsam M², Antherieu S¹, Allorge D¹, Soyez M¹, Garçon G¹, Goossens JF², Lo-Guidice JM¹, Garat A¹

¹ Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA 4483 - IMPECS - IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France

² Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses, Université de Lille 2, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, 59006 Lille, France

Abstract

Electronic cigarette use has rapidly increased in recent years. In assessing their safety, and in view of coming regulations, trace elements (TE) are among the potentially toxic compounds required to be evaluated in electronic cigarette refill fluids (“e-liquids”). An analytical method using inductively coupled plasma with mass spectrometric detection (ICP-MS) was developed and rigorously validated in order to determine concentrations of 15 TE in 54 e-liquids from a French brand. Despite a significant matrix effect from the main e-liquid constituents, and difficulties related to the current lack of reference materials, our method demonstrated satisfactory linearity, precision and robustness, and permitted the quantification of low concentrations of these 15 elements: lower limits of quantification (LLQ) obtained were ≤ 4 ppb for all elements except for Ni, Cu and Zn (16 ppb, 20 ppb and 200 ppb, respectively). All TE concentrations in all tested samples were < 510 ppb, mostly near or below the LLQs. This method is transposable and is timely for laboratories seeking to meet a prospective demand in light of current or future regulations.

Keywords

Electronic cigarettes, E-liquids, trace elements, ICP-MS, method validation

Highlights

- E-liquid matrix leads to significant matrix effects with ICP-MS technique
- A rigorous validation of the method is required to quantify trace elements in e-liquids
- The developed method is transposable and demonstrated good robustness
- Low concentrations (< 510 ppb) of selected trace elements were found in the tested e-liquids

Introduction

According to the World Health Organization, tobacco use is the leading cause of preventable death and is currently responsible for about six million deaths per year worldwide (World Health Organization report, 2012). Recently, the use of electronic cigarettes (“e-cigarettes”), presented as a less harmful alternative to tobacco, has considerably increased. In 2014, 466 brands and 7764 flavors of electronic cigarette refill fluids (“e-liquids”) were available on English websites (Zhu et al., 2014), while global sales were valued at \$7 billion and forecasted to reach \$51 billion by 2030 (Evans, 2015). Questions nevertheless remain as to their potential impact on human health, and scientific opinion is divided as to both the short- and long-term effects of using these devices (Born et al., 2015; Rom et al., 2015).

The current regulatory status of e-cigarettes and e-liquids varies by country (Dautzenberg et al., 2013; World Health Organization report, 2014). At the European level, Directive 2014/40/EU on tobacco products will class e-cigarettes as tobacco related products (European Commission, 2014) and will fix manufacture, presentation and sales provisions. In an attempt to integrate these factors, the French National Organization for Standardization (AFNOR) recently published the first quality and safety standards in the world for e-cigarettes and e-liquids (XP D90-300-1 and XP D90-300-2, respectively), though they remain “experimental” and “voluntary”.

The limited data available in the scientific literature on e-cigarettes falls into two broad categories: 1) *in vivo* or *in vitro* studies with animal or cellular models to examine effects of exposure to e-liquid vapors (Cervellati et al., 2014; Sussan et al.,

2015), or 2) characterization studies focused on determining the constituents of the e-liquids themselves or of their vapors (Cheng, 2014). As part of a larger study to explore both these avenues and in view of the paucity of published data on trace element (TE) content of e-liquids, as well as the recent publication of the AFNOR guidelines, we developed and validated an analytical method to quantify a range of TEs in e-liquids.

The e-liquid matrix consists almost entirely of organic solvents, propylene glycol (propane-1,2-diol) and vegetal glycerin (propane-1,2,3-triol), and is of type rarely studied by inductively coupled plasma (ICP) techniques for TE analysis. This matrix leads to strong signal modifications and, in addition, no “metal-free” matrix for use as a calibration blank in TE analyses is currently available. Given these considerations, any method will necessarily have limitations which is why we embarked on a rigorous validation of our method. The methodology and results of ICP with mass spectrometric (MS) detection analysis of a range of e-liquids from a French brand are presented here.

Material and methods

a. Reagents and solutions

Standard 1 g/L solutions of aluminum (Al), antimony (Sb), arsenic (As), cadmium (Cd), cobalt (Co), copper (Cu), gold (Au), lead (Pb), mercury (Hg), manganese (Mn), nickel (Ni), rhodium (Rh), thallium (Tl), vanadium (V) and zinc (Zn) were purchased from Merck Millipore (Billerica, MA), beryllium (Be) and chromium (Cr) 1 g/L solutions from VWR International (Radnor, PA), and scandium (Sc) and yttrium (Y) 1 g/L solutions from SCP Sciences (Baie-D'Urfé, Quebec, Canada).

E-liquids from the French NHOSS[®] brand (Innova, Bondues, France) were obtained in 20 mL plastic bottles as sold commercially. Their composition, as provided by the manufacturer, was: propylene glycol (< 65%), vegetal glycerin (< 35%), flavorings and, depending on the product, 0 or 16 g/L of nicotine. E-liquids without flavoring (not normally for sale) were packaged by the manufacturer in the same bottles for the experiments. All bottles were opened on the day of the analyses. A 1 L bottle of the base e-liquid solution without either nicotine or flavoring was used for the method development and for all standard preparations.

Standards and samples were diluted with 1 % (v/v) nitric acid (ultrapure quality 60%, Merck, Darmstadt, Germany) solution in ultrapure water (Milli-Q Integral-5, Merck Millipore) containing 0.1 % (v/v) triton® and 50 µg/L gold.

b. Instrumentation

Assays were performed on an Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer (ICP-MS) VARIAN 820-MS with SPS3 autosampler (Bruker, Billerica, MA), MicroMist U-Series 0.4 mL/min nebulizer and a quartz torch (Glass expansion, Pocasset, MA). Instrument parameters were manually optimized with matrix solutions (dilutions of e-liquid without either nicotine or flavoring). A unique method was created in order to assess all selected TEs in the same run, using 0, 75 or 130 mL/min helium flow in the collision reaction interface (CRI) at the skimmer cone with suitable stabilization delays (60 s) between these condition sets. Standard parameters of power, sampling depth and argon flow rates were applied (RF power 1.40 kW, sampling depth 7.0 mm, plasma flow 16.5 L/min, auxiliary flow 1.65 L/min, sheath gas 0.20 L/min, nebulizer flow 1.05 L/min).

c. Protocol of validation

The validation of the method was based on the internal procedures of the Biological and Pathological Center of the University Hospital of Lille (CHRU de Lille) which meets the recommendations of the French Committee of Accreditation (COFRAC) ref. SH GTA 04 (Comité français d'accréditation, 2015).

Results

The main results of the validation of the method are summarized in table 1.

a. Matrix effect

Preliminary tests highlighted a significant matrix effect on the signal of internal standards, increasing or decreasing intensities depending on the element and the instrument parameters (CRI gas flow). Moreover, calibration curve slopes for

individual elements were greatly affected by the presence of the matrix compared with those obtained in aqueous dilutions, with slope coefficients as much as 5-fold higher or lower depending on the element (data not shown). Calibration was thus performed in the presence of matrix. Since no “metal-free” matrix (propylene glycol / vegetal glycerin) was available, we chose to work with the base mixture used by NHOSS®. In order to limit matrix effects and still be able to quantify the expected trace amounts of TEs, the samples were diluted 20 times so that standard and sample solutions both contained 5 % of e-liquid matrix (*ie.* 250 µL of e-liquid in 5 mL total volume). Before each run, the instrument was conditioned with 5 matrix / diluent samples at the above dilutions.

b. Linearity and working range

The linearity of the responses was judged acceptable on obtaining a coefficient of determination (R^2) > 0.99 on the average *ratio* of element to internal standard (Sc, Y or Rh) intensities from 5 replicate analyses carried out under repeatability conditions. A maximum of 10 standard levels were used to construct calibration curves. Working calibration ranges were determined by the relative standard deviation (RSD) of the 5 replicates being < 20 %; internal standards did not induce noteworthy variability. The linearity was validated across the 10 levels covering the working calibration ranges given in table 1 for all elements except Al, for which the 3 highest concentrations (10, 16 and 30 ppb) led to detector saturation.

c. Limits of detection and quantification

As there was no real calibration blank, we chose to work with standard addition calibrations. Thus, determination of limits of detection along classical lines was less appropriate and determination of lower limits of quantification (LLQ) was deemed more rigorous. The LLQ was determined as the lowest calibration concentration with both RSD and deviation from true value (accuracy) lower than |20 %| from 6 replicate analyses carried out under repeatability conditions. The internal standard leading to the best LLQ results was determined for each element (table 1).

d. Repeatability and intermediate precision

No certified reference material was available for e-liquid, so both repeatability and intermediate precision were determined using 6 replicates of 2 calibration concentration levels (one low, one high), and validated for RSD and accuracy < |20 %| as above. Concentration levels, 3, 5, 7 and 9, were used depending on respective LLQs. Intermediate precision was investigated by the same analyst on 6 different days and led to RSDs in the ranges 4 to 14 % and 2 to 12 %, and to accuracy in the ranges -9 to 11 % and -1 to 4 %, for low and high levels respectively. In the longer term, intermediate precision will be monitored during daily analyses.

e. Inter-samples contamination

Inter-sample contamination (“memory effect”) was determined by dosing, after suitable rinses, 3 high concentrations (H1, H2 and H3 whose average is H) followed by 3 low concentrations (L1, L2 and L3). Contamination was equal to $\frac{L1-L3}{H-L3}$. Contamination levels thus measured were found to be < 0.5 % for all TEs, except Hg (2 %).

f. E-liquid assays

Twenty-seven different e-liquids, both with nicotine (16 g/L) and without nicotine, were analyzed using the method described (table 2). Calibration standard levels 3, 5, 7 and 9 (depending on the element) were used daily as quality controls, along the lines of the low level continuing calibration verification and quantification checks stipulated by the US Environmental Protection Agency (USEPA) (US Environmental Protection Agency, 2007), with 30 % deviation from the mean for the lower level and 10 % deviation from the mean for the higher level imposed as acceptable limits of variation. Eleven measures of these calibration verification samples were thus made over 6 days of analyses, and all were satisfactory with the exception of: two low level measures for Al (both + 40 %), several high level measures for Cr (all < 15 % from the mean), and two high level measures for Hg (both < 25 % from the mean).

Two tested samples, both containing cherry flavoring and without and with nicotine, contained significant higher levels of Sb (214 and 99.3 ppb, respectively) and Zn (325 and 510 ppb, respectively), but most of the e-liquids contained very small amounts of TEs and all of them were much lower, by several orders of magnitude, than the current AFNOR limits (As < 3 ppm, Cd < 1 ppm, Hg < 1 ppm, Pb < 10 ppm, Sb < 5 ppm (Association française de normalisation, 2015)). Concentrations of all TEs in all tested e-liquids are presented in the supplementary material.

A selection of nine e-liquids, chosen at random but including those with high concentrations of Sb, were analyzed a second time. For the quantified values, deviation from the mean of the two measured concentrations was < 20 % in all samples for all elements except in one sample for Co and Cr: - 21 % and + 23 %, respectively (data not shown).

Discussion

Our principal objective was to quantify several TEs in e-liquids which have few known “usual” concentration ranges and very few regulatory limits in force. The COFRAC or ICH or USEPA guidelines give a good base to establish robust analytical assays. However, in the case of an analytical method requiring a calibration blank containing the sample matrix, with a significant matrix effect, and lacking any available certified reference material, our focus was necessarily upon a rigorous validation of the method.

Initially, 3 dilution levels of the e-liquid matrix (5, 10 and 20 times) were compared in order to observe and characterize the matrix effect. The signal was indeed significantly affected by the matrix in an element-dependent manner, and at all tested dilution levels, compared to analyses of aqueous solutions, with calibration slopes differing by up to a factor of 5 between aqueous solutions and e-liquid containing solutions. It was thus deemed appropriate to perform calibrations in the presence of the matrix, but since relatively few injections of 5- and 10- fold dilutions impaired the signal stability, we decided to work with 20-fold dilutions. In order to maximize our chances of quantifying the expected low concentrations of TEs observed in our initial screening of samples (data not shown), more dilute solutions were not tested for routine use.

Using standard addition curves in an external calibration, the signal of the diluent is automatically accounted for when calculating sample concentrations. We established a background level for the method by averaging 20 replicates of the laboratory blank (diluent). Estimated concentrations of several elements in the laboratory blank were below but close to the method LLQ. These background measurements were < 10 ppb for all elements (ca. 1 % of the lowest limit among current AFNOR recommendations for TEs in e-liquids of 1 ppm), except Cu (12 ppb) and Zn (69 ppb), and hence less than 10 % of the current regulatory limits and considered acceptable according to USEPA guidelines (US Environmental Protection Agency, 2007). Since we cannot remove this background, we decided to take it into account, though it is sometimes possible to subtract a background averaged over several days from the sample results. While both approaches have advantages and disadvantages, the second could be useful if regulatory limits lower than those currently in force are ever introduced.

After a preliminary screening, suggesting very low concentrations in the e-liquids, we chose large working calibration ranges at concentrations many times lower than current regulatory limits. As e-liquid composition and quality may vary greatly between the different products on the market (Bertholon et al., 2013), TE concentrations might also be expected to vary and could be higher than our upper limit of linearity. Thus, working calibration ranges should be adapted to the samples to be analyzed and the regulatory context.

With such low concentrations in samples and such large working ranges for calibrations, slight variations in calibration curve slopes could have a relatively large impact on results, especially intermediate precision. While coefficients of determination of calibration curves were > 0.99 in all cases during the validation of the method, several slopes were slightly different (but significantly so: $p < 0.05$, Student t-test, data not shown) with or without inclusion of the 3 last points (additions 8, 9 and 10). Therefore, curves were constructed with 7 or 10 calibration levels depending on targeted concentrations.

Some elements, especially Cr and, to a lesser extent, V, were almost certainly interfered by the high amounts of carbon in the matrix, even when a high flow rate of CRI gas was employed. The application of correction equations for Cr or V did not clearly improve results and sometimes impaired calibration, so no correction equation was used in our method. In the absence of a suitable certified reference material for

these elements in e-liquid, it is difficult to confirm or discount the results for Cr or V obtained here. However, variability is likely less important among e-liquids compared to biological matrices, so interferences should be comparable within, or perhaps even between, brands. Nevertheless, our results for those elements known to suffer from polyatomic interferences related to carbon should be viewed with caution. Chromium is a component of nichrome wires used in many e-cigarette devices and has been reported in e-liquid vapors (Williams et al., 2015). Its accurate quantification is necessary to investigate a potential contamination of e-cigarette emissions and the exposure of users. Other collision/reaction cell configurations or high resolution ICP-MS may minimize the impact of interferences on quantification of Cr and offer more reliable results compared with the instrument used in the present work.

The LLQs were determined based on COFRAC recommendations. Satisfactory LLQs were obtained (≤ 4 ppb for all elements except for Ni, Cu and Zn with LLQs of 16 ppb, 20 ppb and 200 ppb, respectively), and were many times below the current AFNOR regulatory limits (*ie.* 1 ppm for the lowest allowable concentration). Very small amounts of TEs were found in the e-liquids we tested (< 200 ppb for Zn and < 20 ppb for all other elements in 49 of the 54 samples), mostly below or close to the LLQs, and in any case well below the current AFNOR limits. TE concentrations of the same order of magnitude have been reported in other e-liquids (Saffari et al., 2014). A few samples contained relatively higher amounts of one or two elements (up to 30.7 ppb of Al, 30.6 ppb of Cu, 214 ppb of Sb and 510 ppb of Zn), though still well below the AFNOR limits. Significant higher amounts of Sb (214 and 99.3 ppb) and Zn (325 and 510 ppb) were found in only 2 samples, e-liquids containing cherry flavoring without and with nicotine respectively, suggesting that flavor components are a potential source of TE contamination. However, this hypothesis remains to be confirmed by analyzing other e-liquid products. The presence of nicotine did not induce a measurable difference in TE content for the elements studied here.

Quality control assays were largely within acceptable limits of concentrations for all elements (< 30 % from the mean for lower level, < 10 % from the mean for higher level checks). Even if some controls were occasionally (though only slightly) outside of acceptable limits for some elements, quantifiable concentrations in samples measured for a second time on a different day were very close to the first measurements (< 23 % from the mean of the two values). The Sb concentrations

measured in two samples containing the cherry flavoring were initially outside of the calibration range (214 and 99.3 ppb); subsequent analysis of a 40 times dilution of the same samples led to comparable concentrations (respectively 238 and 111 ppb), while use of an extended calibration curve to quantify 20-fold dilutions of these samples gave values slightly closer to the original results (respectively 200 and 102 ppb – these repeat analyses were performed on a different day). Moreover, while inter-sample contamination values suggested the possibility of a very slight memory effect for a few elements (*ie.* 2 % for Hg), in practice 3 to 5 rinses after the highest calibration points led to good control levels, and the analysis of the 5 main runs of each measurement revealed no contamination problem. Taken together, these results indicate that, despite its limitations, this multi-elemental ICP-MS method demonstrated good robustness and could be used routinely.

To go further, it would be interesting to analyze other e-liquids from other brands in order to confirm or improve the method robustness, but also to better quantify the TE concentration ranges in e-liquids on the market. The method could also evolve in line with the scientific or regulatory context by adding other TEs such as iron (Fe) or tin (Sn), which has been reported in e-liquid vapors (Williams et al., 2015), both of which could reflect degradation of the device. Finally, a comparison of TE concentrations in e-liquids with those found in their vapors would more completely evaluate potential consumer exposure, as well as any release of TEs from the heating mechanism, and is currently under investigation in our laboratory.

Conclusion

We developed and validated an analytical method using ICP-MS to quantify concentrations of 15 TEs in electronic cigarette refill fluids (“e-liquids”). With e-liquids producing a significant matrix effect and no certified reference material available, we performed a rigorous validation of the method informed by the COFRAC and USEPA method guidelines which demonstrated satisfactory linearity, precision, limits of quantification and robustness. A range of 27 different e-liquids from a single manufacturer, both with nicotine (16 g/L) or without nicotine and containing different flavorings (or not), was thus analyzed and found to contain very small amounts of some of these 15 elements (< 10 ppb or < LLQ for all elements except for Al, Cr, Cu, Sb and Zn, whose maximal concentrations were 30.7 ppb, 11.5 ppb, 30.6 ppb, 214

ppb and 510 ppb, respectively). All quantifiable concentrations were many times lower than the current AFNOR limits for TE contents of e-liquids in France, which are the first regulations of their kind to be published. This method is transposable in so far as an e-liquid “matrix” (containing only the main constituents) is available, and is timely for laboratories seeking to meet a prospective demand in light of current or future regulations.

Funding

Analytical fees were jointly covered by Université de Lille 2 and INNOVA SARL that market the NHOSS® electronic cigarette brand: the authors themselves received no financial or other consideration from the electronic cigarette or tobacco industry.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest. While the study was partially funded by INNOVA, the company had no influence over the study design; data collection, analysis or interpretation; manuscript preparation or the decision to submit this work for publication.

References

- Association française de normalisation, 2015. Norme XP D90-300-2 - Cigarettes électroniques et e-liquides - Partie 2: exigences et méthodes d'essai relatives aux e-liquides.
- Bertholon, J.F., Becquemin, M.H., Annesi-Maesano, I., Dautzenberg, B., 2013. Electronic cigarettes: a short review. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 86, 433–438. doi:10.1159/000353253
- Born, H., Persky, M., Kraus, D.H., Peng, R., Amin, M.R., Branski, R.C., 2015. Electronic Cigarettes: A Primer for Clinicians. *Otolaryngol.--Head Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol.-Head Neck Surg.* 153, 5–14. doi:10.1177/0194599815585752
- Cervellati, F., Muresan, X.M., Sticozzi, C., Gambari, R., Montagner, G., Forman, H.J., Torricelli, C., Maioli, E., Valacchi, G., 2014. Comparative effects between electronic and cigarette smoke in human keratinocytes and epithelial lung cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 28, 999–1005. doi:10.1016/j.tiv.2014.04.012

- Cheng, T., 2014. Chemical evaluation of electronic cigarettes. *Tob. Control* 23, ii11–ii17. doi:10.1136/tobaccocontrol-2013-051482
- Comité français d'accréditation, 2015. Document SH GTA 04 - rev 01 - Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale.
- Dautzenberg, B., Delrieu, A., Deutsch, A., Le Maître, B., Mathern, G., Radu-Loghin, C., Schmitt, A.-A., Thomas, D., Underner, M., 2013. Rapport et avis d'experts sur l'e-cigarette.
- European Commission, 2014. Directive 2014/40/EU of the European Parliament and of the Council of 3 April 2014 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States concerning the manufacture, presentation and sale of tobacco and related products and repealing Directive 2001/37/EC. *J Eur Union L* 127/1.
- Evans, P., 2015. E-Cigarette Makers Face Rise of Fakes. *Wall Str. J.*
- Rom, O., Pecorelli, A., Valacchi, G., Reznick, A.Z., 2015. Are E-cigarettes a safe and good alternative to cigarette smoking? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1340, 65–74. doi:10.1111/nyas.12609
- Saffari, A., Daher, N., Ruprecht, A., De Marco, C., Pozzi, P., Boffi, R., Hamad, S.H., Shafer, M.M., Schauer, J.J., Westerdahl, D., Sioutas, C., 2014. Particulate metals and organic compounds from electronic and tobacco-containing cigarettes: comparison of emission rates and secondhand exposure. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16, 2259–2267. doi:10.1039/c4em00415a
- Sussan, T.E., Gajghate, S., Thimmulappa, R.K., Ma, J., Kim, J.-H., Sudini, K., Consolini, N., Cormier, S.A., Lomnicki, S., Hasan, F., Pekosz, A., Biswal, S., 2015. Exposure to electronic cigarettes impairs pulmonary anti-bacterial and anti-viral defenses in a mouse model. *PLoS One* 10, e0116861. doi:10.1371/journal.pone.0116861
- US Environmental Protection Agency, 2007. Method 6020A for Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry.
- Williams, M., To, A., Bozhilov, K., Talbot, P., 2015. Strategies to Reduce Tin and Other Metals in Electronic Cigarette Aerosol. *PLoS ONE* 10. doi:10.1371/journal.pone.0138933
- World Health Organization report, 2014. Electronic nicotine delivery systems.
- World Health Organization report, 2012. Mortality Attributable to Tobacco.
- Zhu, S.-H., Sun, J.Y., Bonnevie, E., Cummins, S.E., Gamst, A., Yin, L., Lee, M., 2014. Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tob. Control* 23 Suppl 3, iii3–9. doi:10.1136/tobaccocontrol-2014-051670

Table 1. Method parameters of TE analysis in 20 fold dilutions of e-liquids by ICP-MS.

Element/ Isotope	CRI (mL/min)	Working calibrating range (ppb)	Internal standard	Instrument LLQ (ppb) ¹	Method LLQ (ppb) ²	Contamination (%)	Background (ppb) ³
Al27	0	0.02 – 30	Sc45	0.2	4	0.43	3.83
As75	75	0.02 – 30	Sc45	0.05	1	0.26	0.0740
Be9	0	0.002 – 3	Sc45	0.005	0.1	0.38	0.0350
Cd114	0	0.002 – 3	Y89	0.02	0.4	0.25	0.0657
Co59	75	0.002 – 3	Rh103	0.005	0.1	0.25	0.0943
Cr53	130	0.001 – 1.392	Rh103	0.186	3.72	0.27	1.16
Cu65	130	0.4 – 600	Sc45	1	20	0.17	12.4
Hg202	0	0.02 – 30	Sc45	0.2	4	2.01	1.65
Mn55	130	0.002 – 3	Sc45	0.08	1.6	0 ⁴	0.295
Ni60	130	0.02 – 30	Sc45	0.8	16	0.03	1.98
Pb208	0	0.02 – 30	Sc45	0.05	1	0.17	0.437
Sb121	0	0.002 – 3	Sc45	0.005	0.1	0.36	0.0680
Tl205	0	0.002 – 3	Sc45	0.005	0.1	0.39	0.0220
V51	130	0.002 – 3	Sc45	0.02	0.4	0.20	0.125
Zn66	130	1 – 1500	Rh103	10	200	0.22	69.0

¹ Instrument LLQ represents the lowest quantifiable concentration in the diluted sample.

² Method LLQ takes into account the dilution factor of the sample and represents the lowest quantifiable concentration in e-liquids.

³ Background represents an estimation of the laboratory blank TE concentrations and takes into account the same dilution factor of the sample.

⁴ Contamination value for Mn55 was found to be slightly negative and was taken to be 0.

Table 2. Distribution of TE concentrations in 27 e-liquids with nicotine (16 g/L) and without nicotine. These data summarize the TE concentrations found during the first analysis of each e-liquid. The average concentrations for each element were calculated using only the quantifiable values (ie. no substitutions were made for values < LLQ).

Element	< LLQ	Minimum (ppb)	Maximum (ppb)	Average (ppb)	AFNOR recommendations (ppb)
Al	0 %	8.82	30.7	12.9	
As	43 %	< 1	3.42	1.57	3000
Be	100 %		< 0.1		
Cd	100 %		< 0.4		1000
Co	19 %	< 0.1	0.884	0.262	
Cr	0 %	4.08	11.5	7.16	
Cu	96 %	< 20	30.6	27.0	
Hg	94 %	< 4	4.54	4.38	1000
Mn	70 %	< 1.6	8.42	3.99	
Ni	100 %		< 16		
Pb	100 %		< 1		10000
Sb	0 %	0.400	214	7.21 ⁵	5000
Tl	100 %		< 0.1		
V	80 %	< 0.4	1.36	0.602	
Zn	96 %	< 200	510	418	

⁵ Ignoring the 2 highest concentrations of Sb (99.3 ppb and 214 ppb), the average concentration of Sb becomes 1.47 ppb.

Supplementary data

Table: TE concentrations (ppb) in all tested samples. Sample numbers refer to their flavor, without (N-) and with 16 g/L nicotine (N+).

	Al	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb	Sb	Tl	V	Zn
1 N-	11.8	1.48	< 0.1	< 0.4	0.266	4.08	< 20	< 4	3.14	< 16	< 1	1.48	< 0.1	0.64	< 200
1 N+	14.9	1.48	< 0.1	< 0.4	0.224	4.64	< 20	< 4	3.26	< 16	< 1	1.52	< 0.1	0.44	< 200
2 N-	15.3	< 1	< 0.1	< 0.4	0.202	6.36	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.42	< 0.1	0.56	< 200
2 N+	18.5	< 1	< 0.1	< 0.4	< 0.1	6.48	< 20	4.54	< 1.6	< 16	< 1	0.76	< 0.1	0.64	< 200
3 N-	10.9	2.88	< 0.1	< 0.4	0.128	6.92	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	2.12	< 0.1	0.54	< 200
3 N+	30.7	1.56	< 0.1	< 0.4	< 0.1	6.64	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	2.46	< 0.1	1.36	< 200
4 N-	16.9	1.82	< 0.1	< 0.4	0.562	9.06	< 20	< 4	4.3	< 16	< 1	1.94	< 0.1	0.78	< 200
4 N+	12.2	< 1	< 0.1	< 0.4	< 0.1	8.94	30.6	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.22	< 0.1	< 0.4	< 200
5 N-	11.5	3.42	< 0.1	< 0.4	0.258	8.54	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.48	< 0.1	< 0.4	< 200
5 N+	12.3	< 1	< 0.1	< 0.4	< 0.1	7.2	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	0.52	< 0.1	< 0.4	< 200
6 N-	12.3	< 1	< 0.1	< 0.4	< 0.1	6.7	< 20	4.5	< 1.6	< 16	< 1	1.08	< 0.1	< 0.4	< 200
6 N+	13.7	< 1	< 0.1	< 0.4	< 0.1	6.5	< 20	4.1	< 1.6	< 16	< 1	0.92	< 0.1	< 0.4	< 200
7 N-	12.8	< 1	< 0.1	< 0.4	0.882	6.84	< 20	< 4	8.42	< 16	< 1	0.4	< 0.1	< 0.4	< 200
7 N+	12.6	< 1	< 0.1	< 0.4	0.884	7.1	< 20	< 4	8.12	< 16	< 1	0.84	< 0.1	< 0.4	< 200
8 N-	14.1	< 1	< 0.1	< 0.4	0.294	6.4	< 20	< 4	3.8	< 16	< 1	1.58	< 0.1	< 0.4	< 200
8 N+	14.9	< 1	< 0.1	< 0.4	0.258	6.72	< 20	< 4	3.58	< 16	< 1	1.28	< 0.1	< 0.4	< 200
9 N-	11.9	< 1	< 0.1	< 0.4	0.132	6.7	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.22	< 0.1	< 0.4	< 200
9 N+	16.4	< 1	< 0.1	< 0.4	0.174	7.02	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.2	< 0.1	0.46	< 200
10 N-	10.8	3.36	< 0.1	< 0.4	0.234	6.02	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.42	< 0.1	< 0.4	< 200
10 N+	13.9	< 1	< 0.1	< 0.4	0.136	6.24	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.36	< 0.1	< 0.4	< 200
11 N-	11.9	< 1	< 0.1	< 0.4	0.41	11.48	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	213.6	< 0.1	< 0.4	325
11 N+	14.5	1.82	< 0.1	< 0.4	0.304	7.84	< 20	< 4	3.36	< 16	< 1	99.3	< 0.1	0.62	510.2
12 N-	13.1	1.42	< 0.1	< 0.4	0.308	6.2	< 20	< 4	3.36	< 16	< 1	1.62	< 0.1	0.66	< 200
12 N+	13.5	1.52	< 0.1	< 0.4	0.274	7.22	< 20	< 4	3.12	< 16	< 1	1.46	< 0.1	0.56	< 200
13 N-	14.1	< 1	< 0.1	< 0.4	< 0.1	7.3	23.3	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.2	< 0.1	< 0.4	< 200
13 N+	12.0	1.4	< 0.1	< 0.4	0.126	10	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.84	< 0.1	< 0.4	< 200
14 N-	16.7	< 1	< 0.1	< 0.4	< 0.1	7.58	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.1	< 0.1	< 0.4	< 200
14 N+	13.0	< 1	< 0.1	< 0.4	< 0.1	7.36	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	0.52	< 0.1	< 0.4	< 200
15 N-	11.0	1.36	< 0.1	< 0.4	< 0.1	6.62	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.42	< 0.1	< 0.4	< 200
15 N+	12.0	1.48	< 0.1	< 0.4	0.3	7.12	< 20	< 4	2.92	< 16	< 1	1.74	< 0.1	0.54	< 200
16 N-	14.5	1.2	< 0.1	< 0.4	0.342	5.76	< 20	< 4	3.42	< 16	< 1	1.1	< 0.1	0.44	< 200
16 N+	13.7	1.22	< 0.1	< 0.4	0.324	6.24	< 20	< 4	3.32	< 16	< 1	1.6	< 0.1	0.56	< 200
17 N-	10.4	1.04	< 0.1	< 0.4	0.216	8.82	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	2.16	< 0.1	< 0.4	< 200
17 N+	11.4	1.14	< 0.1	< 0.4	0.198	7.98	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.36	< 0.1	0.4	< 200
18 N-	11.4	< 1	< 0.1	< 0.4	0.116	5.94	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.16	< 0.1	< 0.4	< 200
18 N+	10.6	1.1	< 0.1	< 0.4	0.164	7.14	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.92	< 0.1	< 0.4	< 200
19 N-	10.5	1.02	< 0.1	< 0.4	0.196	8.34	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.72	< 0.1	< 0.4	< 200
19 N+	11.7	1	< 0.1	< 0.4	0.16	8.36	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.3	< 0.1	< 0.4	< 200
20 N-	9.8	1.06	< 0.1	< 0.4	0.206	6.56	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.52	< 0.1	< 0.4	< 200
20 N+	10.0	1.06	< 0.1	< 0.4	0.172	6.1	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.48	< 0.1	< 0.4	< 200
21 N-	11.4	1.16	< 0.1	< 0.4	0.21	5.84	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.52	< 0.1	< 0.4	< 200
21 N+	12.1	1.18	< 0.1	< 0.4	0.276	5.92	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.34	< 0.1	0.4	< 200
22 N-	9.0	3.06	< 0.1	< 0.4	0.318	6.86	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.86	< 0.1	< 0.4	< 200
22 N+	12.5	< 1	< 0.1	< 0.4	0.18	7.2	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.32	< 0.1	0.62	< 200
23 N-	8.8	2.34	< 0.1	< 0.4	0.17	7.36	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	2.36	< 0.1	0.52	< 200
23 N+	13.5	1.26	< 0.1	< 0.4	0.156	7.28	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.6	< 0.1	< 0.4	< 200
24 N-	10.8	1.32	< 0.1	< 0.4	0.342	7.04	< 20	< 4	3.14	< 16	< 1	1.64	< 0.1	0.66	< 200
24 N+	11.9	< 1	< 0.1	< 0.4	0.198	7.54	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	2.62	< 0.1	< 0.4	< 200
25 N-	12.4	< 1	< 0.1	< 0.4	0.162	7.7	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.82	< 0.1	< 0.4	< 200
25 N+	11.9	1.22	< 0.1	< 0.4	0.314	7.74	< 20	< 4	2.82	< 16	< 1	1.36	< 0.1	0.72	< 200
26 N-	9.3	< 1	< 0.1	< 0.4	0.108	7	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.1	< 0.1	< 0.4	< 200
26 N+	11.1	< 1	< 0.1	< 0.4	0.114	7.5	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	1.28	< 0.1	< 0.4	< 200
27 N-	18.0	1.28	< 0.1	< 0.4	0.354	7.22	< 20	< 4	3.74	< 16	< 1	1.96	< 0.1	0.52	< 200
27 N+	10.1	1.12	< 0.1	< 0.4	0.188	9.2	< 20	< 4	< 1.6	< 16	< 1	2.2	< 0.1	< 0.4	< 200

3. Evaluation chimique des cigarettes électroniques : analyse multi-composants des e-liquides et de leurs vapeurs respectives et comparaison à la cigarette conventionnelle

3.1. Objectif

Par rapport au projet général visant à évaluer l'impact sanitaire de la cigarette électronique, nous voulions associer les résultats des études toxicologiques expérimentales à la composition physicochimique des e-vapeurs, en comparaison à la cigarette conventionnelle notamment. Or, au regard de la variabilité des résultats observés dans la littérature, nous ne pouvions pas nous affranchir d'analyser les produits utilisés.

L'analyse physicochimique des e-liquides et de leurs e-vapeurs respectives a donc été conduite pour (1) vérifier la composition des e-liquides annoncée par le fabricant, (2) rechercher et quantifier divers polluants dans les e-liquides et e-vapeurs et (3) comparer les concentrations observées des composés analysés aux quelques données disponibles dans la littérature. Une cigarette conventionnelle de référence, servant à la fois de « témoin positif » et de point de comparaison avec la littérature, a aussi été étudiée.

3.2. Les composés d'intérêt

Par comparaison inévitable avec les 4 000 composés émis dans la fumée de cigarette conventionnelle, la composition des vapeurs de cigarette électronique est une information cruciale pour l'évaluation de l'impact sanitaire de ces produits. Dans l'idéal, l'analyse des e-liquides et des e-vapeurs devrait être la plus exhaustive possible et être menée « sans a priori ». Plusieurs auteurs se sont basés sur des listes de composés recherchés dans la fumée de cigarette conventionnelle, les listes les plus couramment utilisées étant celles proposées par la FDA [76], l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [77] ou *the Health Canada* [78].

Dans notre étude, le choix s'est porté sur les composés principaux des e-liquides (propylène glycol, glycérol, nicotine), ainsi que sur plusieurs familles de polluants. Très logiquement, les **15 ETM** étudiés et présentés dans la partie précédente en font partie. **Cinquante pesticides** ont également été recherchés. Ce terme désigne les produits destinés à lutter contre les parasites animaux et végétaux

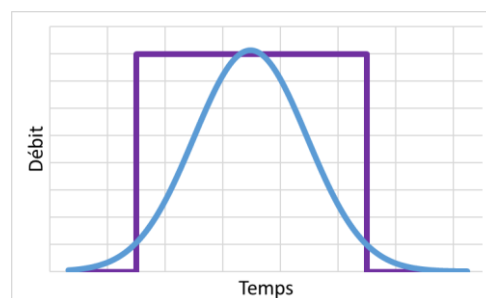
nuisibles aux cultures et aux produits récoltés et renvoie plus particulièrement aux insecticides, fongicides et herbicides. Les molécules de cette classe sont associées à des effets toxiques chez l'Homme, notamment pour des expositions répétées ou chroniques : toxicité pulmonaire, métabolique, sur le système nerveux, le développement, la reproduction et cancérogénicité [79]. Les pesticides aussi sont recherchés dans la fumée de cigarette conventionnelle [80] et pourraient être une impureté de la nicotine, du glycérol ou des arômes entrant dans la composition des e-liquides. **Seize HAP**, issus de la liste prioritaire de l'USEPA, ont aussi été recherchés. Les HAP peuvent être trouvés à l'état naturel ou être générés lors de la combustion de matériel organique. L'exposition à plusieurs de ces HAP, généralement sous forme de mélange, est associée à des effets cancérogènes [81]. Enfin, **3 composés carbonylés**, le formaldéhyde, l'acétaldéhyde et l'acroléine, ont été recherchés. Ces 3 composés sont notamment irritants pour la peau et les muqueuses et le formaldéhyde est classé cancérogène avéré selon la classification du CIRC. Les 16 HAP et les 3 carbonylés recherchés dans nos travaux sont aussi systématiquement retrouvés dans la fumée de cigarette conventionnelle [61,64].

3.3. La génération des e-vapeurs et fumées de cigarette

Le choix des profils d'aspiration s'est basé sur des normes ou recommandations disponibles au début de nos travaux. Ces profils ont été considérés comme des arguments positifs pour renforcer la notion de réalisme de l'expérience. De plus, des profils normés ou déjà publiés étant susceptibles d'être utilisés plus fréquemment que d'autres, leur utilisation augmentait les chances de pouvoir se comparer avec d'autres études, dans les mêmes conditions de génération de bouffées.

La machine à fumer a donc été paramétrée selon le profil décrit dans la norme ISO 3308:2012 pour la cigarette 3R4F : une bouffée de 35 mL durant 2 secondes toutes les minutes, 8 bouffées par cigarette [82]. Pour la cigarette électronique, la machine à fumer a été paramétrée selon le profil *square* recommandé par le CORESTA (Centre de Coopération pour les Recherches Scientifiques Relatives au Tabac) et repris dans la 3^{ème} norme de l'AFNOR : une bouffée de 55 mL durant 3 secondes toutes les 30 secondes [39]. Ces deux profils diffèrent, en plus de leurs caractéristiques principales, par leur relation débit/temps : « en cloche » pour le profil ISO 3308:2012 et « carrée » pour le profil du CORESTA (Figure 11).

	Cigarette classique	E-cigarette
	ISO 3308	CORESTA
Bouffées/cigarette	8	
Durée de la bouffée	2 secondes	3 secondes
Fréquence des bouffées	Toutes les 60 secondes	Toutes les 30 secondes
Volume d'une bouffée	35 mL	55 mL



Relation débit/temps des profils d'aspiration ISO 3308:2012 (« en cloche » - bleu) et CORESTA (« carrée » - violet)

Figure 11. Caractéristiques des profils de génération de bouffée ISO 3308 et CORESTA

3.4. La collecte des e-vapeurs et fumées

La collecte (ou « capture » ou « piégeage ») des composés chimiques d'intérêt pour leur analyse ultérieure est une étape cruciale. Elle doit être adaptée à chaque composé, la plus efficace possible, non saturable et ne doit pas gêner la génération des bouffées d'e-vapeur ou de fumée. Ce dernier point implique notamment de faire des compromis. Au regard de la configuration de la machine à fumer, les systèmes de collecte pouvaient se placer à deux endroits stratégiques : entre la cigarette/e-cigarette et le piston (soit proche de l'étape de génération) ou en aval du piston (soit à distance de l'étape de génération, en sortie de la machine à fumer). Dans le premier cas, la faible distance entre les étapes de génération et de collecte des vapeurs/fumées suppose une meilleure représentativité de la collecte : l'échantillon est piégé rapidement et a donc peu de temps pour changer de température, d'état physique ou pour adhérer aux parois de la tuyauterie. Cependant, positionner le matériel de collecte ainsi implique d'imposer une certaine résistance à l'air au moment de l'aspiration (ou « perte de charge ») qui modifie potentiellement les conditions de génération des bouffées définies par les profils d'aspiration. De plus, dans ces conditions, le débit d'échantillonnage des vapeurs/fumées ne peut pas être ajusté, car il est fixé par les profils d'aspiration. Il diffère donc entre les deux types de cigarette et peut être, dans certains cas, trop élevé par rapport aux recommandations de bonne utilisation des dispositifs de collecte (pour les cartouches d'adsorbant notamment). Désirant travailler dans des conditions les plus réalistes possibles, les dispositifs de collecte ont été positionnés en sortie de la machine à fumer. Ainsi, les

conditions de génération de bouffée ne sont pas altérées et le débit d'échantillonnage peut être ajusté. Il a fallu alors assumer un risque de perte d'une proportion inconnue de l'échantillon, par exemple par adsorption sur les parois des tuyaux ou du cylindre de la machine à fumer.

Les dispositifs utilisés pour chaque classe de composés (Figure 12) sont décrits dans l'article ci-après et sont principalement des barboteurs remplis de différents liquides. Des cartouches d'adsorbant ont été spécifiquement utilisées pour la collecte des composés carbonylés.

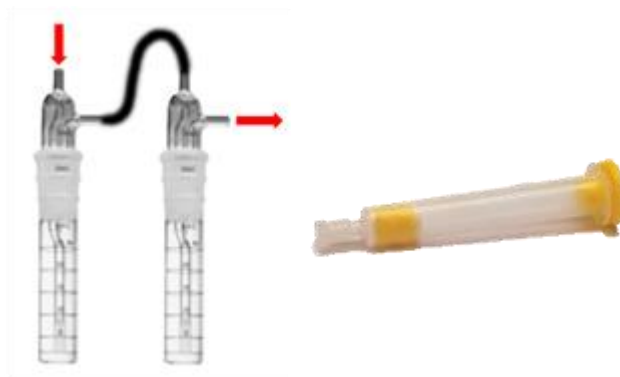


Figure 12. Exemple de barboteur et de cartouche d'adsorbant (d'après <http://www.skincinc.com>)

Le nombre de bouffées sélectionné pour ces analyses a été volontairement choisi pour correspondre à la durée d'exposition des cellules aux vapeurs/fumées dans l'étude expérimentale, soit 48 min. Ceci équivaut respectivement à 96 et 48 bouffées pour les cigarettes électroniques et conventionnelles, au regard des profils utilisés. Ce choix a notamment pour but de faciliter la confrontation des données physicochimiques aux données expérimentales.

L'efficacité de collecte est donc un paramètre très important. Elle est en lien avec la capacité des composés d'intérêt à se dissoudre ou à rester « piégés » dans les liquides de barbotage ou sur les adsorbants solides, qu'ils proviennent de la phase gazeuse ou de la phase particulaire de l'aérosol. Malgré les optimisations et les moyens utilisés, trois indicateurs suggéraient que l'efficacité de collecte n'était pas optimale : (1) l'observation de fumée/vapeur, bien que peu dense, en sortie des dispositifs de collecte, (2) la quantification de composés d'intérêt dans le second barboteur et (3) l'estimation de rendements inférieurs à 100 % pour les molécules pour lesquelles les concentrations dans les e-liquides étaient connues (propylène

glycol, glycérol, nicotine). Ainsi, les valeurs absolues mesurées dans cette étude sont à interpreter avec précaution et à considérer plutôt comme des valeurs *a minima*. Néanmoins, en supposant une efficacité de collecte comparable entre les e-vapeurs et les fumées de cigarette, l'interprétation la plus pertinente des résultats obtenus pour les e-vapeurs se fait en comparaison des résultats de la fumée de cigarette conventionnelle.

La notion d'efficacité de collecte est assez peu abordée dans la littérature. Le paramètre le plus souvent cité dans ce contexte est l'absence d'analyte dans le dispositif de garde (barboteur ou cartouche). C'est un point très important à maîtriser, qui nécessite des optimisations poussées et du matériel spécialisé.

3.5. Les techniques analytiques

Les techniques analytiques utilisées dans cette étude ont été soit développées au laboratoire, soit acquises *via* des collaborations. Elles sont décrites dans l'article ci-après.

3.6. Vérification de la composition des e-liquides

Les e-liquides commerciaux analysés (saveurs tabac blond et menthe chlorophylle) contenaient de 541 à 639 g/L de propylène glycol, de 302 à 314 g/L de glycérol, 15,9 et 16,0 mg/mL de nicotine lorsqu'elle était annoncée et n'en contenaient pas à un niveau détectable dans le cas contraire. Ces résultats sont en accord avec la composition annoncée du fabricant : < 65 % de propylène glycol, < 35 % de glycérol, 16 mg/mL de nicotine. Dans la littérature, la concordance entre composition annoncée et composition déterminée n'est pas systématique, notamment pour la nicotine [49,83–88], ce qui démontre la nécessité de contrôler et réglementer la fabrication de ces produits.

3.7. Vers une estimation de l'exposition aux polluants ?

Dans les e-liquides, quelques ETM et HAP ont été retrouvés à des concentrations ne dépassant pas 61,8 ng/mL. Seuls 2 pesticides sur les 50 testés, le chlorpyriphos éthyl et la trifluraline, ont été retrouvés dans quelques e-liquides, à des concentrations proches des limites de quantification et ne dépassant pas 66,3 pg/mL.

Concernant la recherche de polluants dans les e-vapeurs : aucun pesticide n'a été détecté ; sur les 16 HAP ciblés, seuls l'acénaphthylène et le naphthalène ont été retrouvés à des concentrations de l'ordre d'une dizaine ou d'une centaine de pg/bouffée, respectivement ; l'acétaldéhyde, le formaldéhyde et l'acroléine ont été retrouvés à des niveaux de l'ordre de 9,4 à 116,1 ng/bouffée d'e-vapeur ; et quelques ETM ont été retrouvés, incluant Sb, Cd, Cr et Pb, à des concentrations allant de 2,2 à 185 pg/bouffée. Tous les composés cités ci-dessus ont été retrouvés dans la fumée de cigarette de référence 3R4F à des concentrations de 7 à plus de 6000 fois supérieures, à l'exception du Cr et du Sb, non retrouvés dans la fumée de cigarette.

En se basant sur les larges différences de concentrations observées entre les e-vapeurs et les fumées, il semble pertinent de conclure que, dans les conditions testées, la cigarette électronique expose les consommateurs à moins de composés potentiellement toxiques et en plus faible quantité que la cigarette conventionnelle. Néanmoins, ces résultats ne sont pas à confondre avec un « niveau moyen » d'exposition des vapoteurs. En effet, ceci dépend vraisemblablement d'un grand nombre de facteurs incluant le matériel utilisé, sa qualité, la façon de vapoter ou encore la fréquence de consommation.

C'est aujourd'hui une des grandes difficultés de la caractérisation de l'exposition chimique des vapoteurs : la représentativité du résultat. Des études chez l'Homme rapportent que la façon de vapoter diffère d'un individu à un autre, chez un même individu à différents moments de la journée ou encore en fonction du modèle d'e-cigarette utilisé [89–92]. Or, les études physicochimiques sont généralement réalisées dans des conditions bien définies (profil de vapotage, modèle de cigarette électronique, e-liquide etc.) et, de ce fait, « quasi uniques ». Il serait donc intéressant de faire varier ces différents paramètres, d'en observer l'impact sur la composition des e-vapeurs et de déterminer les « limites de réalisme » de l'expérience. Ceci permettrait d'estimer un « *range* » d'exposition probable des vapoteurs. Cette approche a notamment été utilisée pour la nicotine. Talih *et al.* (2014), ont observé, pour un modèle d'e-cigarette, un e-liquide et un voltage donnés, que la quantité de nicotine émise dans 15 bouffées pouvait varier, en fonction du profil de vapotage, de 0,11 à 0,72 mg pour 3,3 V et de 0,64 à 4,70 mg pour 5,2 V [93].

Bien que le choix d'un seul profil de vapotage soit cohérent pour le déroulement d'une seule et même étude, que la publication d'un « profil de référence » faciliterait la comparaison des données et qu'un tel profil de référence

serait pertinent pour pouvoir imposer un contrôle de qualité des e-cigarettes, il est clair qu'un seul et unique profil de vapotage ne peut être représentatif de l'exposition de tous les vapoteurs, ni prétendre s'appliquer de manière réaliste à tous les types de cigarette électronique.

L'estimation précise de l'exposition des vapoteurs est une problématique complexe dépassant la question de la robustesse analytique. Ces travaux et les suivants participent à l'amélioration de ces connaissances et pourront aider à déterminer les meilleures conditions d'analyse des e-liquides et de leurs e-vapeurs.

3.8. Article #2

Publié dans le *Journal of Analytical Toxicology* :

Beauval N, Antherieu S, Soyez M, Gengler N, Grova N, Howsam M, Hardy EM, Fischer M, Appenzeller BMR, Goossens JF, Allorge D, Garçon G, Lo-Guidice JM, Garat A. Chemical evaluation of electronic cigarettes: multicomponent analysis of liquid refills and their corresponding aerosols. *Journal of analytical toxicology*. 2017 Oct 1;41(8):670-8.

Chemical evaluation of electronic cigarettes: multicomponent analysis of liquid refills and their corresponding aerosols.

Beauval N^{1,2}, Antherieu S¹, Soyez M¹, Gengler N³, Grova N⁴, Howsam M⁵, Hardy E⁴, Fischer M³, Appenzeller B⁴, Goossens JF⁵, Allorge D¹, Garçon G¹, Lo-Guidice JM¹, Garat A¹.

¹ Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA 4483 - IMPECS - IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France

² IMT Lille Douai, Univ. Lille, Département SAGE, F-59500 Lille, France

³ Laboratoire National de Santé, 1, rue Louis Rech, L-3555 Dudelange, Luxembourg

⁴ Human Biomonitoring Research Unit, Department of Population Health, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

⁵ Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses, Université de Lille 2, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, 59006 Lille, France

Keywords

Electronic cigarettes, E-liquids, Chemicals, E-vapors, Tobacco.

Abstract

Electronic cigarette use has raised concern worldwide regarding potential health risks and its position in tobacco cessation strategies. As part of any toxicity assessment, the chemical characterization of e-liquids and their related vapors are among fundamental data to be determined. Considering the lack of available reference methods, we developed and validated several analytical procedures in order to conduct a multicomponent analysis of 6 e-liquid refills and their resultant vapor emissions (generated by a smoking machine), and compared them with tobacco smoke. We combined several techniques including gas chromatography, high and ultra-performance liquid chromatography and inductively-coupled plasma with mass spectrometry or ultraviolet and flame ionization detection in order to identify the main e-liquid constituents (propylene glycol, glycerol and nicotine), as well as multiple potentially harmful components (trace elements, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), pesticides, carbonyl compounds). Regarding

propylene glycol, glycerol and nicotine concentrations, the 6 tested e-liquids comply with the advertised composition and contain only traces of pollutants. Noticeable lower concentrations of trace elements (≤ 3.4 pg/mL puff), pesticides ($< \text{LOQ}$), PAHs (≤ 4.1 pg/mL puff), and carbonyls (≤ 2.11 ng/mL puff) were measured in e-vapors compared to those in cigarette smoke (up to 45.0 pg/mL puff, 8.7 pg/mL puff, 560.8 pg/mL puff and 1675 ng/mL puff, respectively). Although an accurate characterization of electronic cigarette emissions requires further analytical optimizations, our results have shown that vaping exposes the user to lesser amounts of selected toxic components of concern found in some representative French e-cigarette products than does smoking typical conventional cigarettes.

Introduction

Tobacco use is of major public health concern, causing nearly 6 million deaths annually worldwide, and a predicted death toll of 1 billion within the 21st century (1). Smoking is cited as the most important risk factor for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), cardiovascular disorders and cancers. The World Health Organization (WHO) estimates that smoking costs more than half a trillion dollars each year (2). Smoking cessation is currently the only effective way to slow down the progression of these diseases and to reduce mortality.

The use of electronic cigarettes (“e-cig”) can be considered as an alternative to smoking. Briefly, consumers, or “vapers”, breathe in vapors (or “e-vapors”) produced by the heating of an e-liquid (a mixture of propylene glycol, glycerol and flavorings, supplemented or not with different concentrations of nicotine). E-cigs are generally considered as less harmful than tobacco and has already been recommended by several practitioners in smoking cessation since few years (3, 4). However, it has been reported than the reliable scientific or regulatory information about e-cigs is not widely known (4, 5). In addition, the absolute safety of such products cannot be guaranteed in the absence of a thorough clinical evaluation and a long-term population surveillance.

The toxicity of the main constituents of e-liquids (except nicotine) has to date been poorly studied. For propylene glycol, animal experiments show minor acute and chronic toxicity *per os* or by inhalation, except for very high doses (6). Propylene

glycol is considered to be of low toxicity for humans and professional exposures can give rise to skin irritation or allergic manifestations (6). Concerning glycerol, its acute toxicity seems to be limited to irritation of the skin, eyes and respiratory tract. Renne *et al.* showed that rats exposed to chronic inhalations of glycerol exhibited minimal to mild squamous metaplasia of the epithelium lining the base of the epiglottis (7).

Regarding e-liquid flavorings, thousands are actually available on the market (8), exposing consumers to a broad range of chemicals. These are mostly food flavors and are considered as safe for ingestion by authorities. However, they could be at sufficiently high concentrations in refill fluids to be of toxicological concern by inhalation (9). In recent experimental studies, the cytotoxic effects of e-liquids or their aerosols have been shown to be correlated with, or even restricted to, some flavorings (10). Moreover, several studies report the presence of some potentially carcinogenic substances in e-vapors, including carbonyl compounds, volatile organic compounds and nitrosamines (11), which could come from either contamination or molecular transformation. The presence of several trace elements was also reported in e-cig emissions, likely released by cartomizer components (12).

Considering the potential help that e-cig could represent for smoking cessation, the considerable lack of knowledge about long-term effects of e-cig use on human health and the large number of e-cig users, accurate and robust chemical characterization of e-cig emissions are among critical data to be determined in order to assess e-cig toxicity.

The aim of the present study was to develop and test several analytical methods in order to achieve a multicomponent analysis of 6 e-liquids and their corresponding aerosols. Our purpose was: -1- to check the concentration of the components indicated on e-liquid labels; -2- to evaluate the potential contamination of these e-liquids by toxic compounds, and; -3- to analyse and compare the chemical composition of both e-cig and conventional cigarette emissions generated *via* a smoking machine.

Materials and methods

a. E-liquids, e-cigarettes and conventional cigarettes

Six e-liquids and one model of e-cigarette (NHOSS® brand) were obtained from a French manufacturer (Innova SAS, Bondues, France). Two flavored e-liquids among NHOSS® best-sellers and a “control” flavorless e-liquid (unavailable on the market), with and without nicotine, were analysed: chlorophyll mint flavor without nicotine (CM/Nic-) or with 16 mg/mL nicotine (CM/Nic+); blond tobacco flavor without nicotine (BT/Nic-) or with 16 mg/mL nicotine (BT/Nic+); and a mixture of propylene glycol/glycerol without flavoring, produced by the manufacturer under the same conditions as marketed e-liquids, without nicotine (F-/Nic-) or with 16 mg/mL of nicotine (F-/Nic+). All e-liquids were provided in 20 mL plastic bottles labeled as follows: propylene glycol < 65 %; glycerol < 35 %; food flavors; nicotine 0 or 16 mg/mL. The e-cigs used for vapor generation were the second generation “Lounge” model designed with 2.8 Ω coil and 3.6 V power supply. A new clearomiser was used for each experiment after having undergone 16 conditioning puffs and a USB power supply replaced the original battery to prevent age-related-impairments. The heating was triggered by suction. Clearomisers were weighted before and after each experiment to measure the precise volume of e-liquid consumed.

Conventional cigarettes used for this study were 3R4F standard reference cigarettes (Lexington, Ky; <https://ctrp.uky.edu/>).

b. Vapor and smoke generation

E-vapors and tobacco smoke were generated with a Vitrocell® VC1 smoking machine (Vitrocell, Waldkirch, Germany). For e-cig experiments, the CORESTA (Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco) approach was used, with 55 mL puff over 3 seconds, twice a minute (13). For 3R4F experiments, the VC1 parameters were those of the ISO 3308:2012 smoking regime (35 mL puff over 2 seconds, once a minute, 8 puffs per cigarette).

c. Vapor and smoke collection

E-vapors and tobacco smoke were collected from 96 puffs of e-cigs and 48 puffs of 3R4F cigarettes, respectively. Before each experiment, a thorough cleaning of the Vitrocell® pumping system was performed with ethanol and specific tubing restricted to each e-liquid was installed.

Nicotine, cotinine, propylene glycol, ethylene glycol, glycerol, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and pesticides were collected by 2 impingers placed in series, containing 50 mL (first) and 25 mL (second) of methanol, and refrigerated at -40°C in an ethanol-dry ice bath.

Carbonyl compounds were trapped using specific silica cartridges coated with 2,4 dinitrophenylhydrazine (LpDNPH S10 Cartridge, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Trace elements were collected using 2 midjet impingers disposed in series, each containing 20 mL of 5 % (v/v) nitric acid solution in Milli-Q® water (Merck Millipore, Billerica, MA).

Collecting materials were positioned at the smoking machine outlet in order not to alter e-vapor and smoke generation.

Blank collections were performed for all experiments using the smoking machine working without e-cig or conventional cigarette connected to and were taken into account for data analysis (Table S2).

d. Analytical methods

❖ Propylene glycol and ethylene glycol

E-liquids – 300 µL of water-diluted e-liquid (1/1000) were derivatized with 300 µL of phenylboronic acid (0.05 mol/L in a 75/25 (v/v) mixture of dichloromethane/acetone) in presence of 100 µL of 2,3-butanediol (1 g/L in dichloromethane) used as an internal standard. After centrifugation (5 min, 25155 g), 1 µL of the organic phase was injected into a gas chromatograph 7890A series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), coupled with a tandem mass spectrometer Quattro Micro™ GC MICROMASS® (Waters, Milford, MA). Samples were injected with 700 split *ratio* at 260 °C. Chromatographic separation was performed on CP-Sil

8Cb-MS column (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm - Agilent Technologies). Analysis was performed in Selected Ion Recording (SIR) mode.

Vapor extracts – Methanolic extracts were 10-fold water-diluted and then processed as e-liquids above.

❖ *Glycerol*

E-liquids – 100 µL of water-diluted e-liquid (1/5000) was mixed with 100 µL of D8-glycerol used as an internal standard (100 mg/L in methanol). The mixture was dried under a nitrogen-stream at 40 °C and resuspended with 50 µL of BSTFA/TMCS (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide/trimethylchlorosilane 99/1). After a 20-min heating at 60 °C, 1 µL was injected with 400 split *ratio* at 300 °C into the same analyser used to quantify glycols. Chromatographic separation was achieved with a Grace AT-5ms Heliflex column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm - Grace Davidson Discovery Science, Columbia, MD). Analysis was performed in MRM (multiple reaction monitoring) mode (m/z 218.2 → 73.1 and 218.2 → 147.2 for glycerol; m/z 222.2 → 147.2 for D8-glycerol).

Vapor extracts – Methanolic extracts were 20-fold diluted with methanol and then processed as e-liquids above.

❖ *Nicotine*

E-liquids – Samples were 4-fold diluted in an isopropanol solution containing N-ethylaniline used as internal standard. Analyses were carried out by gas chromatography with flame ionization detection using a Clarus 580 instrument (Perkin Elmer, Waltham, MA) and operated with a 35 split ratio on a Supelco SLB 5MS column (5 % diphenyl, 95 % methyl polysiloxane, 30 m x 0.250 mm x 0.5 µm - Sigma-Aldrich).

Vapor extracts – 100 µL of 40-fold water-diluted methanolic extract was supplemented with 50 µL of D4-nicotine (100 µg/L) as an internal standard. Ten µL of this solution was injected in full-loop mode into an ultra-performance ACQUITY

UPLC liquid chromatographic system coupled with a triple quadrupole ACQUITY TQD detector used with an ACQUITY UPLCr HSS T3 1.8 μ m column (Waters) maintained at 50°C. The mobile phase was a gradient mixture of water and acetonitrile. Detection was performed with positive ion electrospray ionization in MRM mode (m/z 163.10 \rightarrow 117.10 and 163.10 \rightarrow 130.10 for nicotine; m/z 167.20 \rightarrow 84.10 and 167.20 \rightarrow 134.10 for D4-nicotine).

❖ *Trace elements*

An exhaustive list of the trace elements analysed is provided in supplementary data, section 1.1.

E-liquids – Standards and samples were prepared and analysed using an inductively-coupled plasma - mass spectrometer VARIAN 820-MS with SPS3 autosampler (Bruker, Billerica, MA), as described previously (14).

Vapor extracts – Water extracts were analysed using the same ICP-MS instrument. Standard solutions were prepared with 1.67 % (v/v) nitric acid solution in Milli-Q® water containing 0.2 % (v/v) butane-1-ol, 0.1 % (v/v) triton® and 50 μ g/L of gold. Collected solutions were 3-fold diluted with a specific diluent in order to obtain the same final concentrations of nitric acid, butane-1-ol, triton and gold as the standard solutions.

❖ *Pesticides*

An exhaustive list of the pesticides analysed is provided in supplementary data, section 1.2.

The method used for the determination of 50 pesticides in e-liquids and methanolic extracts was adapted from a method previously published by Hardy *et al.* for the analysis of urinary pesticides, using gas-chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) (15).

Briefly, an aliquot of 500 μL (e-liquid or methanolic extract) supplemented with 5 μL of an internal standard solution (stable isotope labeled analogues) and 7.6 mL of 1 M phosphate buffer at pH 7 was analysed with direct immersion solid-phase microextraction (SPME) at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 80 min and desorption for 10 min in the gas chromatograph injector. The analysis was performed with a 7890 gas chromatograph equipped with a HP-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) coupled to a 7000A triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) operating in negative chemical ionization mode. In the case of e-liquids, 240 μL of acetonitrile was added into the vial to increase the transfer of the chemicals onto the SPME fiber.

❖ PAHs

An exhaustive list of the PAHs analysed is provided in supplementary data, section 1.3.

The determination of PAHs in e-liquids was based on the analytical method previously described by Grova *et al.* (16), using the aforementioned GC-MS/MS instrument operating in electron impact ionization mode.

E-liquids – E-liquid samples (500 μL) were firstly supplemented with 10 μL of a mixed solution of internal standards at 0.1 mg/mL of the 16 PAHs investigated (Dr. Ehrenstorfer, LGC Standards, Molsheim, France). Then, 1.5 mL of water and 2 mL of cyclohexane (CH) were added. After agitation and centrifugation, the supernatant was collected and evaporated under nitrogen stream at 37 $^{\circ}\text{C}$. The residue was dissolved in CH and applied to an Envi-Chrom P solid phase extraction column (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) previously conditioned with CH. The PAHs were then eluted with 2 mL of ethyl acetate-cyclohexane (50:50; v/v) and the extract evaporated under nitrogen flow. Finally, 1 μL of the supernatant was injected into the analyser.

Methanolic extracts – Methanolic extracts (2 mL) supplemented with 10 μL of 0.1 mg/L PAH internal standard solution, 0.5 mL of water and 2.5 mL of CH were agitated for 20 min at room temperature, centrifuged for 5 min at 1800 g, and the two

layers were separated. The CH layer containing PAHs was evaporated to a volume of 50 μL and 1 μL was then injected into the analyser.

❖ *Carbonyl compounds*

Formaldehyde, acetaldehyde and acrolein were analysed.

Vapor extracts – Exposed LpDNPH S10 cartridges (Supelco, Sigma-Aldrich) were desorbed with 5 mL of acetonitrile. Twenty-five μL were injected into a high performance liquid chromatographic system coupled with a diode array detector which consists in a liquid chromatograph (1260 Infinity) coupled with a DAD detector (G1315C) (Agilent Technologies). Chromatographic separation was achieved on a Symmetry C18, 250 mm x 4.6 mm x 5 μm column (Waters). The mobile phase was a gradient mixture of acetonitrile and water.

❖ *Analytical method validation*

In spite of the lack of regularity guidelines, reference methods or published critical values for electronic cigarettes, the validation procedure of these methods complies with recommendations for the validation of new analytical methods (17).

Results

Tables 1 and 2 describe the chemical analysis of e-liquids and e-cig/3R4F emissions, respectively. For e-vapors and smoke, results were expressed in mass of analyte per milliliter of emission (/mL puff) in order to better evidence differences between smoke and e-vapor chemical compositions and to facilitate data comparison with the literature, considering the large variability of puff generation protocols currently used.

Additional analytical method parameters are available in supplementary data (Table S3).

a. Propylene glycol, ethylene glycol, glycerol and nicotine

Nicotine was not detected in e-liquids labeled as nicotine-free nor in their respective vapors. In nicotine-labeled e-liquids, sold as containing 16 mg/mL nicotine, concentrations were 16.0 and 15.9 mg/mL for BT/N+ and CM/N+ samples, respectively (Table 1). Propylene glycol and glycerol concentrations in e-liquids ranged from 541 to 639 and 302 to 341 g/L, respectively, corresponding to the advertised propylene glycol/glycerol ratios of 65/35. In e-vapors, concentrations of propylene glycol, glycerol and nicotine varied within e-liquids (Table 2) but remained consistent when related to the mass of e-liquid consumed during experiments (data not shown). Their relative proportions, previously measured in e-liquids, were also maintained. Ethylene glycol was not detected in any e-liquid or e-vapor sample.

b. Trace elements

Low concentrations of all analysed trace elements were found in e-liquids, mostly below or close to their LOQs (< 32 µg/L for all elements, except for Zn < 200 µg/L, Table 1). In e-vapors, Be, Cu, Hg, V and Zn were not quantified in any collected solution. Quantifiable concentrations of Al, Co, Mn, Ni and Pb were found in several e-vapor samples, but were comparable with experimental blank concentrations. The presence of the aforementioned elements in the blank samples likely results from contamination by the smoking machine or by the collecting or storage systems. Only Cd, Cr and Sb were present in some e-vapors, up to 0.14, 3.4 and 0.47 pg/mL puff, respectively. As, Cd, Pb and Tl were quantified in 3R4F smoke, from 1.02 pg/mL puff for Tl to 44.98 pg/mL puff for Cd (Table 2).

c. Pesticides

Most of the 50 pesticides tested were not detected in any e-liquid or e-vapor samples. Only chlorpyrifos ethyl and trifluralin were found in some e-liquid samples, with concentrations slightly higher than the LOQ (up to 66.3 pg/mL for CM/Nic-, Table 1). While no pesticide was quantified in e-vapors, chlorpyrifos ethyl, cyhalothrin, cypermethrin, trifluralin, α -endosulfan and β -endosulfan were present in cigarette smoke (from 0.9 to 8.7 pg/mL puff, Table 2).

d. PAHs

Ten of the 16 targeted PAHs were detected in e-liquids with concentrations close to or below LOQs. Naphthalene and phenanthrene were the major PAHs present in e-liquids, from < 0.2 to 61.8 ng/mL and from 2.43 to 3.83 ng/mL, respectively (Table 1). Only naphthalene and acenaphthylene were systematically detected in e-vapors at very low concentrations (up to 4.10 and 0.37 pg/mL puff, respectively), compared to 3R4F cigarette smoke (561 and 384 pg/mL puff, respectively). Trace concentrations of naphthalene, phenanthrene and fluorene were quantified in experimental blanks, though negligible compared to their concentrations in smoke (Table S2). All PAHs were quantified in conventional cigarette smoke, at variable concentrations, from 1.15 pg/mL puff for dibenz[a,h]anthracene to 367 pg/mL puff for fluorene (Table 2).

e. Carbonyl compounds

Carbonyls were only studied in e-vapors (Table 2). Relatively similar concentrations of formaldehyde and acetaldehyde, ranging from 0.16 to 1.48 ng/mL puff, were quantified in all e-vapors, whereas acrolein was almost only found in BT-related vapors without and with nicotine (2.11 and 1.72 ng/mL puff, respectively). As 3R4F smoke collections demonstrated signs of saturation, by consumption of all available DNPH, even after processing only 8 puffs (data not shown), carbonyl compounds were not considered in 3R4F smoke.

Discussion

Propylene glycol and glycerol are the base components of e-liquid mixtures and their proportions vary depending on the brand and the manufacturer. Labelled as containing < 65 % propylene glycol and < 35 % glycerol, the e-liquids tested here complied with the advertised composition, were relatively similar to each other, and did not contain ethylene glycol (Table 1).

Even if a portion of e-vapors was stagnating above the impinger's liquid level, indicating that collection efficiency in our experiment was not optimal, particular attention was given to the harmonization of all protocols with a view to perform

comparative studies. When related to a single puff, Pellegrino *et al.* (18) reported similar concentrations as those measured here, whereas higher concentrations were reported by Breiev *et al.* using an online proton transfer reaction mass spectrometry approach (19).

Nicotine is one of the major concerns for “vapers”, especially in a smoking cessation attempt, and is likely the major toxic compound contained in e-liquids and vapors. In contrast with results described in recent studies (20, 21), we demonstrated that the e-liquids tested here contained nicotine concentrations corresponding closely to their labelling.

In e-vapors, nicotine yields should be controlled to ensure consumer safety and effective nicotine withdrawal, if desired. While expected nicotine mass emitted from 3R4F smoke was not reached during experiments, suggesting some underestimation, results obtained for e-vapors (Table 2) were comparable to those from previous studies (22–24). When related to one mL of vapor, extracted nicotine concentrations were approximately 2- to 3-fold higher in 3R4F smoke than in vapors from e-liquids initially containing 16 mg/mL nicotine. Related to one puff, nicotine delivery by vaping was almost similar to that by smoking (Table S4), except for CM/Nic+ because of a lower e-liquid consumption during the experiments (data not shown). However, El-Hellani *et al.* suggested that the bioavailable nicotine could be lower than expected because of the pH of e-liquids (25), so further investigations are needed to associate nicotine theoretical intake with vapers’ real exposure, regarding conditions of use.

The quantification by ICP-MS of 15 trace elements in a mixture of propylene glycol and glycerol was subject to strong matrix effects and presented a real analytical challenge. Low concentrations of the selected trace elements were found in the e-liquids tested (Table 1), similar to those reported by Saffari *et al.* (26). In a previous study, we analysed 48 other e-liquids from the NHOSS® brand (14). Neither higher concentrations nor noticeable variability within e-liquids was observed for any sample and elements studied here, except for cherry flavored e-liquids without and with nicotine, which contained higher amounts of Sb (214 and 99.3 µg/L, respectively) and Zn (325 and 510 µg/L, respectively). Thus, further studies should

evaluate how flavor components may be considered as a potential source of direct e-liquid contamination by trace elements.

In 3R4F smoke, only As, Cd, Pb and Tl were quantified (Table 2). Comparable, although slightly higher, concentrations of As (2.5 vs. 1.18 ng/cigarette in our study), Cd (34.5 vs. 12.6 ng/cigarette) and Pb (9.1 vs. 4.3 ng/cigarette) were reported by Pappas *et al.* (27), suggesting our smoke collection method is suitable in this context. Compared to 3R4F smoke, e-vapors emitted barely detectable levels of As, Cd, and Tl (mostly below LOQs), but quantifiable levels of Cr and Sb (concentrations near LOQs) in some e-vapor samples (up to 4.36 pg/mL puff and 0.466 pg/mL puff, respectively). Concentrations of Pb observed in this experiment cannot be attributed to e-vapors regarding the probable contamination highlighted by experimental blank results (Table S2). Further optimization is then necessary; however, these concentrations remain lower than those in 3R4F smoke. Williams *et al.* attributed the origin of elemental emissions in e-vapors to several device components (12). Interestingly, the e-cig tested in the present study contained nichrome wires that could be potential sources of chromium emission, even if we used new clearomisers for each experiment in an attempt to minimize potential effects on emissions of deterioration of the device. Specific concentrations of chromium oxidation states were not determined in this study. As chromium (VI) is carcinogenic according to IARC (28), further studies should explore this issue, as well as the potential impact of device aging and vaping conditions on elemental emissions. Our results remain consistent with the few available studies which quantified trace elements in e-cigarette emissions (12, 29).

Owing to the potential natural origin of several e-liquid compounds like glycerol, nicotine or flavorings, 50 pesticides were investigated in our study. Only 2 molecules were found in some e-liquid samples, mostly at trace levels (Table 1). Chlorpyrifos ethyl and trifluralin were quantified in some flavored e-liquids, both without and with nicotine, suggesting flavorings to be a more likely source of pesticides than nicotine. However, unquantifiable amounts were also found in unflavored e-liquids, making conclusion on pesticide origin difficult.

In e-vapors, only chlorpyrifos ethyl and trifluralin were detected, but were not quantifiable. In contrast, various levels of α -endosulfan, β -endosulfan, chlorpyrifos ethyl, cyhalothrin, cypermethrin and trifluralin were quantified in 3R4F smoke (Table

2). Considering the products tested, our results suggest that pesticide exposure by vaping does not represent a major risk, at least compared to smoking.

PAHs are part of principal compounds released from the tobacco combustion and many of them are classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as possibly, probably or proven carcinogenic to humans (28). Ten PAHs were detected in e-liquid samples but at low levels, mostly near or below LOQs (Table 1). Except for the F-/Nic- e-liquid, the major quantified PAH was naphthalene, classified as possibly carcinogenic to humans, with maximum concentration of 61.8 ng/mL. Kavvalakis *et al.* failed to detect PAHs in any e-liquid sample (30), while Han *et al.* reported quantifiable levels of the PAHs we analysed in a large range of products (31). All these data raise the question of the quality of e-liquid manufacture and refer to incoming regulations.

In all analysed e-vapors, we detected quantifiable amounts of naphthalene and acenaphthylene, but at 136 to 2018-fold lower concentrations than in 3R4F smoke (Table 2). In fact, we measured high concentrations of all 16 studied PAHs in 3R4F smoke, comparable to other previously published data (32). Our results are in agreement with Margham *et al.*, who reported similar observations (33), and suggest that there is no evidence for a substantial exposure to PAHs through vaping, and certainly not when compared to tobacco smoking.

According to some authors, formaldehyde, acetaldehyde or acrolein may be generated by oxidative (34) or pyrolytic (35) reactions during vaping cycles. In particular, formaldehyde, classified as carcinogenic to humans, has been described in several studies, at varying levels depending on the experimental conditions. To facilitate comparisons between published data and this study, the following reported concentrations have been converted or extrapolated into the units we used. High concentrations of formaldehyde of up to 1.4 µg/mL puff were reported by Uchiyama *et al.* who emphasized that carbonyl emissions appear only after several puffs, and varied depending on the e-cig model used (34). Hutzler *et al.* reported concentrations of up to 0.9 µg/mL puff, increasing with the decrease in the e-liquid level in the cartridge (36). Concentrations varying from 1 to 927 ng/mL puff were reported by Gillman *et al.*, depending on the battery voltage and the device used (35). Kosmider *et al.* and Geiss *et al.* respectively reported relatively lower formaldehyde concentrations, up to 24 ng/mL puff with high battery voltage (37) and from 0.5 to

33.2 ng/mL puff depending on the battery power output (38). Thus, while vaping conditions seem to strongly affect carbonyl generation, Farsalinos *et al.* highlighted that they must remain realistic. They reported that high carbonyl concentrations are only generated in “dry puff” conditions, leading to an unpleasant taste which is not desired by users (39).

In our study, with cartridges fully filled before each puff series, we found concentrations of formaldehyde and acetaldehyde close to 1 ng/mL puff for e-vapor samples (Table 2). These results are comparable with Goniewicz *et al.*, who found 0.3 to 5.3 ng/mL puff (29). No noticeable difference was observed between flavorings, except for acrolein concentrations for which the BT flavored samples gave much higher results than the other samples tested. Although the stability of acrolein may be affected by the sampling protocol used (40), this observation agrees with Khlystov and Samburova findings which suggest that flavorings and their concentrations in e-liquids could affect carbonyl emissions in e-vapors (41). While DNPH cartridges present some advantages when studying e-vapors (42), the model used was easily saturated with cigarette smoke, in part because of very high concentrations of acetaldehyde (data not shown). Concentrations of formaldehyde, acetaldehyde and acrolein in 3R4F smoke reported by Eldridge *et al.*, using the same ISO smoking regime but employing liquid traps, can be extrapolated as follows: 89, 1675 and 186 ng/mL puff, respectively (43) - concentrations that are far higher than those found in e-vapors in this study.

Our data, taken together with the highly variable published data, highlight the need to develop optimized protocols and to use controlled and realistic vaping conditions to assess carbonyl emissions by vaping.

While our analytical methods are considered reliable, we assume that vapor transfer and collection could suffer from some limitations. Due to potential adsorption or release phenomena in the smoking machine tubing or potential losses with collecting materials, collecting yields for each analyte could not be accurately determined. However, we optimized and harmonized many experimental conditions in order to minimize risks of variation and make e-vapor *versus* smoke comparison possible including specific inert tubing, consumed e-liquid mass tracking, representative vapor/smoke samples and realistic vaping/smoking conditions.

This study was designed with a few e-liquids and a single e-cigarette model in order to perform concomitant *in vitro* analyses, so the extrapolation of these results should be made with caution. Considering the ongoing toxicity assessment approach, analyses should be extended to other materials, especially to other e-cig coil designs and generations, as well as to other target compounds including tobacco specific nitrosamines or flavorings.

Conclusion

This study provides a chemical characterization of both a selection of e-liquid refills and their resultant emissions in e-vapors. Reliable analytical methods were used and emission generation and collection were optimized in order to compare both electronic and conventional cigarette emissions. Our results demonstrate on the one hand that the e-liquids we tested comply with their labelled composition and contain only a few pollutants at trace levels and, on the other hand, that their respective vapors contain fewer potentially toxic compounds than tobacco smoke, including trace elements, pesticides, PAHs and carbonyls. Considering existing operating limitations and the importance of such analyses in the assessment of e-cigarette toxicity, harmonized protocols and guidelines are clearly needed to accurately estimate consumers' chemical exposure and make the results comparable. A short-term exposure *in vitro* toxicity evaluation of e-vapors generated from the same e-liquids and in the same experimental conditions we used in the present study suggests a lower toxicity of e-vapors compared to cigarette smoke in human bronchial epithelial cells (44). These preliminary works constitute a baseline for further *in vivo* studies to allow the highly need long-term toxicity assessment of e-cig. Moreover, other investigations are also ongoing upon the influence of conditions of use of electronic cigarettes on e-vapor composition.

Funding

Analytical fees were jointly covered by Université Lille 2 and INNOVA SAS that markets the NHOSS® electronic cigarette brand: the authors themselves received no financial or other consideration from the electronic cigarette or tobacco industry.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest. While the study was partially funded by INNOVA, the company had no influence over the study design; data collection, analysis or interpretation; manuscript preparation or the decision to submit this work for publication.

References

1. WHO | Tobacco *WHO*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/> (23 March 2017).
2. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic: Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship (2013) World Health Organization. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85380/1/9789241505871_eng.pdf (8 July 2016).
3. E-cigarettes around 95% less harmful than tobacco estimates landmark review - GOV.UK. <https://www.gov.uk/government/news/e-cigarettes-around-95-less-harmful-than-tobacco-estimates-landmark-review> (23 March 2017).
4. Kandra, K.L., Ranney, L.M., Lee, J.G.L. and Goldstein, A.O. (2014) Physicians' attitudes and use of e-cigarettes as cessation devices, North Carolina, 2013. *PloS One*, **9**, e103462.
5. Pepper, J.K., McRee, A.-L. and Gilkey, M.B. (2014) Healthcare providers' beliefs and attitudes about electronic cigarettes and preventive counseling for adolescent patients. *The Journal of Adolescent Health: Official Publication of the Society for Adolescent Medicine*, **54**, 678–683.
6. Propylène-glycol (FT 226) - Fiche toxicologique - INRS. http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_226 (23 March 2017).
7. Renne, R.A., Wehner, A.P., Greenspan, B.J., Deford, H.S., Ragan, H.A., Westerberg, R.B., et al. (1992) 2-Week and 13-Week Inhalation Studies of Aerosolized Glycerol in Rats. *Inhalation Toxicology*, **4**, 95–111.
8. Zhu, S.-H., Sun, J.Y., Bonnevie, E., Cummins, S.E., Gamst, A., Yin, L., et al. (2014) Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tobacco Control*, **23 Suppl 3**, iii3-9.
9. Tierney, P.A., Karpinski, C.D., Brown, J.E., Luo, W. and Pankow, J.F. (2015) Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. *Tobacco Control*, **25**, e10–e15.
10. Grana, R., Benowitz, N. and Glantz, S.A. (2014) E-cigarettes: a scientific review. *Circulation*, **129**, 1972–1986.

11. Cheng, T. (2014) Chemical evaluation of electronic cigarettes. *Tobacco Control*, **23**, ii11-ii17.
12. 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**, e57987.
13. Tayyarah, R. (2015) E-Cigarette Task Force, Technical Report, 2014 Electronic Cigarette Aerosol Parameters Study. 2015. https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/ECIG-CTR_ECigAerosolParameters-2014Study_March2015.pdf (28 July 2016).
14. Beauval, N., Howsam, M., Antherieu, S., Allorge, D., Soyez, M., Garçon, G., et al. (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.
15. Hardy, E.M., Duca, R.C., Salquebre, G. and Appenzeller, B.M.R. (2015) Multi-residue analysis of organic pollutants in hair and urine for matrices comparison. *Forensic Science International*, **249**, 6–19.
16. Grova, N., Salquère, G., Schroeder, H. and Appenzeller, B.M.R. (2011) Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, **24**, 1653–1667.
17. Peters, F.T., Drummer, O.H. and Musshoff, F. (2007) Validation of new methods. *Forensic Science International*, **165**, 216–224.
18. Pellegrino, R.M., Tinghino, B., Mangiaracina, G., Marani, A., Vitali, M., Protano, C., et al. (2012) Electronic cigarettes: an evaluation of exposure to chemicals and fine particulate matter (PM). *Annali Di Igiene: Medicina Preventiva E Di Comunità*, **24**, 279–288.
19. Breiev, K., Burseg, K.M.M., O'Connell, G., Hartungen, E., Biel, S.S., Cahours, X., et al. (2016) An online method for the analysis of volatile organic compounds in electronic cigarette aerosol based on proton transfer reaction mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, **30**, 691–697.
20. Goniewicz, M.L., Gupta, R., Lee, Y.H., Reinhardt, S., Kim, S., Kim, B., et al. (2015) Nicotine levels in electronic cigarette refill solutions: A comparative analysis of products from the U.S., Korea, and Poland. *The International Journal on Drug Policy*, **26**, 583–588.
21. Lisko, J.G., Tran, H., Stanfill, S.B., Blount, B.C. and Watson, C.H. (2015) Chemical Composition and Evaluation of Nicotine, Tobacco Alkaloids, pH, and Selected Flavors in E-Cigarette Cartridges and Refill Solutions. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, **17**, 1270–1278.

22. Goniewicz, M.L., Hajek, P. and McRobbie, H. (2014) Nicotine content of electronic cigarettes, its release in vapour and its consistency across batches: regulatory implications. *Addiction*, **109**, 500–507.
23. Flora, J.W., Meruva, N., Huang, C.B., Wilkinson, C.T., Ballentine, R., Smith, D.C., et al. (2016) Characterization of potential impurities and degradation products in electronic cigarette formulations and aerosols. *Regulatory toxicology and pharmacology*, **74**, 1–11.
24. Goniewicz, M.L., Kuma, T., Gawron, M., Knysak, J. and Kosmider, L. (2013) Nicotine levels in electronic cigarettes. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, **15**, 158–166.
25. El-Hellani, A., El-Hage, R., Baalbaki, R., Salman, R., Talih, S., Shihadeh, A., et al. (2015) Free-Base and Protonated Nicotine in Electronic Cigarette Liquids and Aerosols. *Chemical Research in Toxicology*, **28**, 1532–1537.
26. Saffari, A., Daher, N., Ruprecht, A., De Marco, C., Pozzi, P., Boffi, R., et al. (2014) Particulate metals and organic compounds from electronic and tobacco-containing cigarettes: comparison of emission rates and secondhand exposure. *Environmental Science. Processes & Impacts*, **16**, 2259–2267.
27. Pappas, R.S., Gray, N., Gonzalez-Jimenez, N., Fresquez, M. and Watson, C.H. (2016) Triple Quad-ICP-MS Measurement of Toxic Metals in Mainstream Cigarette Smoke from Spectrum Research Cigarettes. *Journal of Analytical Toxicology*, **40**, 43–48.
28. IARC Monographs- Classifications. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> (28 July 2016).
29. Goniewicz, M.L., Knysak, J., Gawron, M., Kosmider, L., Sobczak, A., Kurek, J., et al. (2014) Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tobacco control*, **23**, 133–139.
30. Kavvalakis, M.P., Stivaktakis, P.D., Tzatzarakis, M.N., Kouretas, D., Liesivuori, J., Alegakis, A.K., et al. (2015) Multicomponent analysis of replacement liquids of electronic cigarettes using chromatographic techniques. *Journal of Analytical Toxicology*, **39**, 262–269.
31. Han, S., Chen, H., Zhang, X., Liu, T. and Fu, Y. (2016) Levels of Selected Groups of Compounds in Refill Solutions for Electronic Cigarettes. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, **18**, 708–714.
32. Wang, X., Wang, Y., Qin, Y., Ding, L., Chen, Y. and Xie, F. (2015) Sensitive and selective determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke using a graphene-coated solid-phase microextraction fiber prior to GC/MS. *Talanta*, **140**, 102–108.
33. Margham, J., McAdam, K., Forster, M., Liu, C., Wright, C., Mariner, D., et al. (2016) Chemical Composition of Aerosol from an E-Cigarette: A Quantitative

Comparison with Cigarette Smoke. *Chemical Research in Toxicology*, **29**, 1662–1678.

34. 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. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, **32**, 549–555.
35. 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.
36. Hutzler, C., Paschke, M., Kruschinski, S., Henkler, F., Hahn, J. and Luch, A. (2014) Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarettes. *Archives of Toxicology*, **88**, 1295–1308.
37. Kosmider, L., Sobczak, A., Fik, M., Knysak, J., Zaciera, M., Kurek, J., et al. (2014) Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: effects of nicotine solvent and battery output voltage. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, **16**, 1319–1326.
38. 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.
39. 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.
40. Uchiyama, S., Inaba, Y. and Kunugita, N. (2010) Determination of acrolein and other carbonyls in cigarette smoke using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography. A*, **1217**, 4383–4388.
41. Khlystov, A. and Samburova, V. (2016) Flavoring Compounds Dominate Toxic Aldehyde Production during E-Cigarette Vaping. *Environmental Science & Technology*, **50**, 13080–13085.
42. Bansal, V. and Kim, K.-H. (2016) Review on quantitation methods for hazardous pollutants released by e-cigarette (EC) smoking. *Trends in Analytical Chemistry*, **78**, 120–133.
43. 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.
44. Anthérieu, S., Garat, A., Beauval, N., Soyez, M., Allorge, D., Garçon, G., et al. (2017) Comparison of cellular and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. *Toxicology in vitro* DOI: 10.1016/j.tiv.2016.12.015.

Tables

Table 1 Chemical analysis of e-liquids.

	Compounds	LOQ (sample)	F-/Nic-	F-/Nic+	BT/Nic-	BT/Nic+	CM/Nic-	CM/Nic+
Constituents (mg/mL)	Nicotine	2	~	15.8	~	16.0	~	15.9
	Propylene glycol	31.25	613	634	588	639	598	541
	Glycerol	12.5	307	341	307	306	314	302
	Ethylene glycol	62.5	~	~	~	~	~	~
Trace elements (ng/mL)	Aluminum (Al)	4	12	15	11	11	10	11
	Antimony (Sb)	0.1	1.5	1.5	1.2	1.2	1.3	1.4
	Arsenic (As)	1	1.5	1.5	~	~	~	~
	Beryllium (Be)	0.1	~	~	~	~	~	~
	Cadmium (Cd)	0.4	~	~	~	~	~	~
	Chromium (Cr)	3.7	4.1	4.6	4.6	4.7	7.7	5.5
	Cobalt (Co)	0.1	0.27	0.22	~	~	~	~
	Copper (Cu)	20	~	~	~	~	32	25
	Lead (Pb)	1	~	~	~	~	~	~
	Manganese (Mn)	1.6	3.1	3.3	~	~	~	~
	Mercury (Hg)	4	~	~	~	~	~	~
	Nickel (Ni)	16	~	~	~	~	~	~
	Thallium (Tl)	0.1	~	~	~	~	~	~
	Vanadium (V)	0.4	0.64	0.44	~	~	~	~
Zinc (Zn)	200	~	~	~	~	~	~	
Pesticides ^a (pg/mL)	Chlorpyrifos ethyl	20	~	~	32.1	~	66.3	46.0
	Trifluralin	20	~	~	~	~	25.3	24.7
PAHs ^a (ng/mL)	Acenaphthene	0.20	~	~	0.52	1.12	~	0.43
	Acenaphthylene	0.02	~	0.03	0.03	0.03	~	0.05
	Benzo[a]pyrene	0.02	~	~	~	~	~	0.02
	Benzo[b]fluoranthene	0.02	~	0.02	~	~	~	0.03
	Benzo[g,h,i]perylene	0.05	~	~	~	~	~	0.07
	Chrysene	0.02	0.02	0.02	~	~	~	0.03
	Fluoranthene	0.05	0.05	0.06	~	~	0.09	0.08
	Fluorene	0.20	0.29	0.43	~	0.47	0.21	0.57
	Naphthalene	0.20	~	19.1	18.9	61.8	4.24	32.8
	Phenanthrene	0.20	3.45	3.83	2.66	2.43	3.53	3.81

“~”: < Limit of quantification, “F-”: unflavored e-liquid, “BT”: blond tobacco flavored e-liquid, “CM”: chlorophyll mint flavored e-liquid, “Nic-”: e-liquid without nicotine, “Nic+”: e-liquid with 16 mg/mL nicotine. ^a Are only presented compounds which were quantified in at least one sample.

Table 2 Chemical analysis of e-cig/3R4F emissions.

	Compounds	LOQ (e-vapors)	F-/Nic-	F-/Nic+	BT-/Nic-	BT-/Nic+	CM-/Nic-	CM-/Nic+	LOQ (smoke)	3R4F
Constituents (µg/mL puff^a)	Nicotine	0.0038	~	0.55 ± 0.033	~	0.56 ± 0.012	~	0.30 ± 0.036	0.0119	1.03 ± 0.024
	Propylene glycol	3.0	17.2 ± 2.7 ^b	22.8 ± 0.4	21.0 ± 0.4	22.0 ± 0.3	16.1 ± 1.5	10.0 ± 1.4	9.3	~
	Glycerol	2.4	12.3 ± 2.2	15.7 ± 0.5	12.2 ± 0.6	12.9 ± 0.3	10.3 ± 0.8	7.1 ± 1.1	7.4	~
	Ethylene glycol	5.9	~	~	~	~	~	~	18.6	~
Trace elements^c (pg/mL puff)	Antimony (Sb)	0.11	0.47 ± 0.30	0.28 ± 0.17	0.19 ± 0.09	~	0.14 ± 0.01	~	0.36	~
	Arsenic (As)	0.23	~	~	~	~	~	~	0.71	4.21 ± 0.18
	Cadmium (Cd)	0.02	~	0.04 ± 0.01	~	~	0.14 ± 0.05	~	0.07	44.98 ± 1.90
	Chromium (Cr)	2.1	~	3.4 ± 0.6	3.3 ± 0.5	2.9 ± 0.7	~	~	6.6	~
	Lead (Pb)	0.23	1.2 ± 0.4	1.3 ± 0.8	1.6 ± 0.5	1.0 ± 0.2	~	~	0.71	16.5 ± 0.6
	Thallium (Tl)	0.06	~	~	~	~	~	~	0.18	1.02 ± 0.14
Pesticides^c (pg/mL puff)	Chlorpyrifos ethyl	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	0.9
	Cyhalothrin	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	0.9
	Cypermethrin	0.38	~	~	~	~	~	~	1.19	2.4
	Trifluralin	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	7.3
	α-endosulfan	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	2.2
	β-endosulfan	0.19	~	~	~	~	~	~	0.60	8.7
PAHs (pg/mL puff)	Acenaphthene	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	92.2
	Acenaphthylene	0.09	0.21	0.30	0.19	0.37	0.24	0.25	0.30	384
	Anthracene	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	106
	Benz[a]anthracene	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	22.6
	Benzo[a]pyrene	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	17.4
	Benzo[b]fluoranthene	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	9.90
	Benzo[g,h,i]perylene	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	14.5
	Benzo[k]fluoranthene	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	11.1
	Chrysene	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	33.0
	Dibenz[a,h]anthracene	0.19	~	~	~	~	~	~	0.60	1.15
	Fluoranthene	0.19	~	~	~	~	~	~	0.60	117
	Fluorene	0.09	~	~	~	~	~	~	0.30	367
	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.19	~	~	~	~	~	~	0.60	7.51
	Naphthalene	0.47	2.39	4.01	1.79	4.10	1.84	3.07	1.49	561
	Phenanthrene	0.19	~	~	~	~	~	~	0.60	289
	Pyrene	0.19	~	~	~	~	~	~	0.60	115
Carbonyls (ng/mL puff)	Acetaldehyde	0.05	0.44 ± 0.12	0.40 ± 0.10	0.16 ± 0.08	0.48 ± 0.33	0.76 ± 0.59	0.96 ± 0.25		1675 ^d
	Acrolein	0.05	~	0.17 ± 0.05	2.11 ± 0.39	1.72 ± 0.41	0.11 ± 0.15	~		186 ^d
	Formaldehyde	0.05	0.95 ± 0.40	0.70 ± 0.09	0.37 ± 0.02	0.78 ± 0.48	1.29 ± 0.88	1.48 ± 0.32		89 ^d

“~”: < Limit of quantification, “F-”: unflavored e-liquid, “BT”: blond tobacco flavored e-liquid, “CM”: chlorophyll mint flavored e-liquid, “Nic-”: e-liquid without nicotine, “Nic+”: e-liquid with 16 mg/mL nicotine, “3R4F”: Kentucky 3R4F standard reference cigarettes (Lexington, Ky; <https://ctrp.uky.edu/>). ^a Results are presented in mass of analyte per milliliter of emission (/mL puff). ^b Results are presented as mean +/- standard deviation of triplicate experiments, when available. ^c Are only presented compounds which were quantified or higher than experimental blanks in at least one sample. ^d Extrapolated values from Eldridge et al. (43)

Supplementary data

Materials and methods, additional details

a. Trace elements

Exhaustive list of trace elements analysed: aluminum (Al), arsenic (As), beryllium (Be), cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), mercury (Hg), manganese (Mn), nickel (Ni), lead (Pb), antimony (Sb), thallium (Tl), vanadium (V) and zinc (Zn).

b. Pesticides

Some pesticides were analysed with direct injection according the following protocol. An aliquot of 500 μL of e-liquid supplemented with 5 μL of ISTD solution and 1.5 mL of 1 M phosphate buffer at pH 7 was extracted twice with 2 mL of a mixture of acetonitrile-cyclohexane-ethyl acetate (1:1:1, v/v/v). After evaporation to dryness of the organic phase, the residue was resuspended in 200 μL of ethyl acetate and transferred into a 200 μL glass insert. The sample was dried again and the wet residue was removed by adding a supplemental liquid-liquid extraction with n-hexane (100 μL). After vortex agitation, the organic layer was collected and dried under nitrogen flow. The final residue was reconstituted in 20 μL ethyl acetate for direct liquid injection analysis. Concerning the preparation of methanolic extracts, no liquid-liquid extraction was necessary and the procedure was as follows: a volume of 500 μL of sample supplemented with 5 μL of ISTD solution was evaporated to dryness, resuspended in 200 μL of ethyl acetate, transferred in a glass insert, dried again and

reconstituted with 20 μ L of ethyl acetate for liquid injection into gaz chromatograph system.

Exhaustive list of pesticides analysed: aldrin, chlorpyrifos ethyl, chlorpyrifos methyl, cis-chlordane, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin, diazinon, dieldrin, diflufenican, endrin, fenvalerate, fipronil, fipronil sulfone, heptachlor, heptachlor-endo-epoxide, heptachlor-exo-epoxide, hexachlorobenzene (HCB), isodrin, malathion, o,p'-dichlorodiphenyldichloroethane (o,p'-DDD), o,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (o,p'-DDE), o,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane (o,p'-DDT), oxadiazon, oxy-chlordane, p,p'-dichlorodiphenyldichloroethane (p,p'-DDD), p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE), p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane (p,p'-DDT), parathion ethyl, parathion methyl, permethrin, polybromodiphenylether 47 (BDE 47), polybromodiphenylether 99 (BDE 99), polybromodiphenylether 100 (BDE 100), polybromodiphenylether 153 (BDE 153), polybromodiphenylether 154 (BDE 154), polychlorobiphenyle 101 (PCP 101), polychlorobiphenyle 138 (PCP 138), polychlorobiphenyle 153 (PCP 153), polychlorobiphenyle 180 (PCP 180), propiconazole, trans-chlordane, trifluralin, α -endosulfan, α -hexachlorocyclohexane (α -HCH), β -endosulfan, β -hexachlorocyclohexane (β -HCH), γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH), δ -hexachlorocyclohexane (δ -HCH), ϵ -hexachlorocyclohexane (ϵ -HCH).

Limits of quantification are presented in Table S1.

c. PAHs

Exhaustive list of PAH analysed: naphthalene, acenaphtylene, acenaphthene, fluorine, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene,

chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, indeno[1,2,3-cd]pyrene, dibenz[a,h]anthracene, benzo[g,h,i]perylene.

d. Experimental blanks

Experimental blank concentrations were evaluated for each experiment using the same protocols as for e-vapors without any e-cig connected to the smoking machine inlet (Table S2). E-vapor and/or smoke concentrations which were comparable to blank concentrations, were considered as probable contamination from collecting or storage materials.

Table S1 Limits of quantification of pesticides in e-vapor and 3R4F smoke (expressed as pg/mL puff)

Pesticides	LOQ (e-vapor)	LOQ (3R4F)
α -HCH	0.09	0.30
β -HCH	0.95	2.98
γ -HCH	0.09	0.30
δ -HCH	0.95	2.98
ϵ -HCH	0.95	2.98
o,p'-DDE	0.95	2.98
p,p'-DDE	0.95	2.98
o,p'-DDD	0.95	2.98
p,p'-DDD	0.95	2.98
o,p'-DDT	0.95	2.98
p,p'-DDT	0.95	2.98
Aldrin	0.19	0.60
Isodrin	0.95	2.98
Dieldrin	0.95	2.98
Endrin	0.95	2.98
α -endosulfan	0.09	0.30
β -endosulfan	0.19	0.60
Heptachlor	0.19	0.60
Heptachlor-exo-epoxide	0.19	0.60
Heptachlor-endo-epoxide	0.19	0.60
trans-chlordane	0.09	0.30
cis-chlordane	0.09	0.30
oxy-chlordane	0.09	0.30
HCB	0.09	0.30
Diazinon	1.89	5.95
Chlorpyrifos methyl	3.79	11.90
Chlorpyrifos ethyl	0.09	0.30
Parathion methyl	0.19	0.60
Parathion ethyl	0.09	0.30
Malathion	1.89	5.95
Cyhalothrine	0.09	0.30
Permethrine	4.73	14.88
Cypermethrine	0.38	1.19
Fenvalerate	0.28	0.89
Deltamethrine	3.79	11.90
PCB101	1.89	5.95
PCB 153	0.09	0.30
PCB 138	0.19	0.60
PCB 180	0.09	0.30
Propiconazole	3.79	11.90
BDE 47	1.89	5.95
BDE 100	0.95	2.98
BDE 99	0.95	2.98
BDE 154	0.95	2.98
BDE 153	1.89	5.95
Trifluraline	0.09	0.30
Oxadiazon	0.95	2.98
Fipronil	0.95	2.98
Fipronil sulfone	0.95	2.98
Diflufenican	1.89	5.95

Table S2 Experimental blank concentrations

	Compounds	LOQ (per mL puff)	Experimental blank (per mL puff)	LOQ (per puff)	Experimental blank (per puff)
Constituents (µg)	Nicotine	0.0038	~	0.208	~
	Propylene glycol	3.0	~	163	~
	Glycerol	2.4	~	130	~
	Ethylene glycol	5.9	~	326	~
Trace elements (pg)	Antimony (Sb)	0.11	~	6.25	~
	Arsenic (As)	0.23	~	12.5	~
	Cadmium (Cd)	0.02	~	1.25	~
	Chromium (Cr)	2.1	~	116	~
	Lead (Pb)	0.23	1.7 ± 1.6 ^a	12.5	93.9 ± 85.3
	Thallium (Tl)	0.06	~	3.1	~
Pesticides (pg)	Chlorpyrifos ethyl	0.09	~	5.21	~
	Cyhalothrin	0.09	~	5.21	~
	Cypermethrin	0.38	~	20.8	~
	Trifluralin	0.09	~	5.21	~
	α-endosulfan	0.09	~	5.21	~
	β-endosulfan	0.19	~	10.4	~
PAHs (pg)	Acenaphthene	0.09	~	5.21	~
	Acenaphthylene	0.09	~	5.21	~
	Anthracene	0.09	~	5.21	~
	Benz[a]anthracene	0.09	~	5.21	~
	Benzo[a]pyrene	0.09	~	5.21	~
	Benzo[b]fluoranthene	0.09	~	5.21	~
	Benzo[g,h,i]perylene	0.09	~	5.21	~
	Benzo[k]fluoranthene	0.09	~	5.21	~
	Chrysene	0.09	~	5.21	~
	Dibenz[a,h]anthracene	0.19	~	10.4	~
	Fluoranthene	0.19	~	10.4	~
	Fluorene	0.09	0.2	5.21	10.7
	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.19	~	10.4	~
	Naphthalene	0.47	1.1	26.0	61.3
Phenanthrene	0.19	0.6	10.4	35	
Pyrene	0.19	~	10.4	~	
Carbonyls (ng)	Acetaldehyde	0.05	~	2.60	~
	Acrolein	0.05	~	2.60	~
	Formaldehyde	0.05	~	2.60	~

Experimental blank concentrations were evaluated using the same protocols as for e-vapors without any e-cig connected to the smoking machine inlet. “~”: < Limit of quantification, ^a Results are presented as mean +/- standard deviation of triplicate experiments.

Table S3 Analytical method parameters

	Nicotine in e-liquid (GC-FID)	Nicotine in extracts (UPLC-MS/MS)	Propylene glycol (GC-MS/MS)	Ethylene glycol (GC-MS/MS)	Glycerol (GC-MS/MS)	Trace elements in e-liquid (ICP-MS)	Trace elements in extracts (ICP-MS)	Carbonyls in extracts (HPLC-DAD) ^a
Linearity	0.5 - 40 mg/mL	10 - 2000 ng/mL	31.25 - 5000 µg/mL	62.5 - 5000 µg/mL	12.5 - 100 µg/mL	0.005 – 1.392 to 1 – 1500 ng/mL	0.002 – 1.392 to 1 – 1500 ng/mL	50 – 3000 ng/mL
LOD (n=10)	No signal from blank	0.45 ng/mL	0.9 µg/mL	5.1 µg/mL	0.3 µg/mL	Assimilated to LLOQ	Assimilated to LLOQ	17 ng/mL
LLOQ (n=6)	0.5 mg/mL (CV 0.9 %)	10 ng/mL	31.25 µg/mL (CV 5.1 %)	62.5 µg/mL (CV 0.9 %)	12.5 µg/mL (CV 4.9 %)	0.005 – 10 ng/mL	0.002 – 5 ng/mL	50 ng/mL
Repeatability (n=6)	3.2 %	2.1 %	8.2 %	7.1 %	7.5 %	2.1 – 9.4 %	1.6 – 7.7 %	0.2 %
Intermediate precision (n=6)	0.7 %	3.0 %	2.6 %	8.4 %	4.7 %	4.0 – 14.3 %	0.9 – 10.2 %	0.5 %
Accuracy (n=6)	96.6 %	100.4 %	99.4 %	94.0 %	91.7 %	90.6 – 111.3 %	95.0 – 109.8 %	100.4 – 103.4 %

^a“LOD”: limit of detection; “LLOQ”: lower limit of quantification. ^a Data are given for formaldehyde and acetaldehyde; acrolein was quantified with the same method, though validation data are not available.

Table S4 Chemical analysis of e-cig/3R4F emissions related to one puff.

	Compounds	LOQ (e-vapors)	F-/Nic-	F-/Nic+	BT/Nic-	BT/Nic+	CM/Nic-	CM/Nic+	LOQ (smoke)	3R4F
Constituents (µg/puff^a)	Nicotine	0.208	~	30.3 ± 1.8	~	30.8 ± 0.7	~	16.5 ± 2.0	0.416	36.1 ± 0.84
	Propylene glycol	163	946 ± 149 ^b	1254 ± 22.0	1155 ± 22.0	1210 ± 16.5	886 ± 82.5	550 ± 77.0	326	~
	Glycerol	130	677 ± 121	864 ± 27.5	671 ± 33.0	710 ± 16.5	567 ± 44.0	391 ± 60.5	260	~
	Ethylene glycol	326	~	~	~	~	~	~	652	~
Trace elements^c (pg/puff)	Antimony (Sb)	6.25	25.9 ± 16.5	15.4 ± 9.4	10.5 ± 5.0	~	7.7 ± 0.6	~	12.5	~
	Arsenic (As)	12.5	~	~	~	~	~	~	25	147 ± 6.3
	Cadmium (Cd)	1.25	~	2.2 ± 0.6	~	~	7.7 ± 2.8	~	2.5	1574 ± 66.5
	Chromium (Cr)	116	~	185 ± 32.5	183 ± 26.4	158 ± 36.3	~	~	232	~
	Lead (Pb)	12.5	64.6 ± 21.6	71.5 ± 46.4	86.7 ± 28.2	56.3 ± 8.5	~	~	25	578 ± 20.7
	Thallium (Tl)	3.1	~	~	~	~	~	~	6.2	35.7 ± 4.9
Pesticides^c (pg/puff)	Chlorpyrifos ethyl	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	31.5
	Cyhalothrin	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	31.5
	Cypermethrin	20.8	~	~	~	~	~	~	41.6	84.0
	Trifluralin	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	256
	α-endosulfan	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	77.0
	β-endosulfan	10.4	~	~	~	~	~	~	20.8	305
PAHs (pg/puff)	Acenaphthene	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	3227
	Acenaphthylene	5.21	11.6	16.5	10.5	20.4	13.2	13.8	10.4	13440
	Anthracene	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	3710
	Benz[a]anthracene	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	791
	Benzo[a]pyrene	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	609
	Benzo[b]fluoranthene	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	347
	Benzo[g,h,i]perylene	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	508
	Benzo[k]fluoranthene	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	389
	Chrysene	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	1155
	Dibenz[a,h]anthracene	10.4	~	~	~	~	~	~	20.8	40.3
	Fluoranthene	10.4	~	~	~	~	~	~	20.8	4095
	Fluorene	5.21	~	~	~	~	~	~	10.4	12845
	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	10.4	~	~	~	~	~	~	20.8	263
	Naphthalene	26.0	131	221	98.5	226	101	169	52.0	19635
	Phenanthrene	10.4	~	~	~	~	~	~	20.8	10115
	Pyrene	10.4	~	~	~	~	~	~	20.8	4025
Carbonyls (ng/puff)	Acetaldehyde	2.60	24.2 ± 6.6	22.0 ± 5.5	8.8 ± 4.4	26.4 ± 18.2	41.8 ± 32.5	52.8 ± 13.8		53908 ^d
	Acrolein	2.60	~	9.4 ± 2.8	116.1 ± 21.5	94.6 ± 22.6	6.1 ± 8.3	~		6000 ^d
	Formaldehyde	2.60	52.3 ± 22.0	38.5 ± 5.0	20.4 ± 1.1	42.9 ± 26.4	71.0 ± 48.4	81.4 ± 17.6		2874 ^d

“~”: < Limit of quantification, “F-”: unflavored e-liquid, “BT”: blond tobacco flavored e-liquid, “CM”: chlorophyll mint flavored e-liquid, “Nic-”: e-liquid without nicotine, “Nic+”: e-liquid with 16 mg/mL nicotine, “3R4F”: Kentucky 3R4F standard reference cigarettes (Lexington, Ky; <https://ctcp.uky.edu/>). ^a Results are presented in mass of analyte per 1 puff of 55 or 35 mL for e-vapors and 3R4F smoke, respectively. ^b Results are presented as mean +/- standard deviation of triplicate experiments, when available. ^c Are only presented compounds which were quantitated or higher than experimental blanks in at least one sample. ^d Extrapolated values from Eldridge et al. (18)

4. Influence des conditions de génération de bouffées sur la composition des e-vapeurs en composés carbonylés

4.1. Objectifs

A la suite des travaux précédents, les investigations se sont orientées vers l'étude de l'impact des conditions de vapotage sur la composition chimique des e-vapeurs. Voulant tester un certain nombre de conditions, il nous est apparu pertinent de restreindre cette étude à l'analyse d'une classe de composés d'intérêt toxicologique dans le contexte du vapotage, à savoir les composés carbonylés.

D'après la littérature, leurs concentrations dans les e-vapeurs varient considérablement, de quelques ng/bouffée jusqu'à quelques centaines de µg/bouffée [94]. En outre, l'influence de plusieurs paramètres sur l'émission/génération de composés carbonylés a été mise en évidence : la température de chauffe au cours du vapotage (en partie liée à la puissance appliquée par la batterie à la résistance) [46,50,59,95], l'architecture du cartomiseur [50], le niveau de remplissage du réservoir [43], les constituants principaux de l'e-liquide [46] et la composition en arômes [96] semblent notamment impliqués. Cependant, peu d'études se sont attachées à évaluer jusqu'à présent l'impact du profil d'aspiration sur l'émission et/ou la génération de composés carbonylés au décours du vapotage.

Ces travaux ont donc eu pour objectif principal de déterminer l'impact du profil de vapotage sur la composition des e-vapeurs en composés carbonylés et ainsi de tenter d'estimer sa part dans les différences de concentrations observées dans la littérature. De plus, ces travaux ont cherché à mettre en évidence des profils d'aspiration particuliers émettant et/ou générant davantage de composés carbonylés.

D'autres paramètres comme la température des e-vapeurs et le modèle de cigarette électronique ont aussi été étudiés dans le but d'estimer expérimentalement le réalisme des conditions testées.

4.2. Composés carbonylés et cigarette électronique

Les composés carbonylés sont d'intérêt toxicologique majeur. Plusieurs d'entre eux, incluant le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acétone, l'acroléine et le

propionaldéhyde, sont irritants pour les muqueuses et les voies respiratoires [97–101]. Les effets du formaldéhyde, notamment, sont concentration-dépendants et une intoxication systémique peut conduire à des complications digestives, respiratoires et neurologiques. Il est par ailleurs classé I selon le CIRC [97].

Il a été montré que le glycérol pouvait se « fragmenter » sous l'effet de températures élevées (de 650 à 900 °C, températures atteintes lors de la combustion du tabac) et former des espèces carbonylées à courte chaîne [102–104]. La pyrolyse du propylène glycol à 527 °C, menant à la formation d'acétone et de propionaldéhyde (par l'intermédiaire de la formation d'oxyde de propylène), a aussi été décrite [105]. Dans des travaux récents, Geiss *et al.* (2016) ont mesuré la température en fonctionnement de la résistance chauffante « sèche » d'un modèle d'e-cigarette allant de 380 à 950 °C pour des puissances paramétrées de 5 à 25 W, respectivement [95]. Lorsque la résistance est en contact avec le tissu imbibé d'e-liquide (utilisation normale), les températures mesurées diminuent entre environ 120 et 320 °C pour les mêmes puissances étudiées et ont tendance à augmenter avec le nombre de bouffées consécutives. En considérant donc les conditions particulières de vaporisation du propylène glycol et du glycérol dans une e-cigarette et les potentiels phénomènes de surchauffe pouvant survenir de manière localisée à proximité de la résistance chauffante, il semble raisonnable de penser que ces deux molécules peuvent, dans certaines conditions, entraîner la formation de composés carbonylés lors du vapotage. C'est le postulat qu'avancent plusieurs auteurs [43,51,59,106]. Les mécanismes de génération proposés sont des réactions d'oxydation [54] ou de pyrolyse [50] du propylène glycol et du glycérol. De plus, l'arôme de l'e-liquide pourrait aussi être une source de carbonylés : le benzaldéhyde ferait partie de la composition d'arômes aux saveurs fruitées [107] et la décomposition thermique des arômes pourrait aussi générer des composés comme le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acroléine ou le propionaldéhyde [96].

De ces observations découlent un certain nombre de questions : Quels facteurs influent sur la génération des composés carbonylés pendant le vapotage ? Peut-on comparer les différentes données publiées issues de travaux utilisant des protocoles de génération d'e-vapeurs différents ? Peut-on et doit-on harmoniser les protocoles d'études ? A quel niveau le consommateur est-il exposé ? Peut-on anticiper et agir pour diminuer l'exposition du consommateur ? Ces questions trouvent réponse, au moins partiellement, dans l'analyse physicochimique des e-vapeurs.

4.3. Principe de l'étude

L'impact du profil de vapotage sur la composition en composés carbonylés des e-vapeurs a été étudié sur les modèles de 2^{ème} (Lounge) et 4^{ème} (Mod Box TC) générations. La machine à fumer a été paramétrée selon **sept profils d'aspiration différents**, basés sur le profil de référence recommandé par le CORESTA, avec un des trois paramètres-clés augmenté ou diminué (volume de bouffée, durée de bouffée ou fréquence des bouffées – Tableau 9). Les autres conditions de vapotage ont été fixées pour diminuer au maximum le nombre de facteurs de variabilité et ainsi faciliter l'interprétation des données. Notamment, un seul e-liquide a été étudié : saveur menthe chlorophylle avec 16 mg/mL de nicotine.

La consommation d'e-liquide pendant l'expérience et la température des e-vapeurs en sortie de l'embout buccal (Figure 13) ont aussi été monitorées. Ces paramètres ont été utiles à l'interprétation des concentrations de carbonylés et à l'évaluation du réalisme de l'expérience.

Tableau 9. Profils de vapotage étudiés

	Volume (mL)	Durée (s)	Fréquence (min ⁻¹)
CORESTA	55	3	2
PV-	35	3	2
PV+	100	3	2
PD-	55	2	2
PD+	55	6	2
PF-	55	3	1
PF+	55	3	4.3

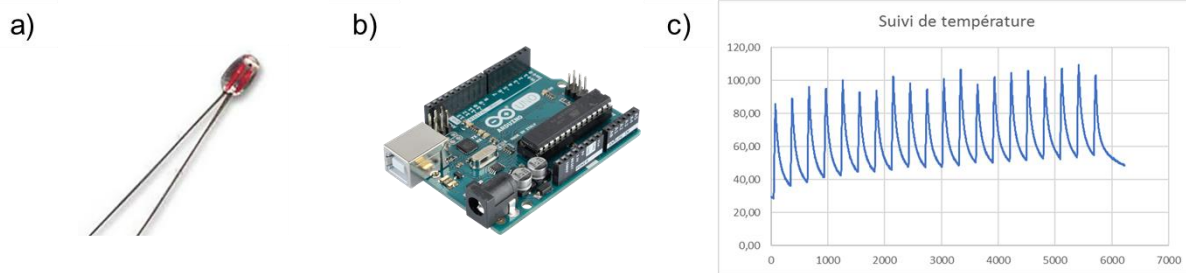


Figure 13. Matériel ayant servi au monitoring de la température des e-vapeurs en sortie d'embout buccal de cigarette électronique.
 a) Thermistance. b) Puce électronique Arduino. c) Exemple du suivi de température sur une série de 20 bouffées : [°C] en abscisse et [s] en ordonnée.
 D'après <https://3delectroshop.fr> et <https://www.reichelt.com>

Les composés carbonylés ont été recueillis par 2 cartouches de gel de silice imprégnée de DNPH, élués chimiquement puis analysés par HPLC-UV (Figure 14). La technique utilisée dans ces conditions permet de doser le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acétone, l'acroléine, le propionaldéhyde, la méthylvinylcétone, le crotonaldéhyde, la méthyléthylcétone, le butyraldéhyde, le benzaldéhyde, le glyoxal, l'isovaléraldéhyde, le méthylglyoxal, le 2,5-diméthylbenzaldéhyde et l'hexaldéhyde. Sur ces 15 composés, seuls le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acétone, l'acroléine, le propionaldéhyde et le méthylglyoxal, ont été retrouvés dans les e-vapeurs analysées.

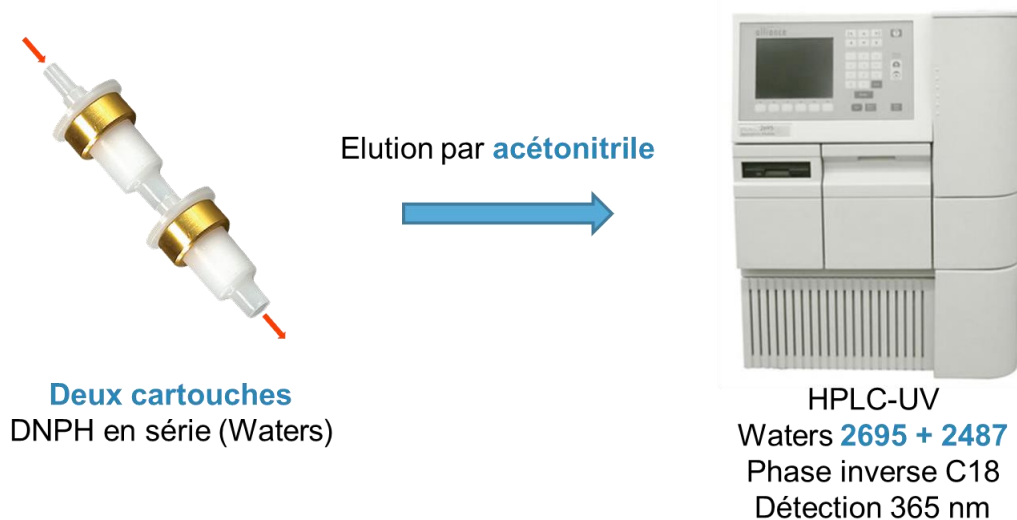


Figure 14. Méthodes de collecte et d'analyse des composés carbonylés.
 D'après <http://www.waters.com>

4.4. Des profils « moins à risque » ?

Les résultats de cette étude, issus notamment d'une analyse en composante principale, ont permis de mettre en évidence certains profils de vapotage plus à risque pour le consommateur en termes d'exposition aux composés carbonylés. Entre autres, l'augmentation du volume de la bouffée pour la Mod Box TC et de la durée de bouffée pour la Lounge ont conduit aux concentrations les plus élevées en formaldéhyde et acroléine. La confirmation de ces données par d'autres études, avec d'autres e-cigarettes et e-liquides, pourrait constituer une information importante pour le consommateur et les autorités sanitaires.

L'AFNOR a, comme pour certains ETM, proposé des valeurs limites de concentration pour certains composés carbonylés dans les e-vapeurs : 1 000 ng/bouffée pour le formaldéhyde, 16 000 ng/bouffée pour l'acétaldéhyde et 80 ng/bouffée pour l'acroléine [37]. Dans notre étude, ces niveaux ont été approchés dans certaines conditions, notamment pour l'acroléine, mais jamais dépassés. De plus, les concentrations mesurées dans cette étude, même les plus importantes, sont 10 à 2 000 fois inférieures aux concentrations des carbonylés mesurées dans la fumée de cigarette 3R4F, en fonction de la molécule et des conditions expérimentales (Tableau 10).

Tableau 10. Comparaison des concentrations en carbonylés (ng/bouffée) identifiés dans les e-vapeurs issues du e-liquide NHOSS « menthe chlorophylle » à 16 mg/mL de nicotine à celles mesurées dans la fumée de la cigarette 3R4F et rapportées par Eldridge *et al.* (2015) [61].

	Concentration moyenne maximale mesurée dans cette étude	Concentration pour une cigarette 3R4F d'après Eldridge <i>et al.</i> (2015) [61]	
		Profil ISO 3308	Profil HCl*
Formaldéhyde	255	2 874	6 811
Acétaldéhyde	364	53 908	116 509
Acétone	28	22 874	54 340
Acroléine	40	6 000	11 783
Propionaldéhyde	32	5 172	12 236
Méthylglyoxal	141	-	-

* HCl = Health Canada Intense, soit des bouffées de 55 mL, durant 2 s, toutes les 30 s ; "-" = non réalisé

Cela confirme néanmoins que le risque d'exposition des vapoteurs aux composés carbonylés est réel et doit être pris en considération, d'autant plus que des concentrations extrêmement élevées, jusqu'à 342 220 ng/bouffée de formaldéhyde par exemple, donc très supérieures aux concentrations rapportées dans la fumée de cigarette conventionnelle, ont été observées dans certaines études [50,54,59,108].

4.5. Représentativité des résultats

Le but principal de cette étude était de mettre en évidence l'impact du profil de vapotage sur la composition des e-vapeurs en composés carbonylés et d'estimer dans quelle mesure les profils de vapotage participent aux différences extrêmes observées parmi les données publiées dans la littérature. On peut toutefois aisément supposer que les différents facteurs influençant la génération de composés carbonylés, incluant la puissance de la batterie [46,50,59,95], l'architecture du cartomiseur [50], le niveau de remplissage du réservoir [43], les constituants principaux de l'e-liquide [46] et la composition en arômes [96], puissent interagir entre eux et avec le profil de vapotage. Il est par conséquent difficile de prévoir si une e-cigarette présentée comme générant plusieurs dizaines de µg/bouffée de composés carbonylés, dans des conditions considérées comme standards, donnerait des résultats comparables avec ce protocole. Ces premiers résultats suggèrent que le profil de vapotage, ne peut à lui seul expliquer les différences observées dans la littérature.

4.6. Réalisme de l'expérience

La notion de réalisme de l'expérience est un autre point de discussion important de cette étude. En effet, l'utilisation de plusieurs profils d'aspiration, avec différents modèles d'e-cigarette, n'est pertinente que si ces profils représentent des conditions réalistes de vapotage. Dans l'idéal, il faudrait disposer, pour chaque modèle/configuration d'e-cigarette, d'une gamme de profils de vapotage observés en conditions réelles sur un panel représentatif d'utilisateurs. A défaut, il s'avère que la mesure de la température de l'e-vapeur en sortie de l'embout buccal peut être, comme le préconise l'AFNOR, un bon outil pour évaluer le réalisme des conditions expérimentales.

Concrètement, les hautes températures (> 60 °C) mesurées dans cette étude, notamment pour la Mod Box TC paramétrée à 30 W, contrastent avec le fait que ces configurations ont été volontairement choisies dans la gamme basse à moyenne des recommandations du fournisseur. Ainsi, le raisonnement le plus probable est que certains profils de vapotage ne sont pas tout à fait adaptés aux configurations utilisées. Une étude de ces modèles avec des vapoteurs en conditions réelles permettrait de confirmer ce raisonnement. De plus, un humain pourrait, d'après Farsalinos *et al.* (2015), détecter des « *dry puffs* », autrement dit des bouffées générées dans des conditions jugées non réalistes provoquant une sensation désagréable en raison de la surchauffe de l'e-liquide [109]. La génération de quantités « importantes » de composés carbonylés serait associée à ces *dry puffs* selon les auteurs. A noter par exemple que les concentrations de formaldéhyde les plus faibles rapportées par Farsalinos *et al.* (2015) (370 ng/bouffée) sont supérieures aux concentrations les plus hautes mesurées dans notre étude (255 ng/bouffée).

Finalement, peut-on définir un (ou plusieurs) profil(s) de vapotage de référence ? Les résultats de cette étude confirment qu'un seul profil de référence n'est pas approprié pour tous les modèles d'e-cigarette. La définition de plusieurs profils de vapotage, rattachés à des technologies d'e-cigarette spécifiques, semble être la solution optimale. Les normes à venir (européennes et internationales) apporteront possiblement de nouveaux éléments de réponse.

4.7. Article #3

Beauval N, Verrièle M, Garat A, Fronval I, Dusautoir R, Anthérieu S, Garçon G, Lo-Guidice JM, Allorge D, Locoge N. Influence of puffing conditions on the carbonyl composition of e-cigarette aerosols. *Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2018

Influence of puffing conditions on the carbonyl composition of e-cigarette aerosols

Nicolas Beauval^{1,2}, Marie Verrièle², Anne Garat¹, Isabelle Fronva², Romain Dusautoir¹, Sébastien Anthérieu¹, Guillaume Garçon¹, Jean-Marc Lo-Guidice¹, Delphine Allorge¹, Nadine Locoge².*

¹ Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA 4483 - IMPECS - IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France

² IMT Lille Douai, Sciences de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement (SAGE), F-59508 Douai Cedex, France/Université de Lille, F-59000 Lille, France

Correspondence to:

*Nicolas Beauval

Mail: nicolas.beauval@chru-lille.fr

Phone: +33(0)3 20 44 55 61

Fax: +33(0)3 20 44 47 29

Highlights

- Carbonyl generation during vaping is influenced by puffing conditions
- Puffing regimen, device model and power supply have an impact on carbonyl generation
- Electronic cigarette devices should be studied using appropriate model-dependent puffing regimens

Keywords

Electronic cigarette, E-vapor, Carbonyls, Smoking machine, Puffing regimen.

Abstract

Owing to their harmful effects on human health, the presence of carbonyl compounds in e-cigarette aerosols raises concerns. To date, the reported concentration levels in e-vapors vary greatly between studies and several factors that markedly influence carbonyl emission during vaping have been highlighted including the heating temperature, the power supply, the device architecture, the filling level of the tank and the main e-liquid constituents. This study investigated the impact of puffing regimen parameters on the carbonyl composition of e-cigarette aerosols with the aim of: (1) better estimating the variability of carbonyl emissions depending on puffing conditions; (2) highlighting puffing profiles that increase the exposure to carbonyls; and (3) estimating to what extent puffing topography could be implied in the variability of carbonyl concentrations reported in the current literature.

E-vapors from a single e-liquid were generated from two e-cigarette models with a smoking machine. A total of 7 different puffing regimens were used to individually study the influence of the puff volume, duration and frequency. Carbonyls were collected by DNPH cartridges and analysed by HPLC-UV. E-liquid consumption and e-vapor temperature were also monitored.

E-vapor concentrations of formaldehyde, acetaldehyde, acetone, acrolein, propionaldehyde and methylglyoxal were affected, sometimes differently, by the modification of the puffing regimen, as well as by the e-cigarette model. For example, formaldehyde concentration ranged from 20 to 255 ng/puff depending on the puffing conditions. The results of principal component analyses, applied to the concentration data sets for the 6 carbonyls, suggest that the studied parameters interact and highlight some “carbonyl-emitting” combinations of concern (e-cigarette model/puffing regimen). However, the highest concentrations measured in the present study remain far lower than those observed in conventional cigarette mainstream smoke.

This study confirms that the chosen puffing regimen contributes a part of the observed variability in the carbonyl levels reported in the scientific literature, hampering comparisons between studies and making interpretation difficult. Thus, harmonized and realistic protocols for the assessment of e-cigarette toxicity by physicochemical or experimental approaches are clearly needed.

Introduction

Electronic cigarettes or “e-cigs” are battery operated devices which are marketed as healthier than conventional cigarettes. Briefly, an “e-liquid”, generally a mixture of propylene glycol, glycerol and flavourings supplemented or not with different concentrations of nicotine, is heated and vaporised into a liquid aerosol, also called “e-vapor”, which is inhaled by the user (“vaper”).

E-cig popularity and use has increased in recent years (Kasza et al., 2017; King et al., 2015). In parallel, many studies have investigated the health impact of e-cig use and particular attention has been paid to the physicochemical characterization of e-liquids (Beauval et al., 2016; Behar et al., 2014; Goniewicz et al., 2015; Han et al., 2016; Kavvalakis et al., 2015; Varlet et al., 2015), e-vapors (Beauval et al., 2017; Farsalinos et al., 2015; Flora et al., 2016; Goniewicz et al., 2014; Hutzler et al., 2014; Margham et al., 2016; Tayyarah and Long, 2014; Uchiyama et al., 2016; Williams et al., 2013) and indoor air quality after vaping (Czogala et al., 2014; Geiss et al., 2015; McAuley et al., 2012; Schober et al., 2013; Schripp et al., 2013). In addition to the analysis of the main e-liquid components, studies have performed the identification and quantification of several classes of toxic or potentially toxic compounds also emitted in tobacco mainstream smoke, including (but not limited to) carbon monoxide, volatile organic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons, tobacco-specific nitrosamines and inorganic compounds (especially heavy metals) (Burns et al., 2008; Food and Drug Administration, 2012; Liu et al., 2011). While several reports agree that global harmfulness of e-vapors is substantially lower than that of conventional cigarette smoke (Goniewicz et al., 2014; GOV UK, 2015; Margham et al., 2016; Tayyarah and Long, 2014), e-vapors are not totally free of toxic compounds (Goniewicz et al., 2014; Kosmider et al., 2014; Margham et al., 2016; Sleiman et al., 2016). Particularly, the presence of carbonyl compounds such as formaldehyde and acetaldehyde, respectively classified in groups 1 and 2B according to the International Agency for Research on Cancer (International Agency for Research on Cancer, 2016), and acrolein which is a known irritant for mucous membranes and skin (Institut National de Recherche et de Sécurité, 2015), raises concerns. Indeed, carbonyl generation was reported to occur during vaping, potentially by oxidative (Uchiyama et al., 2016) or pyrolytic (Gillman et

al., 2016) reactions of propylene glycol and glycerol, or by the thermal decomposition of flavourings (Khlystov and Samburova, 2016).

The International Organization for Standardization and the European Committee for Standardization are currently developing standards for the determination and quantification of chemical emissions from e-cigarettes (European Committee for Standardization, 2015; International Organization for Standardization, 2016). However, no reference method has been published to date. The determination of carbonyl concentrations in e-vapors is currently widely assessed by derivatization with (2,4-dinitrophenyl)hydrazine (DNPH) used in solution in impingers or impregnated in sorbent cartridges, though some other protocols have been published (Farsalinos and Gillman, 2017). A large variability exists among reported carbonyl concentrations in e-vapors from different published studies, ranging from tens of ng/puff to hundreds of $\mu\text{g/puff}$ (Table 1). Such differences were also reported in single studies (Gillman et al., 2016; Uchiyama et al., 2013). Several factors that markedly influence carbonyl generation during vaping were highlighted, such as the heating temperature (partly related to the device power supply) (Geiss et al., 2016; Gillman et al., 2016; Kosmider et al., 2014; Sleiman et al., 2016), the device architecture (Gillman et al., 2016), the filling level of the tank (Hutzler et al., 2014), the main e-liquid constituents (Kosmider et al., 2014) and the e-liquid flavouring content (Khlystov and Samburova, 2016). Considering that carbonyls are generated during the few seconds of one puff, it is likely that other factors could be involved in the aforementioned variability, especially the puff generation conditions, which frequently vary between studies (e.g. the puffing topography, the heating triggering, the coil material, the e-cig tilt or movement during use).

Ideally, e-vapor generation by a smoking machine should mimic real e-vaping. “Puffing regimens” are related to at least 3 key parameters for e-vapor generation by smoking machines: puff volume, puff duration and puff frequency. In studies of conventional cigarette emissions, several well-defined puffing regimens can be employed. For example, the ISO 3308:2012 (35 mL puff volume over 2 s every 60 s) and the Health Canada Intense (55 mL puff volume over 2 s every 30 s) regimens are usually compared (International Organization for Standardization, 2015) and can lead to very different results depending on targeted compounds (Eldridge et al., 2015). More specifically, carbonyl delivery per one puff was reported to be significantly affected by the modification of puff volume while other changes in puffing

regimen led to more minor effects (Reilly et al., 2017). Currently, and in contrast to studies of conventional cigarettes, no defined puffing regimen has been widely adopted for e-cig analyses (Table 1). Thus, differences between studies are inevitably fraught with uncertainties that hamper data comparison and interpretation. Some effects on carbonyl emissions of puff frequency (Uchiyama et al., 2016), puff volume (Margham et al., 2016) and puff duration (Sala et al., 2017) were recently reported. However, the specific impact of the modification of puffing regimen parameters, related to e-cigarette configurations, remains to be fully established.

With the aim of: (1) better estimating the variability of carbonyl emissions depending on puffing conditions; (2) highlighting puffing profiles that increase the exposure to carbonyls; and (3) estimating to what extent puffing topography could be implied in the variability of carbonyl concentrations observed in the current literature, this work investigated whether puffing regimen parameters influence carbonyl emission from 2 e-cig models using 1 e-liquid and smoking machine-assisted procedures.

Materials and methods

a. E-cigarettes and e-liquids

The experiments were performed using two models of e-cig obtained from a French manufacturer (NHOSS® brand).

The second generation “Lounge” model is equipped with 2.8 Ω nichrome top-coil and 4.6 W power supply. The heating was triggered by suction and a dedicated USB connected power supply replaced the original battery. Aiming to highlight the impact of puffing regimens on carbonyl emissions, with minimal confusing factors, only one heating coil unit was used for all the experiments.

The third generation “Mod box TC” model, used with the “Air Tank” clearomiser, is equipped with 0.5 Ω kanthal bottom-coil and configurable power supplies ranging from 7 to 50 W. An operator activated the heating pushing and maintaining the pressbutton 1 s before each puff and during the whole puff duration. Two batteries were alternated to maintain a high level of charge during all the experiments. In order to avoid an overheated environment for e-liquids, 3 tanks were alternated (1 per 1 puff series). However, only 1 heating coil was kept for all the

experiments. For this study, the Mod box TC power supply was fixed to 18 and 30 W, which correspond to low and middle range power supplies recommended by the manufacturer for suitable experience regarding the aforementioned e-cig configuration.

All the experiments were performed with nicotine containing chlorophyll mint flavoured e-liquid (obtained from the same French manufacturer as for the e-cig devices) provided in 20 mL plastic bottles and labelled as follows: propylene glycol < 65 %; glycerol < 35 %; food flavourings; 16 mg/mL nicotine.

b. E-vapor generation

E-vapors were generated with a Vitrocell® VC1 smoking machine (Vitrocell, Waldkirch, Germany). The CORESTA (Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco) square approach was used as the reference puffing regimen with 55 mL puff volume over 3 seconds, 1 puff every 30 seconds (Tayyarah, 2015). In addition, modified puffing regimens were selected according to the current literature and are summarized in Table 2. Briefly, each parameter was independently decreased and increased as follows: 35 and 100 mL puff volume (“PV-” and “PV+”, respectively), 2 and 6 seconds puff duration (“PD-” and “PD+”, respectively), 1 puff every 60 and 14 seconds (“PF-” and “PF+”, respectively).

Clearomisers were filled before each vaping session and e-liquid consumption was monitored by weighting clearomisers before and after each sampling. Before daily experiments, 40 conditioning puffs were performed on the e-cig.

c. E-vapor collection

Carbonyl compounds were collected from 3 independent and consecutive collections of 20 puffs using 2 specific silica cartridges coated with DNPH (Sep-Pak XPoSure Plus Short Cartridge 350 mg, Waters, Guyancourt, France), placed in series. Cartridges were connected to the outlet of the smoking machine exhaust so that no obstacle was positioned between the suction system and the e-cigarette. Thus, no pressure drop phenomenon nor air flow modification could occur during the experiments. The second cartridge was used to evaluate the collection efficiency. The smoking machine exhausted each puff sample over 10 seconds, thus, the

collecting flow ranged from 0.21 to 0.60 L/min for 35 and 100 mL puff volumes, respectively.

The alteration of c-cigarette components after repeated use (a charred coil for example) may affect vaporizing conditions and hence the composition of the e-vapor (Gillman et al., 2016). This e-cig “aging” over 480 puffs was monitored by performing and comparing the results of CORESTA reference puff collections at the beginning (initial CORESTA or “IC”) and at the end (final CORESTA or “FC”) of the experiments. Moreover, collections for each e-cig model/configuration were performed over a single day in order to minimize intra-model variability.

Before each daily experiment, a thorough cleaning of the Vitrocell® pumping system was performed with ethanol. Laboratory air quality and machine cleanliness were evaluated by performing experimental blank collections from 60 laboratory air puffs without any e-cig connected to the smoking machine. Daily experimental blank values were subtracted from those of respective e-vapor samples.

d. Analytical method

DNPH cartridges were desorbed with 3 mL of acetonitrile. The cartridge dead volume was taken into account by weighting the eluted acetonitrile. Twenty μL were injected into a high performance liquid chromatographic system (Waters 2695) coupled to an ultraviolet detector (Waters 2487). Chromatographic separation was achieved on a Pinnacle Ultra C18 250 mm x 4.6 mm x 5 μm (Restek, Lisses, France). The oven temperature was set at 40 °C and the mobile phase was a gradient mixture of acetonitrile, tetrahydrofuran and water with a constant flow of 1.5 mL/min over 27 min. Acquisition was performed at 365 nm wavelength.

The method allows the detection and quantification of formaldehyde (FA), acetaldehyde (AA), acetone (AO), acrolein (AC), propionaldehyde (PA), methyl vinyl ketone, crotonaldehyde, methyl ethyl ketone, butyraldehyde, benzaldehyde, glyoxal, isovaleraldehyde, methylglyoxal (MG), 2,5-dimethylbenzaldehyde and hexaldehyde with limits of detection (LOD) in acetonitrile from 3 to 5 $\mu\text{g/L}$ (or from 0.45 to 0.75 ng/puff considering a theoretical maximum elution volume of 3 mL and 20 puff series). Mean carbonyl mass per cartridge obtained after elution of non-exposed cartridges, from the same batch, were subtracted in data work up.

e. E-vapor temperature monitoring

The temperature of e-vapor, at the outlet of the e-cig drip tip, was monitored by a NTC 3950 thermistor coupled with an Arduino UNO microcontroller board (www.arduino.cc) at 10 Hz. In order not to alter puff generation during carbonyl collection, temperature measurements were performed in separate experiments, though under the same conditions.

f. Statistical analysis

Principal component analysis (PCA) and hierarchical ascendant classification (HAC) were assessed on carbonyl concentrations in e-vapor using the FactoMineR Package on R (www.R-project.org) (Lê et al., 2008).

g. Optimization of sampling procedure

The determination of carbonyl emissions in e-vapors is widely assessed by DNPH-derivatization methods using DNPH solution filled impingers and impregnated silica cartridges (Bansal and Kim, 2016). However, these materials were not fully validated for this specific matrix which differs from air or smoke in many regards (Farsalinos and Gillman, 2017).

In this study, the number of puffs for each collection was set so as to both collect representative and realistic samples and avoid analytical limitations. Preliminary experiments showed there to be strong saturation phenomena with large puff numbers (up to 96 puffs), leading to the collection of up to 73 % of the total mass of an analyte in the second DNPH cartridge for the Mod box TC model (data not shown). In fact, cartridges were full of a condensate of e-vapor which affected the collection efficiency and reproducibility of carbonyl retention in cartridges. Finally, 20 puffs was found to be the best compromise with satisfying collection efficiency, reproducibility and relevant e-cig durations of use, from 4.7 to 20 min depending on puff frequency.

Results and discussion

E-liquid consumption during vaping, e-vapor temperature at the outlet of the e-cig drip tip and carbonyl concentrations in e-vapors were measured for each puffing regimen set on the smoking machine. The CORESTA profile was chosen as the basal condition and was modified, according to puffing regimens already reported in the literature, in order to study the impact of puff volume, duration and frequency on carbonyl emission and generation.

E-liquid consumption. E-liquid consumption during vaping sessions is the first and most easily recordable parameter permitting evaluation of experimental reproducibility. Whatever the conditions, the standard deviations of 3 independent measurements of e-liquid consumption during puff series suggest the experiment reproducibility to be satisfying (Figure 1). Comparing initial vs final CORESTA collections results revealed no, or barely noticeable, differences between the beginning and the end of the vaping sessions, suggesting that the whole day experiment (480 puffs) may not cause significant device aging. Briefly, puffs from the Lounge model consumed less e-liquid than those from the Mod box TC model, while a higher power supply increased consumption. However, the interpretation of power supply must be related to the e-cig configuration: preliminary tests showed no generation of e-vapor while setting 7 W on the Mod box TC. These results are in accordance with the findings of Gillman *et al.* (Gillman et al., 2016).

Regarding the Lounge model, puff duration appears to be the main factor influencing e-liquid consumption: the longer the puff, the greater the consumption (Figure 1). The same trends were observed with the Mod box TC 18 W, though lower fluctuations were also measured varying puff volume and frequency. Increasing power supply up to 30 W strongly increased e-liquid consumption while fluctuation trends mainly remained comparable with the Mod box TC 18 W. However, increasing puff duration with 30 W did not lead to the greatest e-liquid consumption as for other conditions. This could be due to the saturation of e-liquid availability at the coil with such long puff duration.

Considering that the mass of e-liquid vaporised to generate one puff may vary by up to an order of magnitude depending on puff generation conditions (Figure 1), results expressed as mass/puff cannot provide sufficient information for data

interpretation and should be complemented with data expressed as mass/consumed amount of e-liquid. While ng/puff data represent more particularly the mass of compounds emitted during use and provide an estimate of the consumer exposure, ng/mg of consumed e-liquid data emphasises the capacity of the e-cig device to generate compounds in the conditions set. To date, relatively few data on carbonyl emission have been reported as mass/consumed amount of e-liquid, or mass/mass of total particulate matter, and even fewer have been published with both units (Farsalinos et al., 2017a, 2017b; Gillman et al., 2016; Khlystov and Samburova, 2016; Sala et al., 2017; Sleiman et al., 2016). Considering the goals of the present study, both units appear relevant for interpretation.

E-vapor temperature. High heating coil temperatures during vaporisation (usually assimilated with high power supplies) were cited several times as one of the principle factors causing carbonyl generation during vaping – the transformation of propylene glycol and glycerol being, to date, the most frequently mentioned mechanism (Geiss et al., 2016; Gillman et al., 2016; Kosmider et al., 2014; Sleiman et al., 2016). Geiss *et al.* reported that higher carbonyl concentrations were correlated with higher coil temperatures (up to 300 °C), depending on conditions (Geiss et al., 2016). Moreover, simulating e-cig vaporisation conditions using a dedicated system, Wang *et al.* reported the generation of FA, AA and AC from propylene glycol and/or glycerol under precisely controlled temperatures (≥ 215 °C) (Wang et al., 2017).

In the current study, temperature was measured at the outlet of the e-cig drip tip over a series of 20 puffs (Figure S1) which could reflect on one hand the vaporisation temperature, though indirectly, and on the other hand the e-vapor temperature experienced by the user.

For the Lounge and the Mob box TC 18W, temperature profiles were globally similar (Figure 2). Consistently, temperature profiles could be split into 2 phases: the first 5 puffs were characterised by an increase in temperature up to a relative plateau, and this remained for the following 15 puffs. Puff duration clearly affected e-vapor temperature, especially when increased (up to 100 °C with 6 s puff duration), as well as high puff frequency (up to 70 °C with 4.3 puff/s), whereas other conditions remained relatively comparable to the initial CORESTA collection. Temperatures

measured with the Mod box TC 30 W were markedly higher compared with the Lounge and the Mod box TC 18 W models (from 65 to 115 °C at the plateau).

The French national organisation for standardisation suggests that e-vapor temperatures exceeding 60 °C may not be expected by the user (Association Française de Normalisation, 2016). Hence, this parameter could be considered as an indicator of the experiment relevance and realism. Considering the plateau values for the Lounge and the Mod box TC 18 W, most conditions tested here led to e-vapor temperatures ≤ 60 °C, though these are higher than previously reported temperatures (Sleiman et al., 2016). Noticeably higher temperatures were measured with long puff duration and, to a lesser extent, with high puff frequency. The relevance of such puffing regimens could be questionable, however. While long puff durations (greater than 6 s) have already been reported in human puff topography studies (Hua et al., 2013; Robinson et al., 2015), the puff volumes associated with them were much higher than the 55 mL used in our protocol (up to 304 mL – Robinson et al., 2015). Puff frequencies have been reported as being between approximately 20 and 50 s (Cunningham et al., 2016; Robinson et al., 2015), highlighting that intensive e-cig use is also naturally observed and remains a realistic condition to study.

Temperatures observed for the Mod box TC 30 W were markedly high, seemingly higher than in real conditions. Indeed, 30 W is in the middle range of power supplies recommended by the manufacturer and is used by consumers. The Mod box TC and the associated Air tank clearomiser are among the latest generation devices, very different from the first-generation e-cigs (called “cig-a-likes”) used in the first scientific studies, and it is likely that the puffing parameters used in this study are not fully suitable for all e-cig devices, especially the newest ones. The same observation was made by Cunningham *et al.* who reported in real life observations significant differences in puff volume and puff frequency between 2 different e-cig models: a rechargeable “cig-a-like” and a larger button-activated device (Cunningham et al., 2016). Further investigations characterising puffing topography with such new generation devices and their applicability to smoking machine protocols should be carried out. In the current study, and based on our measurements of the e-vapor temperature, the Mod box TC 30 W cannot be considered as a realistic condition. However, all other parameters were set to be in accordance with normal e-cig use. Considering the actual purpose of our study, and

compared with data from the literature for which the realism of conditions used is not systematically proven (Farsalinos et al., 2017a, 2017b), this experiment was nevertheless deemed sufficiently pertinent to be retained.

Carbonyl emission/generation. Carbonyl generation has been reported to occur during vaping by different mechanisms (Gillman et al., 2016; Khlystov and Samburova, 2016; Uchiyama et al., 2016) and variable concentration levels, sometimes differing by several orders of magnitude, have been reported in scientific literature (Table 1). Considering the large variability of tested devices, conditions of use, and methods of collection and analysis, it is unclear to what extent these values are comparable and can thereafter be used to assess user exposure.

In our experimental conditions, FA, AA, AO, AC, PA and MG were quantified in almost all samples whereas the levels of the other targeted carbonyl compounds were not different from those of the experimental blanks. The concentrations of FA, AA, AO, AC, PA and MG are reported in ng/puff and ng/mg of consumed e-liquid in Figure 3. Regarding the whole experiments, initial and final CORESTA results were comparable for almost all conditions, compounds and units. Only some slight variations were observed with FA and MG, so device aging was considered negligible. A maximum of 2.2 % of the total collected mass of AA, AC and PA was quantified in the second DNPH cartridge, whatever the e-cig or the puffing regimen used, suggesting the collection of these compounds to be nearly total. However, the collection efficiency of FA, AO and MG was differently affected depending on experimental conditions, especially the e-cig model: the average proportions of the carbonyl mass collected on the second cartridge for the Lounge, the 18 W and the 30 W Mod box TC models were of 19.6, 5.5 and 6.4 % for FA, of 15.7, 1.9 and 0.7 % for AO and of 31.1, 11.2 and 8.2 % for MG, respectively. Thus, we observed in these conditions some cartridge breakthrough even with ng/puff concentrations that are far lower than some already reported carbonyl levels (Table 1). Considering that the mass of consumed e-liquid during vaping was generally lower with the Lounge model compared to Mod Box TC models (Figure 1), these results contrast with the aforementioned observation that the mass of vaporised e-liquid passing through sampling cartridges decreases their collection efficiency. Hence, under the present conditions, it is possible that collection efficiency was affected by the physical

parameters of the e-vapors, including their temperature, their particle size or their gas/particulate partition.

Although the analysis of FA, AO and MG is not fully quantitative, especially for the Lounge model, the values were obtained from a relevant and reproducible protocol. In the same way, while the confidence of AC results is limited to the performance of sorbent cartridges (Ho et al., 2011), the concentrations remain comparable with each other.

As evoked previously, data interpretation differs depending on the unit. Considering all conditions, e-vapor concentrations ranged from 20 to 255 ng/puff for FA, from 29 to 364 ng/puff for AA, from 4.4 to 28 ng/puff for AO, from “not detected” to 40 ng/puff for AC, from 1.0 to 32 ng/puff for PA and from 4.5 to 141 ng/puff for MG. These concentrations are in the lower panel of the actually reported emission levels (Table 1), below 1 µg/puff and far lower than already reported tens or hundreds of µg/puff (Gillman et al., 2016; Khlystov and Samburova, 2016; Sleiman et al., 2016; Uchiyama et al., 2016). They are also far lower than the levels measured in conventional cigarette mainstream smoke (Eldridge et al., 2015; Reilly et al., 2017). In a general manner, carbonyl concentrations in e-vapors were higher with the Mod Box TC than with the Lounge and higher with 30W than with 18 W, which is in accordance with published data (Farsalinos et al., 2015; Geiss et al., 2016; Gillman et al., 2016; Kosmider et al., 2014; Uchiyama et al., 2016, 2013). However, these trends were sometimes corrected regarding ng/mg results (Figure 3), which confirms the necessity to communicate e-liquid consumption data. Concretely, rates of carbonyl generation as a function of e-liquid consumption were in a smaller range than concentrations per puff: from 3.8 to 10 ng/mg for FA, from 9.1 to 19 ng/mg for AA, from 0.6 to 3.0 ng/mg for AO, from “not detected” to 3.3 ng/mg for AC, from 0.2 to 3.6 ng/mg for PA and from 0.8 to 5.6 ng/mg for MG. Thus, while it is obvious that e-liquid consumption influences e-vapor carbonyl concentration, the generation of some carbonyl compounds are related to puffing conditions.

Considering puffing regimens, increasing puff volume, duration and frequency could be expected to increase carbonyl-emissions, though we found this was not systematically the case and it depended upon the compound and the e-cig model (Figure 3). Interestingly, increasing puff duration and frequency displayed high

temperatures during vaping sessions compared with other conditions (Figure 2). Ogunwale *et al.* reported comparable trends with puff volume and puff duration, using a 1st generation e-cig, for FA, AA and AC (Ogunwale et al., 2017). In the present study, while carbonyl emission from the Lounge model was mainly affected by long puff duration, those from the Mod Box TC model were affected by all 3 conditions. Noticeably, higher carbonyl emissions in ng/puff were not systematically associated with the highest ng/mg generation rates. E-vapor concentrations of AC, PA, and to a lesser extent AO, were greatly increased with low puff volume and short puff duration using the Lounge model and were associated with high generation rates. Margham *et al.* also reported relatively greater concentrations of AA and AC with low puff volumes using an e-cig technologically closer to the Lounge than to the Mod Box TC, though with high variability at 35 mL puff volume (Margham et al., 2016). Our results, marked by relatively high instability, contrast with the related repeatable e-liquid consumption (Figure 1) and suggest that e-liquid consumption is not the major parameter influencing the emission of these compounds. As well, temperature is unlikely to be a major influencing parameter: the highest and most variable concentrations observed for AC, PA and AO were not systematically associated with the highest e-vapor temperatures (Figure 2). In summary, it appeared that several factors, including the puffing regimen, the heating temperature and the e-cig model, affect the emission/generation of the measured carbonyl compounds and that these factors likely interact.

In order to visually assess specific puffing conditions regarding their measured carbonyl emissions and potentially highlight the most important emitting conditions, PCA was applied to the carbonyl concentration data sets (in both ng/puff and ng/mg for the 6 identified carbonyls). PCA reduces the dimensionality of the data set into a new set of variables, named principle components (PC), and does not require previous knowledge of the data set. For each set, 2 PC (PC1 and PC2) which could explain 92 % and 74 % of the total variance respectively (Figures S2 and S3), were identified. The resulting score plots and loading plots are presented in Figures 4 and 5. The data set was separated by hierarchical cluster analysis (HCA) into clusters which are highlighted with different colours in Figures 4 and 5.

Considering ng/puff concentrations, all the 6 carbonyl concentrations are positively correlated with PC1 while PC2 seems to differentiate 2 groups of

compounds: PA, AO and AC *versus* FA, AA and MG. However, PC2 cannot be considered as highly discriminant for most of the compounds, except for PA. Briefly, the tested conditions are mainly positioned on the PC1 axis according to their carbonyl e-vapor concentrations. Most of the tested conditions are grouped in 2 clusters. While cluster 1 mostly contains Lounge and Mod Box TC 18 W conditions, thus the equivalent of the “less emitting” conditions, most of Mod Box TC 30 W conditions are grouped in cluster 2 which is mainly shifted according to PC1 axis. The two final clusters constitute 2 single conditions: high puff volume with Mod Box TC 30 W and long puff duration with Lounge, which are positively correlated with PC1 and both PCs, respectively. PC1 may be associated to power supply, e-vapor temperature, e-liquid consumption or their combination, though a clear conclusion cannot be drawn.

By contrast, ng/mg PCA shows that the generation rates of AO, AC, PA and MG are mainly related to PC1, while those of FA and AA are mainly related to PC2. Once again, most of the conditions are grouped into 2 clusters and 2 of them are highlighted into a third cluster: low puff volume and long puff duration with Lounge, which are positively correlated with PC1. These 2 conditions especially led to higher generation rates of AO, AC and PA compared with other conditions, suggesting that a favourable element may be involved. Indeed, they are characterized by low air flow during vaping, though this parameter does not seem to affect carbonyl generation with the Mod Box TC e-cig. The PCA suggests that the conditions leading to FA generation are those that generate less AA, and conversely. Regarding raw results (Figure 3), differences remain small and some exceptions exist, like low puff frequency with Lounge and long puff duration with Mod Box TC 18 W.

Finally, although definitive conclusions from this study are limited, the PCA confirms the interaction between several vaping conditions and highlights some combinations of concern, especially high puff volume with Mod Box TC 30 W and both high and low puff volumes with Lounge.

Importantly, the observations made in the present study apply to the devices and e-liquids used and do not pretend to predict to what extent other e-cig devices and e-liquids, which may emit different amounts of carbonyls, would be affected using comparable conditions. To go further, e-liquid carbonyl concentrations could be studied to estimate potential e-liquid contamination and better discriminate

generation from emission of carbonyl compounds during vaping. However, this latter point was beyond the scope of this study.

Conclusion

The results of the present study demonstrate that the modification of puffing conditions leads to significant variations in the carbonyl composition of e-cigarette aerosols. While the formaldehyde, acetone and methylglyoxal measured concentrations might be underestimated, especially for the 2nd generation e-cigarette model, these variations were observed with concentration levels in the lower panel of the literature data, far lower than those of conventional cigarette mainstream smoke. However, in addition to the large range of available products on the market, of the analytical techniques used and of the different types of e-vapor generation methods, these results support that the puffing regimen also contributes to the observed variability in carbonyl levels reported in the scientific literature, and that their comparison and interpretation could thus be limited. Harmonized protocols to be used in physicochemical or experimental studies are clearly needed and should be adapted to the e-cig technologies under investigation in order to mimic as closely as possible the probable range of real conditions. However, some conditions of concern can be highlighted and should not be neglected regarding risk assessment. Many other vaping conditions including the heating triggering, the e-cig tilt or the device aging still need to be investigated with respect to their impact on the carbonyl composition of e-cigarette aerosols, with the ultimate goal of better characterising and preventing e-cigarette-related health hazards.

Acknowledgment

The authors would like to thank Lara and Camille Gaulier for their much appreciated help in the measurement of e-vapor temperature and their support in PCA analysis, respectively, and are grateful to Mike Howsam for English proofreading.

Supporting information

Tables computing the different puffing regimen used and the results of e-liquid consumption (mg/puff), carbonyl emission (ng/puff) and carbonyl generation rate (ng/mg of consumed e-liquid) are available in supplementary data (Tables S1 and S2), along with an example of the temperature measurement over a 20 puffs series (Figure S1) and the PCA bar plots (Figures S2 and S3).

Conflict of interest

Declarations of interest: none.

References

- Association Française de Normalisation, 2016. Norme XP D90-300-3 - Cigarettes électroniques et e-liquides - Partie 3 : exigences et méthodes d'essais relatives aux émissions.
- Bansal, V., Kim, K.-H., 2016. Review on quantitation methods for hazardous pollutants released by e-cigarette (EC) smoking. *Trends Anal. Chem.* 78, 120–133. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.015>
- Beauval, N., Antherieu, S., Soyeux, 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.* 1–9. <https://doi.org/10.1093/jat/bkx054>
- Beauval, N., Howsam, M., Antherieu, S., Allorge, D., Soyeux, M., Garçon, G., Goossens, J.F., Lo-Guidice, J.M., Garat, A., 2016. Trace elements in e-liquids - Development and validation of an ICP-MS method for the analysis of electronic cigarette refills. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 79, 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.03.024>
- Behar, R.Z., Davis, B., Wang, Y., Bahl, V., Lin, S., Talbot, P., 2014. Identification of toxicants in cinnamon-flavored electronic cigarette refill fluids. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 28, 198–208.
- Burns, D.M., Dybing, E., Gray, N., Hecht, S., Anderson, C., Sanner, T., O'Connor, R., Djordjevic, M., Dresler, C., Hainaut, P., Jarvis, M., Opperhuizen, A., Straif, K., 2008. Mandated lowering of toxicants in cigarette smoke: a description of the World Health Organization TobReg proposal. *Tob. Control* 17, 132–141. <https://doi.org/10.1136/tc.2007.024158>
- Cunningham, A., Slayford, S., Vas, C., Gee, J., Costigan, S., Prasad, K., 2016. Development, validation and application of a device to measure e-cigarette users' puffing topography. *Sci. Rep.* 6, 35071. <https://doi.org/10.1038/srep35071>
- Czogala, J., Goniewicz, M.L., Fidelus, B., Zielinska-Danch, W., Travers, M.J., Sobczak, A., 2014. Secondhand exposure to vapors from electronic cigarettes. *Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* 16, 655–662. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntt203>
- Eldridge, A., Betson, T.R., Gama, M.V., McAdam, K., 2015. Variation in tobacco and mainstream smoke toxicant yields from selected commercial cigarette products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 409–427. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.01.006>
- El-Hellani, A., Salman, R., El-Hage, R., Talih, S., Malek, N., Baalbaki, R., Karaoghlanian, N., Nakkash, R., Shihadeh, A., Saliba, N.A., 2016. Nicotine and Carbonyl Emissions From Popular Electronic Cigarette Products: Correlation to

Liquid Composition and Design Characteristics. *Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* <https://doi.org/10.1093/ntr/ntw280>

European Committee for Standardization, 2015. New CEN/TC 437 “Electronic cigarettes and e-liquids” [WWW Document]. URL <https://www.cen.eu/news/brief-news/Pages/NEWS-2015-002.aspx> (accessed 5.9.18).

Farsalinos, K.E., Gillman, G., 2017. Carbonyl Emissions in E-cigarette Aerosol: A Systematic Review and Methodological Considerations. *Front. Physiol.* 8, 1119. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01119>

Farsalinos, K.E., Kistler, K.A., Pennington, A., Spyrou, A., Kouretas, D., Gillman, G., 2017a. Aldehyde levels in e-cigarette aerosol: Findings from a replication study and from use of a new-generation device. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 111, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.002>

Farsalinos, K.E., Voudris, V., Poulas, K., 2015. E-cigarettes generate high levels of aldehydes only in “dry puff” conditions. *Addiction* 110, 1352–1356. <https://doi.org/10.1111/add.12942>

Farsalinos, K.E., Voudris, V., Spyrou, A., Poulas, K., 2017b. 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. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 109, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.044>

Flora, J.W., Meruva, N., Huang, C.B., Wilkinson, C.T., Ballentine, R., Smith, D.C., Werley, M.S., McKinney, W.J., 2016. Characterization of potential impurities and degradation products in electronic cigarette formulations and aerosols. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 74, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.11.009>

Food and Drug Administration, 2012. Harmful and Potentially Harmful Constituents in Tobacco Products and Tobacco Smoke: Established List [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/TobaccoProducts/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm297786.htm> (accessed 1.7.18).

Geiss, O., Bianchi, I., Barahona, F., Barrero-Moreno, J., 2015. Characterisation of mainstream and passive vapours emitted by selected electronic cigarettes. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.10.001>

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, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.01.004>

Gillman, I.G., Kistler, K.A., Stewart, E.W., Paolantonio, A.R., 2016. Effect of variable power levels on the yield of total aerosol mass and formation of aldehydes in e-

cigarette aerosols. Regul. Toxicol. Pharmacol. 75, 58–65.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.12.019>

Goniewicz, M.L., Gupta, R., Lee, Y.H., Reinhardt, S., Kim, S., Kim, B., Kosmider, L., Sobczak, A., 2015. Nicotine levels in electronic cigarette refill solutions: A comparative analysis of products from the U.S., Korea, and Poland. *Int. J. Drug Policy* 26, 583–588. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2015.01.020>

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, 133–139. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2012-050859>

GOV UK, 2015. E-cigarettes around 95% less harmful than tobacco estimates landmark review [WWW Document]. URL <https://www.gov.uk/government/news/e-cigarettes-around-95-less-harmful-than-tobacco-estimates-landmark-review> (accessed 3.23.17).

Han, S., Chen, H., Zhang, X., Liu, T., Fu, Y., 2016. Levels of Selected Groups of Compounds in Refill Solutions for Electronic Cigarettes. *Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* 18, 708–714. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntv189>

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, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.09.042>

Hua, M., Yip, H., Talbot, P., 2013. Mining data on usage of electronic nicotine delivery systems (ENDS) from YouTube videos. *Tob. Control* 22, 103–106. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2011-050226>

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, 1295–1308. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1294-7>

Institut National de Recherche et de Sécurité, 2015. Acroléine - Fiche toxicologique [WWW Document]. URL http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_57§ion=pathologieToxicologie#tab_toxiHomme (accessed 7.5.17).

International Agency for Research on Cancer, 2016. IARC Monographs-Classifications [WWW Document]. URL <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> (accessed 7.28.16).

International Organization for Standardization, 2016. Vape and vapour products make their debut in international standardization [WWW Document]. URL <http://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/news/2016/04/Ref2074.html> (accessed 5.9.18).

International Organization for Standardization, 2015. ISO/TR 19478-2:2015(en), ISO and Health Canada intense smoking parameters — Part 2: Examination of

factors contributing to variability in the routine measurement of TPM, water and NFDPM smoke yields of cigarettes [WWW Document]. URL <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:19478:-2:ed-1:v1:en> (accessed 2.23.17).

- Kasza, K.A., Ambrose, B.K., Conway, K.P., Borek, N., Taylor, K., Goniewicz, M.L., Cummings, K.M., Sharma, E., Pearson, J.L., Green, V.R., Kaufman, A.R., Bansal-Travers, M., Travers, M.J., Kwan, J., Tworek, C., Cheng, Y.-C., Yang, L., Pharris-Ciurej, N., van Bommel, D.M., Backinger, C.L., Compton, W.M., Hyland, A.J., 2017. Tobacco-Product Use by Adults and Youths in the United States in 2013 and 2014. *N. Engl. J. Med.* 376, 342–353. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa1607538>
- Kavvalakis, M.P., Stivaktakis, P.D., Tzatzarakis, M.N., Kouretas, D., Liesivuori, J., Alegakis, A.K., Vynias, D., Tsatsakis, A.M., 2015. Multicomponent analysis of replacement liquids of electronic cigarettes using chromatographic techniques. *J. Anal. Toxicol.* 39, 262–269. <https://doi.org/10.1093/jat/bkv002>
- Khlystov, A., Samburova, V., 2016. Flavoring Compounds Dominate Toxic Aldehyde Production during E-Cigarette Vaping. *Environ. Sci. Technol.* 50, 13080–13085. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05145>
- King, B.A., Patel, R., Nguyen, K.H., Dube, S.R., 2015. Trends in awareness and use of electronic cigarettes among US adults, 2010-2013. *Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* 17, 219–227. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntu191>
- 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. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* 16, 1319–1326. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntu078>
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1–18.
- Liu, C., G. McAdam, K., A. Perfetti, T., 2011. Some Recent Topics in Cigarette Smoke Science. *Mini-Rev. Org. Chem.* 8, 349–359. <https://doi.org/10.2174/157019311797440272>
- Margham, J., McAdam, K., Forster, M., Liu, C., Wright, C., Mariner, D., Proctor, C., 2016. Chemical Composition of Aerosol from an E-Cigarette: A Quantitative Comparison with Cigarette Smoke. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 1662–1678. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00188>
- McAuley, T.R., Hopke, P.K., Zhao, J., Babaian, S., 2012. Comparison of the effects of e-cigarette vapor and cigarette smoke on indoor air quality. *Inhal. Toxicol.* 24, 850–857. <https://doi.org/10.3109/08958378.2012.724728>
- Ogunwale, M.A., Li, M., Ramakrishnam Raju, M.V., Chen, Y., Nantz, M.H., Conklin, D.J., Fu, X.-A., 2017. Aldehyde Detection in Electronic Cigarette Aerosols. *ACS Omega* 2, 1207–1214. <https://doi.org/10.1021/acsomega.6b00489>

- Reilly, S.M., Goel, R., Bitzer, Z., Elias, R.J., Foulds, J., Muscat, J., Richie, J.P., 2017. Effects of Topography-Related Puff Parameters on Carbonyl Delivery in Mainstream Cigarette Smoke. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 1463–1469. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00104>
- Robinson, R.J., Hensel, E.C., Morabito, P.N., Roundtree, K.A., 2015. Electronic Cigarette Topography in the Natural Environment. *PLoS ONE* 10, e0129296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129296>
- Sala, C., Medana, C., Pellegrino, R., Aigotti, R., Bello, F.D., Bianchi, G., Davoli, E., 2017. Dynamic measurement of newly formed carbonyl compounds in vapors from electronic cigarettes. *Eur. J. Mass Spectrom. Chichester Engl.* 23, 64–69. <https://doi.org/10.1177/1469066717699078>
- Schober, W., Szendrei, K., Matzen, W., Osiander-Fuchs, H., Heitmann, D., Schettgen, T., Jörres, R.A., Fromme, H., 2013. Use of electronic cigarettes (e-cigarettes) impairs indoor air quality and increases FeNO levels of e-cigarette consumers. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217, 628–637. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.11.003>
- Schripp, T., Markewitz, D., Uhde, E., Salthammer, T., 2013. Does e-cigarette consumption cause passive vaping? *Indoor Air* 23, 25–31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2012.00792.x>
- Sleiman, M., Logue, J.M., Montesinos, V.N., Russell, M.L., Litter, M.I., Gundel, L.A., Destailats, H., 2016. Emissions from Electronic Cigarettes: Key Parameters Affecting the Release of Harmful Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 50, 9644–9651. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01741>
- Tayyarah, R., 2015. E-Cigarette Task Force, Technical Report, 2014 Electronic Cigarette Aerosol Parameters Study.
- Tayyarah, R., Long, G.A., 2014. Comparison of select analytes in aerosol from e-cigarettes with smoke from conventional cigarettes and with ambient air. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 70, 704–710. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.10.010>
- Uchiyama, S., Ohta, K., Inaba, Y., Kunugita, N., 2013. Determination of carbonyl compounds generated from the E-cigarette using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2,4-dinitrophenylhydrazine, followed by high-performance liquid chromatography. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* 29, 1219–1222.
- Uchiyama, S., Senoo, Y., Hayashida, H., Inaba, Y., Nakagome, H., 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. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* 32, 549–555. <https://doi.org/10.2116/analsci.32.549>
- Varlet, V., Farsalinos, K., Augsburger, M., Thomas, A., Etter, J.-F., 2015. Toxicity Assessment of Refill Liquids for Electronic Cigarettes. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 4796–4815. <https://doi.org/10.3390/ijerph120504796>

Wang, P., Chen, W., Liao, J., Matsuo, T., Ito, K., Fowles, J., Shusterman, D., Mendell, M., Kumagai, K., 2017. A Device-Independent Evaluation of Carbonyl Emissions from Heated Electronic Cigarette Solvents. PloS One 12, e0169811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169811>

Williams, M., Villarreal, A., Bozhilov, K., Lin, S., Talbot, P., 2013. Metal and Silicate Particles Including Nanoparticles Are Present in Electronic Cigarette Cartomizer Fluid and Aerosol. PLoS ONE 8, e57987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057987>

Figures

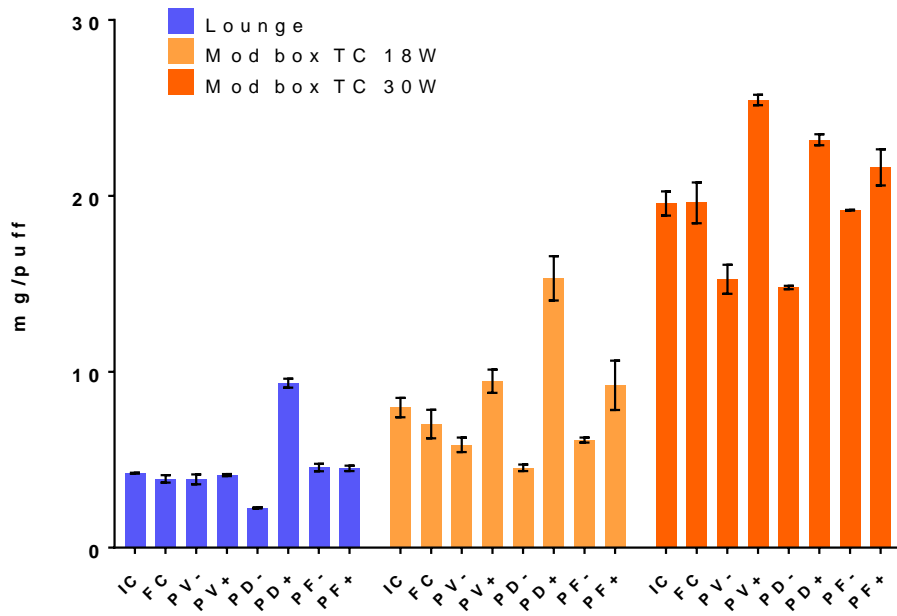


Figure 1 E-liquid consumption during 20 puffs vaping sessions expressed in mg of e-liquid per 1 puff

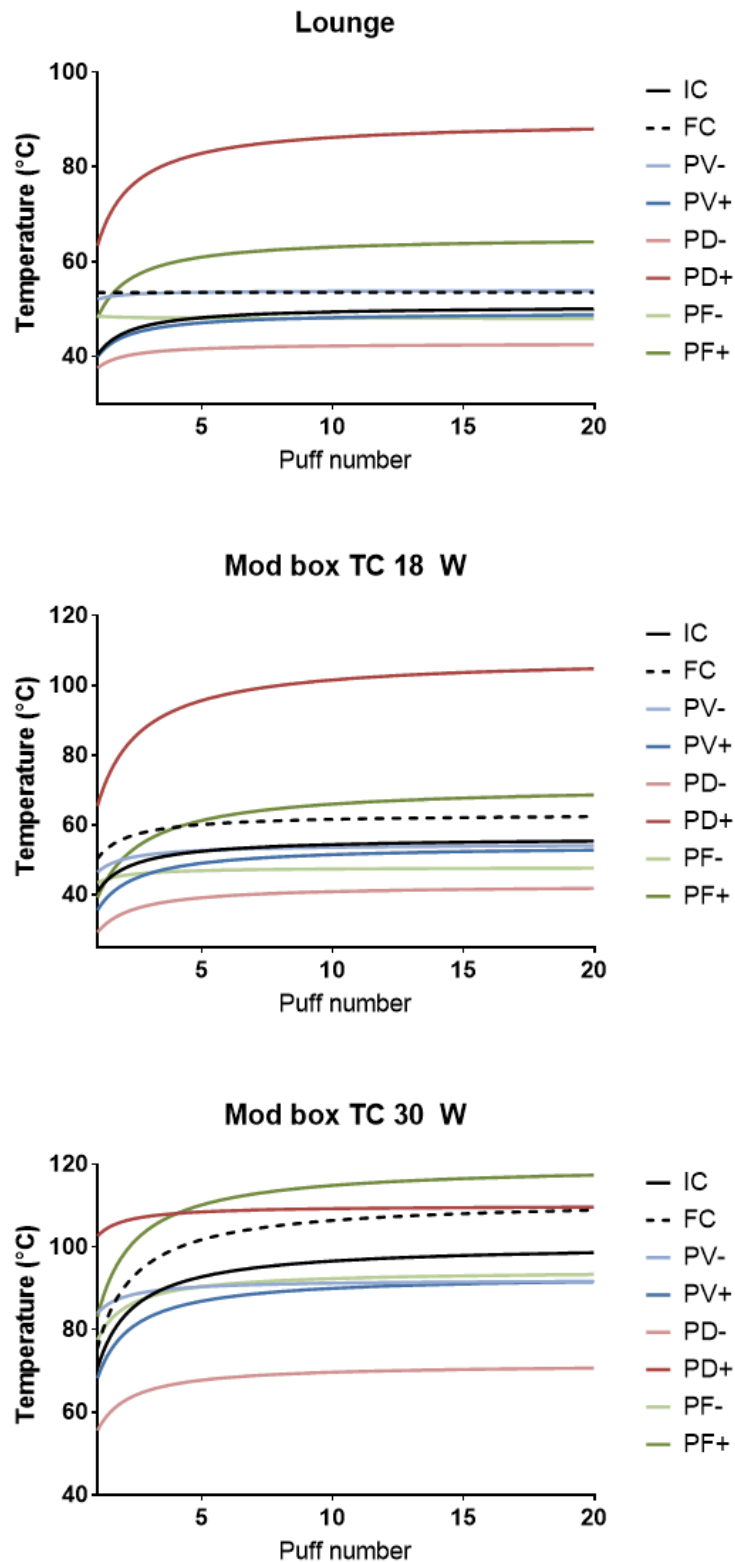


Figure 2 E-vapor temperature measured over 20 puffs vaping sessions expressed in °C. Curves were constructed by the interpolation of the maximum temperatures reached during each puff, while the temperature measured during inter-puff intervals was not taken into account. "IC": initial CORESTA. "FC": final CORESTA. "PV-": decreased puff volume. "PV+": increased puff volume. "PD-": decreased puff duration. "PD+": increased puff duration. "PF-": decreased puff frequency. "PF+": increased puff frequency. IC and FC experiments were respectively performed at the beginning and at the end of the experiment series.

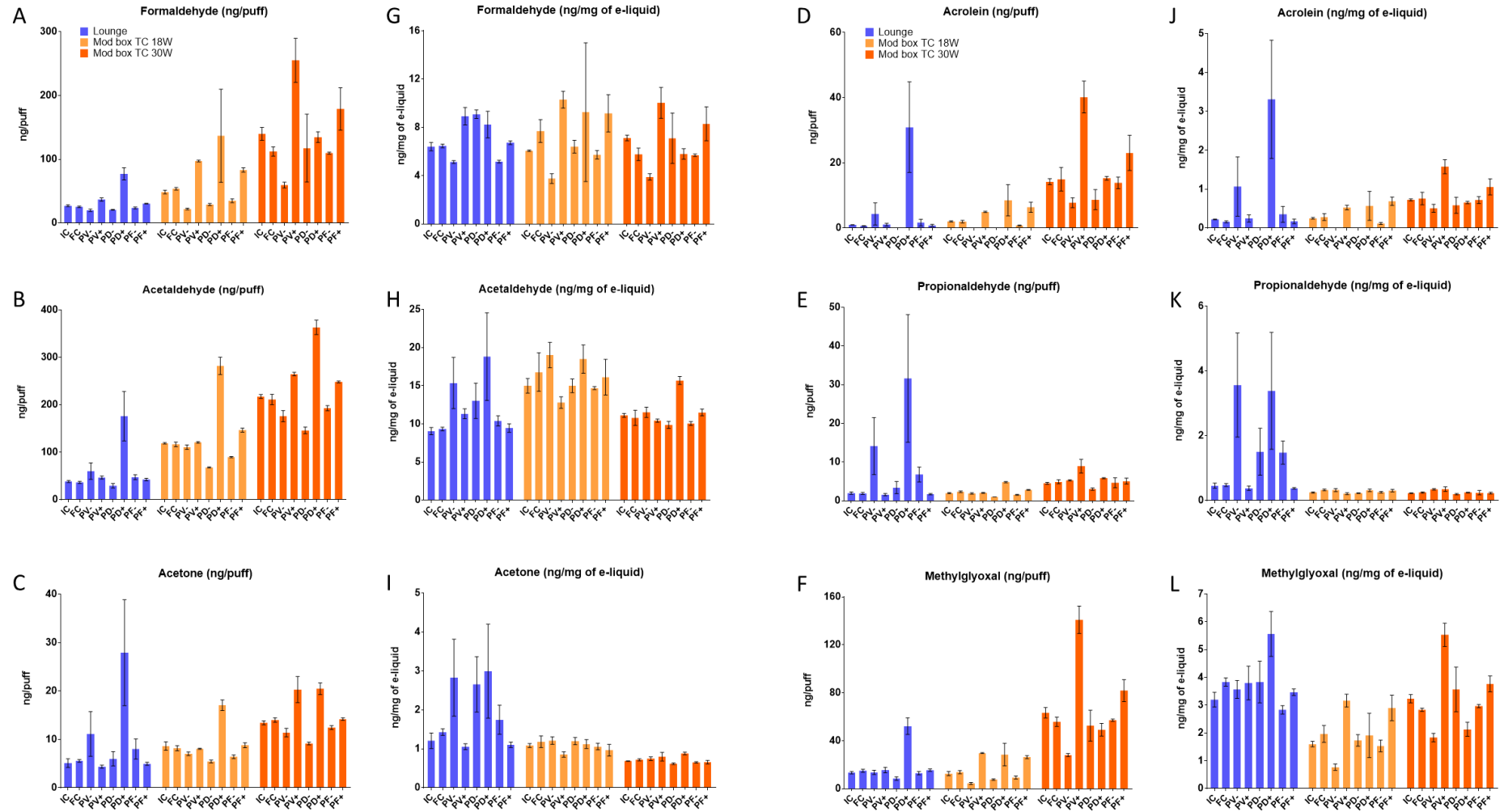


Figure 3 Carbonyl emissions depending on the puffing regimen used, expressed in ng/puff (A – F) and in ng/mg of consumed e-liquid (G – L). Bars represent mean \pm standard deviation of 3 independent and consecutive collections of 20 puffs. “IC”: initial CORESTA. “FC”: final CORESTA. “PV-”: decreased puff volume. “PV+”: increased puff volume. “PD-”: decreased puff duration. “PD+”: increased puff duration. “PF-”: decreased puff frequency. “PF+”: increased puff frequency. IC and FC experiments were respectively performed at the beginning and at the end of the experiment series.

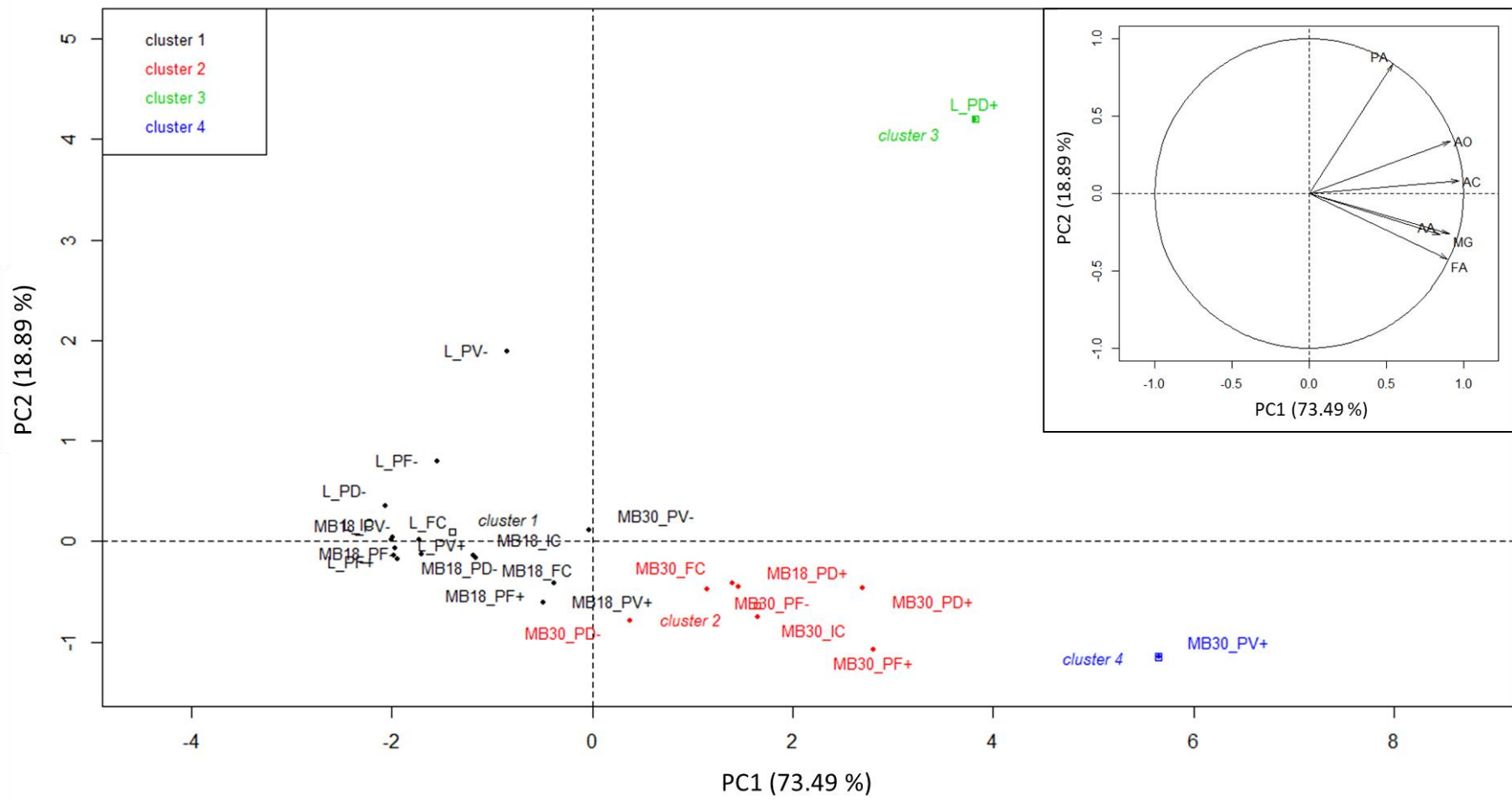


Figure 4 Score plots, loading plots and clustering results of PCA and HCA for carbonyl e-vapor concentrations (ng/puff) depending on vaping conditions. “FA”: formaldehyde, “AA”: acetaldehyde, “AO”: acetone, “AC”: acrolein, “PA”: propionaldehyde, “MG”: methylglyoxal, “L”: lounge, “MB18”: mod box 18 W, “MB30”: mod box 30 W, “IC”: initial CORESTA. “FC”: final CORESTA. “PV-”: decreased puff volume. “PV+”: increased puff volume. “PD-”: decreased puff duration. “PD+”: increased puff duration. “PF-”: decreased puff frequency. “PF+”: increased puff frequency. IC and FC experiments were respectively performed at the beginning and at the end of the experiment series.

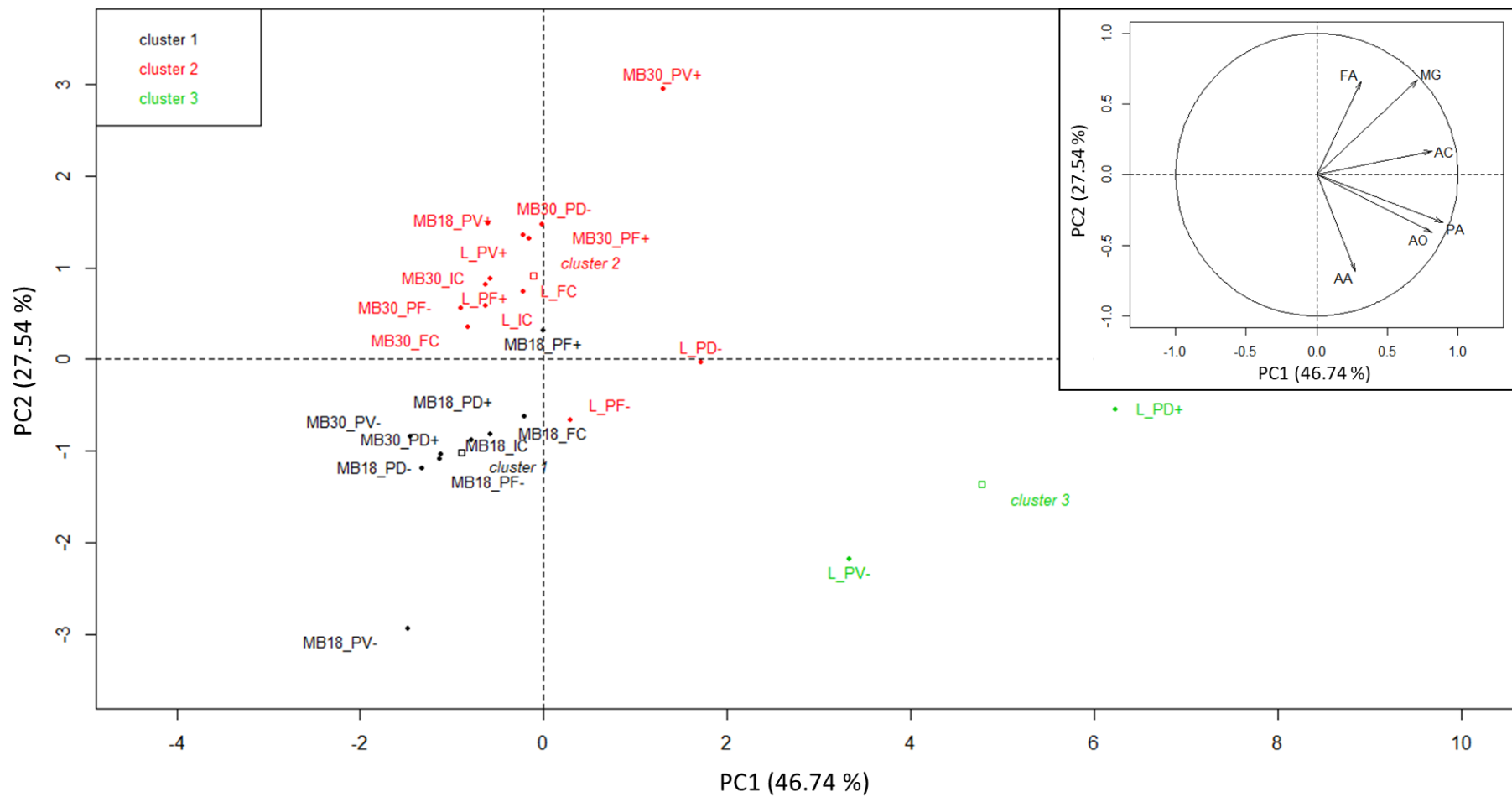


Figure 5 Score plots, loading plots and clustering results of PCA and HCA for carbonyl e-vapor concentrations (ng/mg) depending on vaping conditions. “FA”: formaldehyde, “AA”: acetaldehyde, “AO”: acetone, “AC”: acrolein, “PA”: propionaldehyde, “MG”: methylglyoxal, “L”: lounge, “MB18”: mod box 18 W, “MB30”: mod box 30 W, “IC”: initial CORESTA. “FC”: final CORESTA. “PV-”: decreased puff volume. “PV+”: increased puff volume. “PD-”: decreased puff duration. “PD+”: increased puff duration. “PF-”: decreased puff frequency. “PF+”: increased puff frequency. IC and FC experiments were respectively performed at the beginning and at the end of the experiment series.

Tables

Table 1 Summary of ranges of published values for carbonyl emissions along with protocol details.

Reference	E-cig	E-liquid	Puffing regimen ^a	Collection device	Puff number per collection	Studied parameter(s)	Approximate range of reported concentration (ng/puff)						Other reported compounds
							FA	AA	AO	AC	PA	MG	
(Uchiyama et al., 2013)	363 e-cigs	-	55/2/2	DNPH + Hydroquinone cartridges	10	-	< 72 - 14300	< 17 - 11550	-	< 61 - 4015	< 39 - 4565	< 88 - 2090	glyoxal
(Hutzler et al., 2014)	1 e-cig (prefilled ^b)	1 e-cig/brand associated e-liquid	55/3/2	DNPH solution filled impinger	10 to 60	E-liquid level in cartridge	100 - 5000	100 - 8000	-	< 100 - 3500	< 100 - 1100	-	-
(Goniewicz et al., 2014)	12 e-cig (prefilled)	12 e-cig/brand associated e-liquids	70/1.8/6	DNPH cartridge	150	-	21 - 374	13 - 91	< 0.1	< 0.1 - 279	< 0.07	-	o-methylbenzaldehyde
(Kosmider et al., 2014)	1 e-cig (refillable)	10 commercial + 3 self-made e-liquids	70/1.8/3.5	DNPH cartridge	30	Main e-liquid components battery voltage	< 2 - 1800	< 1 - 282	< 2 - 506	< 2	< 1.3	-	crotonaldehyde benzaldehyde isovaleraldehyde m-methylbenzaldehyde
(Tayyarah and Long, 2014)	5 e-cigs (prefilled)	5 e-cig/brand associated e-liquids	55/-/2	DNPH solution filled impinger	99	-	< 350	< 70 - 320	-	< 30 - 190	< 30 - 110	-	-
(Farsalinos et al., 2015)	2 prepared e-cigs (refillable)	1 e-liquid	-	DNPH solution filled impinger	60	Power level	< 25 - 34500	< 75 - 20600	< 92 - 2250	< 17 - 21000	-	-	-
(Geiss et al., 2015)	2 e-cigs (refillable)	2 e-liquids	35/4/2	Tedlar bag + DNPH cartridge	20	E-cig type main e-liquid components	19.6 - 23.5	8.1 - 39.9	2.7 - 8.8	0.5 - 13.5	0.9 - 4.9	-	-
(El-Hellani et al., 2016) ^c	27 e-cigs (prefilled and refillable)	27 e-cig/brand associated e-liquids	100/4/6	DNPH cartridge	15	-	58 - 505	45 - 2120	71 - 344	< 13 - 139	< 14 - 291	-	-
(Flora et al., 2016)	4 e-cigs (prefilled)	E-cig/brand associated e-liquid(s)	55/4/2	DNPH solution filled impinger	20	-	90 - 330	< 710	-	< 360	-	-	-
(Geiss et al., 2016)	1 e-cig (refillable)	1 e-liquid	50/3/3	DNPH cartridge	10	Power level temperature	24 - 1560	13 - 350	-	≤ 2.5	-	-	-
(Gillman et al., 2016)	5 e-cigs (refillable)	1 self-made e-liquid	55/4/2	DNPH solution filled impinger	25	E-cig design power level	< 22 - 99200	< 22 - 81440	-	< 22 - 23720	-	-	-

(Khlystov and Samburova, 2016) ^c	3 e-cigs (prefilled and refillable)	17 e-liquids	40/4/2	DNPH cartridge	2	Flavouring e-liquid content	< 9 - 49500	< 7 - 27700	-	<10 - 2720	< 13 - 4180	-	benzaldehyde m-methylbenzaldehyde
(Margham et al., 2016)	1 e-cig (prefilled)	1 e-cig/brand associated e-liquid	55/3/2 35/3/2 80/3/2 110/3/2 140/3/2	DNPH solution filled impinger	100	Puff volume	121 - 123	104 - 107	60 - 86	61 - 79	< 67	-	methyl ethyl ketone
(Sleiman et al., 2016) ^c	2 e-cigs (refillable)	3 e-liquids	50/5/2.4	DNPH cartridge	1 to 5	E-cig type e-cig conditioning e-cig aging power level temperature main e-liquid components	10660 - 342220	1173 - 135468	153 - 10011	328 - 71426	51 - 22720	-	crotonaldehyde butyraldehyde benzaldehyde valeraldehyde p-methylbenzaldehyde, hexaldehyde methyl ethyl ketone metacrolein
(Uchiyama et al., 2016)	10 e-cigs (prefilled and refillable)	1 e-liquid for all refillable e-cigs and 2 prefilled cartridges	55/2/2 55/2/1 55/2/4	Cambridge filter pad + CX-572 cartridge	1 to 30	Puff number battery voltage puff frequency	< 70 - 110000	< 100 - 100000	< 50 - 6400	< 210 - 15000	< 50 - 8900	< 60 - 33000	glyoxal
(Beauval et al., 2017)	1 e-cig (refillable)	6 e-liquids	55/3/2	DNPH cartridge	96	-	20.4 - 81.4	8.8 - 52.8	-	< 2.6 - 116.1	-	-	-
(Farsalinos et al., 2017a)	2 e-cigs (refillable)	2 e-liquids	50/5/2 50/4/2	DNPH solution filled impinger	50	Battery voltage	90 - 29817	0.3 - 15093	-	35 - 4365	-	-	-
(Farsalinos et al., 2017b)	1 e-cig (refillable)	1 e-liquid	60/4/2	DNPH solution filled impinger	50	Battery voltage	340 - 71820	-	-	-	-	-	-
(Ogunwale et al., 2017)	2 e-cigs (prefilled and refillable)	4 e-cig/brand associated e-liquids + 6 commercial e-liquids	91/4/2	Tedlar bag + Silicon microreactor with a coating phase of AMAH ^d	10	E-cig type power supply puff volume puff duration	18 - 81981	15 - 53210	129 - 80872	2 - 1621	≤ 57 - 1792	-	butyraldehyde
(Sala et al., 2017)	2 e-cigs (refillable)	1 e-liquid	70/2/5 70/5/5 70/10/5	Glass vial + SPME ^e technique with on-fiber derivatization	5	Puff duration	392 µg/mL ^f	272 µg/mL ^f	-	2.15 µg/mL ^f	-	-	-

Values were selected regardless conditions of use (e.g. power supply, voltage) and were extrapolated into the good unit according to available data. “-“: unavailable data. ^a Puffing regimens are described as follows: puff volume (mL)/puff duration (s)/puff frequency (min⁻¹). ^b "Prefilled" refers to prefilled disposable e-cigs and prefilled replaceable cartridges. ^c E-vapors were produced by custom-designed devices. ^d AMAH: 4-(2-aminooxyethyl)-morpholin-4-ium chloride. ^e SPME: solid-phase microextraction. ^f Results were reported in “µg/mL of liquid in vapor”, extrapolation to ng/puff is not possible.

Table 2 Description of puffing regimen parameters

Puffing regimen	Abbreviation	Puff volume (mL)	Puff duration (s)	Puff frequency (min⁻¹)
CORESTA^a (initial and final)	IC and FC	55	3	2
Puff volume +	PV+	100	3	2
Puff volume -	PV-	35	3	2
Puff duration +	PD+	55	6	2
Puff duration -	PD-	55	2	2
Puff frequency +	PF+	55	3	4.3
Puff frequency -	PF-	55	3	1

^a (Tayyarah, 2015)

Supplementary information

Influence of puffing conditions on the carbonyl composition of e-cigarette aerosols

Nicolas Beauval^{1,2}, Marie Verrièle², Anne Garat¹, Isabelle Fronva², Romain Dusautoir¹, Sébastien Anthérieu¹, Guillaume Garçon¹, Jean-Marc Lo-Guidice¹, Delphine Allorge¹, Nadine Locoge².*

¹ Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA 4483 - IMPECS - IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France

² IMT Lille Douai, Sciences de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement (SAGE), F-59508 Douai Cedex, France/Université de Lille, F-59000 Lille, France

Table content

Table S1 Carbonyl concentrations (ng/puff) in e-vapors generated from 1 e-liquid and 2 e-cig models depending on puffing regimens

Table S2 Carbonyl concentrations (ng/mg of consumed e-liquid) in e-vapors generated from 1 e-liquid and 2 e-cig models depending on puffing regimens

Figure content

Figure S1 Example of temperature measurement over a 20 puffs vaping session

Figure S2 Bar plots indicating the importance of principle components (PC) in PCA for carbonyl e-vapor concentrations (ng/puff) depending on vaping conditions

Figure S3 Bar plots indicating the importance of principle components (PC) in PCA for carbonyl e-vapor concentrations (ng/mg) depending on vaping conditions

Table S1 Carbonyl concentrations (ng/puff) in e-vapors generated from 1 e-liquid and 2 e-cig models depending on puffing regimens.

E-cig model	Condition	Puffing regimen ^a (mL/sec/min ⁻¹)	Puff velocity (mL/min)	E-liquid consumption (mean ± SD - mg/puff)	Carbonyl concentrations (mean ± SD - ng/puff)					
					FA	AA	AO	AC	PA	MG
Lounge 4.6 W	IC	55/3/2	18.3	4.2 ± 0.02	27 ± 1.5	38 ± 2.2	5.1 ± 0.9	0.9 ± 0.03	1.9 ± 0.3	14 ± 1
	FC	55/3/2	18.3	3.9 ± 0.2	25 ± 1.4	36 ± 2.4	5.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1	1.9 ± 0.3	15 ± 1.3
	PV-	35/3/2	11.7	3.9 ± 0.3	20 ± 1.8	60 ± 17	11 ± 4.6	4.3 ± 3.4	14 ± 7.4	14 ± 1.8
	PV+	100/3/2	33.3	4.1 ± 0.05	37 ± 2.6	47 ± 3.3	4.4 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.6 ± 0.3	16 ± 2.2
	PD-	55/2/2	27.5	2.3 ± 0.04	21 ± 0.5	29 ± 4.8	6.0 ± 1.5	-	3.4 ± 1.6	8.6 ± 1.5
	PD+	55/6/2	9.2	9.4 ± 0.3	77 ± 9.5	176 ± 52	28 ± 11	31 ± 14	32 ± 17	52 ± 6.9
	PF-	55/3/1	18.3	4.6 ± 0.2	24 ± 1.5	47 ± 5.3	8.0 ± 2.1	1.6 ± 1	6.8 ± 1.9	13 ± 1.4
	PF+	55/3/4.3	18.3	4.5 ± 0.2	30 ± 0.5	43 ± 2.7	5.0 ± 0.3	0.8 ± 0.3	1.7 ± 0.2	16 ± 0.9
Mod box TC 18 W	IC	55/3/2	18.3	8 ± 0.5	48 ± 2.9	119 ± 1.5	8.6 ± 0.9	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1	13 ± 1.7
	FC	55/3/2	18.3	7 ± 0.8	54 ± 2	117 ± 4.9	8.2 ± 0.5	1.9 ± 0.4	2.3 ± 0.2	14 ± 1.3
	PV-	35/3/2	11.7	5.8 ± 0.4	22 ± 1.3	111 ± 4.8	7.0 ± 0.4	-	1.9 ± 0.2	4.5 ± 0.8
	PV+	100/3/2	33.3	9.5 ± 0.7	97 ± 1.3	121 ± 1.7	8.1 ± 0.1	5.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1	30 ± 0.4
	PD-	55/2/2	27.5	4.5 ± 0.2	29 ± 1.6	68 ± 1.2	5.4 ± 0.3	-	1.0 ± 0.01	7.8 ± 0.6
	PD+	55/6/2	9.2	16 ± 0.4	137 ± 73	282 ± 18	17 ± 1.1	8.5 ± 4.8	4.8 ± 0.2	29 ± 9.4
	PF-	55/3/1	18.3	6.1 ± 0.1	35 ± 3	90 ± 1.3	6.4 ± 0.4	0.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1	9.5 ± 1.3
	PF+	55/3/4.3	18.3	9.2 ± 1.4	83 ± 3.4	147 ± 4.2	8.8 ± 0.5	6.4 ± 1.5	2.8 ± 0.09	26 ± 1.3
Mod box TC 30 W	IC	55/3/2	18.3	19.6 ± 0.7	140 ± 10	218 ± 4.2	13 ± 0.4	14 ± 0.9	4.5 ± 0.3	63 ± 4.4
	FC	55/3/2	18.3	19.6 ± 1.2	112 ± 7.2	211 ± 11	14 ± 0.5	15 ± 3.7	4.9 ± 0.5	56 ± 3.9
	PV-	35/3/2	11.7	15.3 ± 0.8	59 ± 4.5	176 ± 12	11 ± 0.9	7.8 ± 1.5	5.3 ± 0.2	28 ± 1.3
	PV+	100/3/2	33.3	25.5 ± 0.3	255 ± 35	265 ± 3.8	20 ± 2.7	40 ± 4.9	8.9 ± 1.8	141 ± 11
	PD-	55/2/2	27.5	14.8 ± 0.1	118 ± 53	146 ± 7.1	9.2 ± 0.3	8.7 ± 3.1	3.0 ± 0.3	53 ± 13
	PD+	55/6/2	9.2	23.2 ± 0.3	135 ± 8.4	364 ± 15	20 ± 1.2	15 ± 0.6	5.8 ± 0.1	49 ± 5.3
	PF-	55/3/1	18.3	19.2 ± 0.02	110 ± 1.7	193 ± 5.2	12 ± 0.4	14 ± 1.8	4.6 ± 1.3	57 ± 0.9
	PF+	55/3/4.3	18.3	21.6 ± 1	179 ± 33	249 ± 2	14 ± 0.3	23 ± 5.4	5.0 ± 0.8	82 ± 9.1

Values represent mean ± standard deviation of 3 independent and consecutive collections of 20 puffs. "IC": initial CORESTA. "FC": final CORESTA. "PV-": decreased puff volume. "PV+": increased puff volume. "PD-": decreased puff duration. "PD+": increased puff duration. "PF-": decreased puff frequency. "PF+": increased puff frequency. CI and CF experiments were respectively performed at the beginning and at the end of the experiment series. "-": not different from experimental blank concentration. ^a Puffing regimens are described as follows: puff volume (mL)/puff duration (s)/puff frequency (min⁻¹)

Table S2 Carbonyl concentrations (ng/mg of consumed e-liquid) in e-vapors generated from 1 e-liquid and 2 e-cig models depending on puffing regimens.

E-cig model	Condition	Puffing regimen ^a (mL/sec/min ⁻¹)	Puff velocity (mL/min)	E-liquid consumption (mean ± SD - mg/puff)	Carbonyl concentrations (mean ± SD - ng/mg of e-liquid)					
					FA	AA	AO	AC	PA	MG
Lounge 4.6 W	IC	55/3/2	18.3	4.2 ± 0.02	6.4 ± 0.4	9.1 ± 0.5	1.2 ± 0.2	0.2 ± 0.01	0.5 ± 0.08	3.2 ± 0.2
	FC	55/3/2	18.3	3.9 ± 0.2	6.5 ± 0.2	9.3 ± 0.2	1.4 ± 0.08	0.2 ± 0.02	0.5 ± 0.04	3.9 ± 0.2
	PV-	35/3/2	11.7	3.9 ± 0.3	5.1 ± 0.1	15 ± 3.3	2.8 ± 1	1.1 ± 0.8	3.6 ± 1.6	3.6 ± 0.3
	PV+	100/3/2	33.3	4.1 ± 0.05	8.9 ± 0.7	11 ± 0.6	1.1 ± 0.08	0.2 ± 0.09	0.4 ± 0.07	3.8 ± 0.6
	PD-	55/2/2	27.5	2.3 ± 0.04	9.1 ± 0.4	13 ± 2.3	2.7 ± 0.7	-	1.5 ± 0.7	3.8 ± 0.7
	PD+	55/6/2	9.2	9.4 ± 0.3	8.3 ± 1.1	19 ± 5.8	3.0 ± 1.2	3.3 ± 1.5	3.4 ± 1.8	5.6 ± 0.8
	PF-	55/3/1	18.3	4.6 ± 0.2	5.2 ± 0.09	10 ± 0.7	1.8 ± 0.4	0.4 ± 0.2	1.5 ± 0.4	2.9 ± 0.2
	PF+	55/3/4.3	18.3	4.5 ± 0.2	6.7 ± 0.2	9.4 ± 0.5	1.1 ± 0.07	0.2 ± 0.06	0.4 ± 0.02	3.5 ± 0.1
Mod box TC 18 W	IC	55/3/2	18.3	8 ± 0.5	6.1 ± 0.05	15 ± 0.9	1.1 ± 0.05	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.02	1.6 ± 0.1
	FC	55/3/2	18.3	7 ± 0.8	7.7 ± 1	17 ± 2.5	1.2 ± 0.2	0.3 ± 0.09	0.3 ± 0.03	2.0 ± 0.3
	PV-	35/3/2	11.7	5.8 ± 0.4	3.8 ± 0.4	19 ± 1.7	1.2 ± 0.1	-	0.3 ± 0.05	0.8 ± 0.1
	PV+	100/3/2	33.3	9.5 ± 0.7	10 ± 0.7	13 ± 0.8	0.9 ± 0.07	0.5 ± 0.06	0.2 ± 0.03	3.2 ± 0.2
	PD-	55/2/2	27.5	4.5 ± 0.2	6.4 ± 0.5	15 ± 0.9	1.2 ± 0.09	-	0.2 ± 0.01	1.7 ± 0.2
	PD+	55/6/2	9.2	16 ± 0.4	9.3 ± 5.8	19 ± 1.8	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.03	1.9 ± 0.8
	PF-	55/3/1	18.3	6.1 ± 0.1	5.7 ± 0.4	15 ± 0.2	1.1 ± 0.08	0.1 ± 0.03	0.3 ± 0.02	1.6 ± 0.2
	PF+	55/3/4.3	18.3	9.2 ± 1.4	9.2 ± 1.6	16 ± 2.3	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.04	2.9 ± 0.5
Mod box TC 30 W	IC	55/3/2	18.3	19.6 ± 0.7	7.1 ± 0.3	11 ± 0.3	0.7 ± 0.01	0.7 ± 0.03	0.2 ± 0.01	3.2 ± 0.2
	FC	55/3/2	18.3	19.6 ± 1.2	5.7 ± 0.5	11 ± 1	0.7 ± 0.03	0.8 ± 0.2	0.2 ± 0.02	2.9 ± 0.08
	PV-	35/3/2	11.7	15.3 ± 0.8	3.9 ± 0.3	12 ± 0.7	0.7 ± 0.05	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.03	1.9 ± 0.1
	PV+	100/3/2	33.3	25.5 ± 0.3	10 ± 1.3	10 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.6 ± 0.2	0.4 ± 0.07	5.5 ± 0.4
	PD-	55/2/2	27.5	14.8 ± 0.1	7.9 ± 3.6	9.9 ± 0.4	0.6 ± 0.02	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.02	3.6 ± 0.8
	PD+	55/6/2	9.2	23.2 ± 0.3	5.8 ± 0.4	16 ± 0.5	0.9 ± 0.04	0.7 ± 0.03	0.3 ± 0.01	2.1 ± 0.3
	PF-	55/3/1	18.3	19.2 ± 0.02	5.7 ± 0.09	10 ± 0.3	0.6 ± 0.02	0.7 ± 0.09	0.2 ± 0.07	3.0 ± 0.04
	PF+	55/3/4.3	18.3	21.6 ± 1	8.3 ± 1.4	12 ± 0.5	0.7 ± 0.04	1.1 ± 0.2	0.2 ± 0.03	3.8 ± 0.3

Values represent mean ± standard deviation of 3 independent and consecutive collections of 20 puffs. "IC": initial CORESTA. "FC": final CORESTA. "PV-": decreased puff volume. "PV+": increased puff volume. "PD-": decreased puff duration. "PD+": increased puff duration. "PF-": decreased puff frequency. "PF+": increased puff frequency. CI and CF experiments were respectively performed at the beginning and at the end of the experiment series. "-": not different from experimental blank concentration. ^a Puffing regimens are described as follows: puff volume (mL)/puff duration (s)/puff frequency (min⁻¹)

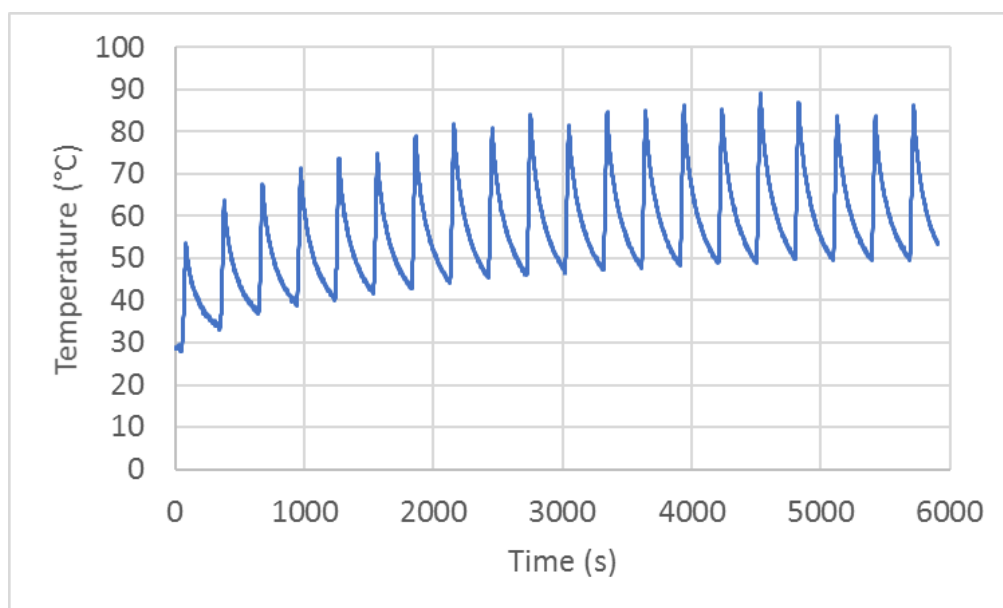


Figure S1 Example of temperature measurement over a 20 puffs vaping session

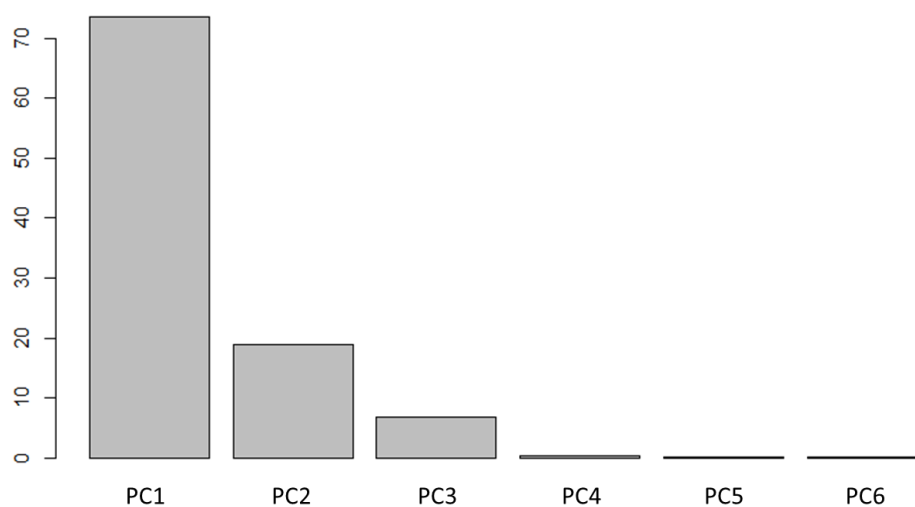


Figure S2 Bar plots indicating the importance of principle components (PC) in PCA for carbonyl e-vapor concentrations (ng/puff) depending on vaping conditions

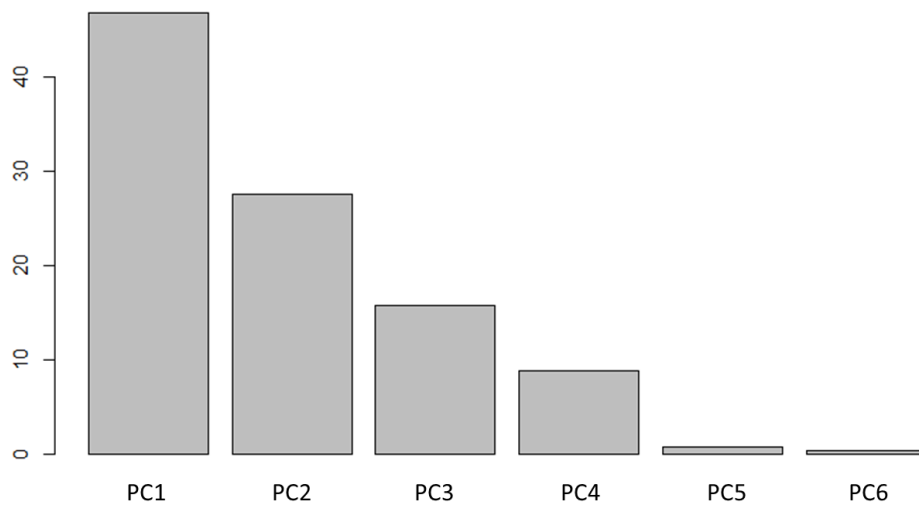


Figure S3 Bar plots indicating the importance of principle components (PC) in PCA for carbonyl e-vapor concentrations (ng/mg) depending on vaping conditions

DISCUSSION GENERALE

La cigarette électronique est installée sur le marché depuis plusieurs années et est aujourd'hui considérée en France par le HCSP comme étant un outil d'aide à l'arrêt du tabac [6]. En effet, les données cumulées ces dernières années tendent à considérer l'e-cigarette comme moins toxique que son homologue principal, la cigarette conventionnelle. Cependant, l'impact intrinsèque du vapotage sur la santé humaine, à court et long terme, n'est pas précisément connu et est toujours en cours d'évaluation [2]. Il s'agit d'un enjeu majeur de Santé Publique impliquant un grand nombre de disciplines et de champs d'expertise.

Dans la démarche du projet mené par l'EA4483, étudiant l'impact sanitaire de la cigarette électronique, la caractérisation physicochimique des e-vapeurs tient une place particulièrement importante. Elle est un atout majeur pour l'interprétation des études expérimentales car elle permet de déterminer ce à quoi les cellules, ou les animaux, sont exposés. De plus, elle permet d'estimer l'exposition des consommateurs à différents composés chimiques potentiellement toxiques.

Concrètement, la caractérisation des émissions se focalise sur l'analyse qualitative et quantitative des éléments et molécules contenus dans les e-liquides et présents dans les e-vapeurs. Cela concerne aussi bien les composants principaux, et attendus, de l'e-liquide (propylène glycol, glycérol, nicotine, arôme, additifs), que d'éventuels polluants. D'un point de vue technique, l'analyse des e-vapeurs requiert un niveau élevé de maîtrise et de robustesse de l'ensemble de la chaîne de mesure. Ainsi, les méthodes de génération, d'acheminement, de collecte et d'analyse des e-vapeurs doivent être les plus fiables et réalistes possibles sous peine de produire des résultats difficilement ou non interprétables.

Analyse de l'e-liquide. Mélange organique relativement visqueux, principalement constitué de propylène glycol et de glycérol, l'e-liquide est une matrice singulière qui mérite une certaine attention. Deux questions se posent quant à sa composition.

La première : est-elle conforme à la composition annoncée par le fabricant ? En effet, les constituants principaux de l'e-liquide influent, au moment du vapotage, sur les sensations perçues par le consommateur. La proportion de propylène glycol et de glycérol joue notamment sur la densité de l'aérosol généré et sur l'intensité de perception des arômes [20]. De plus, la concentration en nicotine, dont la surexposition est source d'effets potentiellement graves [24], est réglementairement

limitée à 20 mg/L en France et doit être vérifiée [28]. La concentration en nicotine est particulièrement importante pour le vapoteur qui recherche, par exemple, la sensation de plaisir liée à la consommation de nicotine ou qui cherche, au contraire, à s'en sevrer. Dans la littérature, la concentration des e-liquides en nicotine a souvent été rapportée comme n'étant pas conforme à la concentration annoncée par le fabricant [49,83–88], ce qui ne fut pas le cas pour les e-liquides que nous avons testés. De même, leurs concentrations en propylène glycol et glycérol étaient aussi conformes aux indications de l'étiquette. L'exactitude de la composition annoncée des e-liquides renvoie à la notion de qualité des produits et il est certain que celle-ci est fortement dépendante du fabricant. Pour cela et en raison de la présence de nicotine, la composition des e-liquides mis sur le marché devrait impérativement être contrôlée.

La seconde question posée est : l'e-liquide contient-il des composés chimiques potentiellement toxiques pour l'Homme ? Mettant de côté les ingrédients principaux, il est possible que les e-liquides soient contaminés par différentes substances, potentiellement toxiques. Cette contamination pourrait provenir du processus de fabrication des e-liquides, de la qualité des ingrédients et des contenants [48] ou encore des conditions de conservation. Par conséquent, seule une analyse exhaustive de l'e-liquide permettrait de répondre à cette question. Une telle analyse suppose, d'une part, d'avoir accès aux techniques de dosage appropriées et, d'autre part, d'avoir préalablement développé, testé et validé ces mêmes techniques pour la matrice e-liquide. Au cours de ces travaux, une attention particulière a été accordée au développement des méthodes de dosage à l'exemple de l'analyse des ETM par ICP-MS décrite dans l'article #1. Concernant l'analyse des produits testés dans notre étude, plusieurs ETM ont été retrouvés, incluant l'aluminium, l'antimoine, l'arsenic, le chrome, le cobalt, le cuivre, le manganèse et le vanadium ; sur les 50 pesticides recherchés, seuls le chlorpyrifos éthyl et la trifluraline ont été détectés et quantifiés, notamment dans les e-liquides « menthe chlorophylle » ; et 10 des 16 HAP recherchés ont été quantifiés dans au moins un des 6 e-liquides testés. Globalement, les concentrations mesurées sont inférieures à 62 ng/mL pour les ETM et HAP et inférieures à 66 pg/mL pour les pesticides. Comme dans notre étude, la littérature fait aussi état de la présence de différents composés potentiellement toxiques dans les e-liquides, à des niveaux parfois très variables cependant. Plusieurs ETM ont par exemple été mis en évidence par Saffari *et al.*

(2014), Palazollo *et al.* (2016) et Hess *et al.* (2017) à des concentrations allant de quelques dixièmes de ng/mL à plusieurs dizaines de milliers de ng/mL [44,57,75]. Des composés carbonylés (formaldéhyde, acétaldéhyde - l'ordre du µg/mL), des solvants (acétone, acétate d'éthyle - de l'ordre du µg/mL) et des nitrosamines (N-nitrosonicotine, N-nitrosoanabasine - de l'ordre du ng/mL) ont aussi été observés dans des e-liquides [45,110,111], sans oublier différents mélanges d'arômes, que l'on ne peut toutefois pas considérer comme des polluants à proprement parler (de l'ordre du mg/mL) [30]. La plupart des concentrations rapportées paraissent relativement faibles, cependant elles sont à considérer au regard d'une exposition chronique et apparaissent en faveur d'un risque potentiel lié à la consommation de ces produits.

Analyse de l'e-vapeur. La composition des e-liquides peut, dans certains cas, être un bon reflet de celle des e-vapeurs. Farsalinos *et al.* (2015) ont, par exemple, observé une bonne corrélation entre les concentrations de nitrosamines ajoutées dans des e-liquides et celles mesurées dans les e-vapeurs correspondantes [110]. Néanmoins, différents phénomènes peuvent intervenir au cours de la vaporisation de l'e-liquide et potentiellement influencer sur la composition de l'e-vapeur : transformation (décomposition ou dénaturation) d'une molécule [50,54,96], relargage par des composants de l'e-cigarette [47] ou vaporisation partielle de certains composés [49]. L'analyse physicochimique des e-vapeurs est par conséquent cruciale dans un processus d'évaluation du risque sanitaire du vapotage.

La première contrainte inhérente à l'analyse des e-vapeurs est leur génération. Il s'agit de reproduire le plus fidèlement possible l'aspiration du vapoteur dans de bonnes conditions de répétabilité et de reproductibilité. C'est à ce niveau qu'intervient la machine à fumer/vapoter. L'appareil utilisé dans notre projet (Vitrocell® VC1) permet un paramétrage fin et reproductible des conditions d'aspiration et une automatisation de l'expérimentation grâce au pilotage informatique, des avantages non négligeables en comparaison d'une pompe péristaltique ou d'une seringue manuelle, par exemple [53,112]. Deuxième contrainte, les conditions d'aspiration paramétrées (profil de vapotage) doivent être les plus réalistes possibles. Or, cette notion de réalisme est difficile à conceptualiser sur une machine. Le CORESTA a, en 2015, proposé un profil pour l'étude du vapotage [39], profil qui a été utilisé comme référence pour l'ensemble de nos travaux. A ce

moment de l'étude, le réalisme de ce profil vis-à-vis du matériel utilisé n'était pas formellement prouvé. Néanmoins, ce profil présentait l'avantage d'être publié (donc utilisé dans d'autres études), ce qui facilite la comparaison des données. Plus tard au cours de nos travaux, des tests sur des modèles plus récents de cigarette électronique ont mis en évidence les limites du profil proposé par le CORESTA. En effet, avec ce profil, la température des e-vapeurs en sortie de l'e-cigarette de 4^{ème} génération, paramétrée à 30 W, était supérieure à 90 °C, donc probablement supérieure à ce que peut tolérer un être humain. Or, cette configuration de la Mod Box TC n'est pas considérée comme « extrême » par le fabricant et 30 W est même dans le milieu des puissances recommandées pour des « réglages idéaux ». Le profil CORESTA, comme plusieurs des profils utilisés au cours de notre dernière étude, n'est donc probablement pas adapté à cette nouvelle technologie d'e-cigarette. Une étude de la topographie des bouffées avec ce matériel en conditions réelles permettrait de confirmer ce postulat. Troisième contrainte, le système de génération des e-vapeurs doit acheminer celles-ci vers le dispositif de collecte (ou « piégeage »). Au cours de cet acheminement, peuvent se produire des phénomènes de condensation, d'adsorption aux parois ou de transformation chimique, autant d'évènements pouvant impacter la récupération et la quantification des analytes ciblés. Idéalement, la distance entre la cigarette électronique et le dispositif de recueil doit être la plus courte possible. Cependant, il faut bien veiller à ce que son positionnement dans le système n'altère pas les conditions de génération des bouffées. Dans le cas du Vitrocell® VC1, la priorité a été de maintenir inchangées les conditions de génération des bouffées. Le dispositif de collecte a donc été positionné en aval du système d'aspiration/rejet, assumant ainsi une possible perte de composés au cours de l'acheminement des e-vapeurs. Quatrième contrainte, le dispositif de collecte des composés d'intérêt doit être sélectionné avec soin. Il doit, d'une part, permettre une collecte exhaustive des analytes d'intérêt à partir des aérosols d'e-liquide et, d'autre part, permettre leur analyse ultérieure par la technique dédiée. Or, un système de recueil universel n'existe pas. Enfin, en dernière position de la chaîne de mesure, la technique de dosage doit, comme pour les e-liquides, être vérifiée et validée pour l'analyse des collectes d'e-vapeurs (liquides de barbotage, éluats, etc.).

L'analyse physicochimique des e-vapeurs nécessite donc un niveau de maîtrise et de technicité élevé. Les méthodes développées au cours de nos travaux

peuvent encore être optimisées. Le rendement de collecte de certains composés pourrait notamment être amélioré grâce à du matériel plus performant ou à l'optimisation des conditions de collecte (débit de collecte, positionnement du dispositif). A noter que toutes les précédentes remarques s'appliquent aussi à la fumée de cigarette conventionnelle, à la différence qu'il existe pour cette dernière des normes internationales décrivant ses conditions d'analyse [82].

Un fait très remarquable dans la littérature actuelle est la diversité des méthodes d'analyse utilisées. Dans des travaux de revue publiés en 2016, Bansal et Kim ont recensé une grande variété de techniques de génération (machine à fumer commerciale ou « fait-maison »), de collecte (barboteur, cartouche, sac, etc.) et d'analyse (chromatographie liquide, gazeuse, détection en spectrophotométrie UV, spectrométrie de masse, etc.) des e-vapeurs [124]. Il est par conséquent difficile de déterminer aujourd'hui si les techniques employées sont équivalentes, en termes de performance de collecte et de spécificité notamment, et si les valeurs publiées sont comparables entre elles.

Parmi les constituants principaux, la concentration de la nicotine dans les e-vapeurs est probablement l'un des paramètres les plus importants. En effet, en tant que potentielle alternative à la consommation de tabac, la cigarette électronique a notamment pour objectif d'apporter de la nicotine en quantité suffisante et adéquate à l'utilisateur pour lui procurer des effets comparables à la cigarette. Pour les produits testés au cours de nos travaux (soit un modèle d'e-cigarette de 2^{ème} génération et des e-liquides à 16 mg/mL de nicotine), les quantités de nicotine émises dans une bouffée d'e-vapeur ou de fumée étaient relativement comparables, de l'ordre de 30 à 35 µg/bouffée (16 µg/bouffée pour l'arôme menthe chlorophylle). Dans la littérature, les constats sont plus variables : la concentration de nicotine mesurée dans les e-vapeurs est rapportée comme oscillant entre 2 et 530 µg/bouffée [93,113–115]. Au-delà de la concentration initiale dans l'e-liquide, les concentrations en nicotine dans les e-vapeurs sont dépendantes des conditions expérimentales de génération des bouffées. Ainsi, le modèle d'e-cigarette et la durée de la bouffée ont été démontrés comme étant des paramètres influant sur ces concentrations [49,93,113,114,116–118]. Rappelons aussi que ces observations ont été réalisées dans des conditions expérimentales fixées et relativement stables. Une majoration de ces fluctuations est à prévoir en conditions réelles.

Concernant la présence potentielle de polluants, une multitude de composés peut être recherchée dans les e-vapeurs. Probablement dans un souci de comparabilité avec la cigarette conventionnelle, la plupart des études publiées à ce jour ont recherché dans les e-vapeurs des composés connus pour être présents dans la fumée de cigarette conventionnelle (HAP, ETM, carbonylés, nitrosamines, pesticides etc.). Dans l'analyse multi-composants réalisée au laboratoire, aucun pesticide n'a été détecté dans les e-vapeurs issues des 6 e-liquides sélectionnés ; du cadmium, de l'antimoine, du chrome et du plomb ont été retrouvés dans quelques échantillons ; les 3 composés carbonylés étudiés (formaldéhyde, acétaldéhyde et acroléine) ont été quantifiés dans tous les échantillons d'e-vapeur, à l'exception de deux, qui ne contenaient pas d'acroléine ; et seuls l'acénaphthylène et le naphthalène ont été retrouvés sur les 16 HAP étudiés. Les concentrations mesurées pour ces différents composés sont de l'ordre de quelques dizaines à des centaines de pg/bouffée, sauf pour les carbonylés, pour lesquels des concentrations de l'ordre de quelques dizaines de ng/bouffée ont été mesurées. D'une manière générale, toutes les classes de ces composés ont été retrouvées dans la fumée de cigarette de référence 3R4F, à des concentrations 7 à plus de 6 000 fois supérieures, en fonction du composé étudié et du e-liquide testé.

De la même manière que pour les e-liquides, ces concentrations doivent être interprétées en tenant compte d'une potentielle exposition à long terme des vapoteurs. En réalité, les effets d'une exposition répétée aux composés mis en évidence dans ces travaux, bien qu'en concentrations inférieures à celles de la fumée de cigarette, sont encore inconnus.

Les études publiées sur le sujet sont, pour la plupart, en accord avec les résultats de nos travaux dans la mesure où les e-vapeurs semblent émettre moins de composés potentiellement toxiques que la fumée de cigarette conventionnelle, et en plus faible concentration [55,58,119]. Des exceptions s'observent néanmoins, notamment pour les composés carbonylés, à l'exemple du formaldéhyde dont l'émission dans la fumée de cigarette serait de l'ordre de 2 800 à 6 800 ng/bouffée d'après Eldridge *et al.* (2015) [61]. Alors que nos travaux ont mis en évidence des concentrations maximales en formaldéhyde de 255 ng/bouffée (cf. article #3), des concentrations dépassant 50 000 ng/bouffée et atteignant même 300 000 ng/bouffée ont été rapportées dans différentes études [50,54,59,108]. A noter que l'expérience

de Sleiman *et al.* (2016), ayant mené à observer les concentrations les plus élevées [59], a été reproduite par Farsalinos *et al.* (2017). Ces derniers ont rapporté des concentrations maximales en formaldéhyde de l'ordre de 30 000 ng/bouffée et conclu que les conditions de vapotage utilisées par Sleiman *et al.* (2015) n'étaient pas réalistes et conduisaient notamment à des *dry puffs* [120]. Le cas des composés carbonylés est, en réalité, très particulier. Ces composés seraient générés au moment du vapotage par des réactions d'oxydation [54] ou de pyrolyse [50] du propylène glycol et du glycérol, ou par décomposition thermique des arômes [96]. Plusieurs facteurs influenceraient leur génération au cours du vapotage : la température de chauffe (en partie liée à la puissance appliquée par la batterie à la résistance) [46,50,59,95], l'architecture du cartomiseur [50] ou le niveau de remplissage du réservoir [43].

L'importance des conditions expérimentales. Il s'avère que l'on ne vapote pas comme l'on fume, qu'un ancien fumeur ne vapote pas comme un vapoteur n'ayant jamais fumé, que des personnes différentes ne vapotent pas de la même façon, d'autant plus si le dispositif utilisé est différent, et qu'une même personne peut vapoter de plusieurs manières au cours d'une même journée [89–92]. Le réalisme des conditions expérimentales est crucial pour évaluer au mieux l'exposition des consommateurs. A travers l'analyse des composés carbonylés, nos travaux ont montré que le profil de vapotage pouvait avoir un impact à la fois sur la composition des e-vapeurs et sur le réalisme de l'expérience. Par exemple, l'augmentation du volume ou de la durée de la bouffée entraîne une augmentation des concentrations des e-vapeurs, en formaldéhyde et acroléine notamment, de manière différente en fonction du modèle d'e-cigarette. Ainsi, toutes conditions confondues, les concentrations en formaldéhyde, acétaldéhyde, acétone, acroléine, propionaldéhyde et méthylglyoxal ont respectivement varié dans cette expérience de 20 à 255, 29 à 364, 4,4 à 28, < 0,5 à 40, 1 à 32 et 4,5 à 141 ng/bouffée.

La question est donc de savoir si toutes les conditions testées sont réalistes. La température de l'e-vapeur, mesurée en sortie de l'embout buccal de l'e-cigarette, est apparue très élevée, en particulier pour la Mod Box TC paramétrée à 30 W. Cette configuration de la Mod Box TC étant conseillée par le fabricant parmi les « réglages idéaux » [121], les températures observées tous profils confondus, supérieures à 60 °C et dépassant même 100 °C, sont incohérentes avec un usage réaliste et

témoignent de l'utilisation de profils inadaptés. L'idéal serait de disposer, pour chaque modèle d'e-cigarette testé, d'une étude topographique des profils des consommateurs en conditions réelles. Ainsi, il serait possible de déterminer un « range » de profils pertinents à tester. La complémentarité des études topographiques et physicochimiques est manifestement un atout majeur qu'il faudrait développer, mais qui semble néanmoins difficile à appliquer au regard des moyens demandés (en termes de recrutement des volontaires notamment) et du nombre de modèles et configurations d'e-cigarette imaginable. A défaut, comme préconisé par l'AFNOR dans sa 3^{ème} norme sur l'e-cigarette [38] et comme expérimenté dans nos travaux, la mesure de la température de l'e-vapeur en sortie de l'embout buccal semble être un bon indicateur du réalisme de l'expérience.

Grâce à nos travaux, notamment s'ils sont confirmés par l'étude d'autres modèles de cigarette électronique, les consommateurs pourraient être avertis de l'existence de profils (ou « habitudes ») de vapotage plus « émetteurs » de composés carbonylés que d'autres. Le profil de vapotage n'explique cependant pas, à lui seul, les différences très importantes de concentrations des espèces carbonylées observées dans la littérature, couvrant des valeurs allant de < 2 à 342 000 ng/bouffée pour le formaldéhyde par exemple (cf. article #3).

Au-delà de l'étude du profil de vapotage, il existe aussi des utilisations plus marginales des cigarettes électroniques qui n'ont été que peu étudiées jusqu'à présent. Par exemple, le *direct dripping*, qui consiste à verser des gouttes d'e-liquide directement sur la résistance chauffante, serait susceptible de générer des quantités importantes de composés carbonylés [122]. La surchauffe au moment du vapotage, l'usage prolongé de matériel encrassé ou le rajout d'ingrédients non prévus dans les e-liquides, sont d'autres exemples de conditions de vapotage dont l'impact sur la composition de l'e-vapeur est inconnu.

Conclusion et perspectives. Les travaux de cette thèse ont participé à améliorer les connaissances actuelles sur la composition chimique des émissions associées à l'utilisation de la cigarette électronique et sur les limites des outils et méthodes utilisés pour leur caractérisation physicochimique. C'est un domaine qui évolue très vite. A ce jour, un nombre conséquent de travaux étudiant la physicochimie des émissions a déjà été publié et de nouvelles études apparaissent très régulièrement. Cependant, il est indéniable que l'interprétation des données

reste délicate encore aujourd'hui et nécessite la prise en compte d'un très grand nombre de facteurs. Malgré cela, toutes ces informations sont des éléments importants en termes d'évaluation du risque sanitaire du vapotage. Les prochaines avancées devraient notamment permettre d'optimiser les techniques et conditions expérimentales de caractérisation de la composition des e-liquides et e-vapeurs, d'orienter de manière plus précise les investigations toxicologiques expérimentales et de définir une réglementation adaptée au contrôle et à la surveillance de ces produits. Aujourd'hui, il est urgent d'optimiser et d'harmoniser les pratiques analytiques par la publication de méthodes de référence. Ces travaux permettront d'alimenter les réflexions et les données indispensables à l'élaboration des futures normes par les organismes nationaux, européens et internationaux [40,41].

L'analyse physicochimique des émissions de cigarette électronique n'est évidemment pas limitée aux composés décrits dans ces travaux. La tendance à l'utilisation de l'e-cigarette comme moyen de consommer des dérivés cannabinoïdes est en augmentation [123–126]. De plus, certains travaux s'orientent vers l'utilisation d'e-cigarette comme moyen d'administration de médicaments [127]. Dans ce contexte, l'analyse physicochimique des émissions pourrait même constituer un futur besoin dans le domaine de la médecine.

L'analyse physicochimique n'est pas non plus limitée aux émissions de cigarettes conventionnelles et électroniques. Les nouveaux produits commercialisés par Philip Morris par exemple, « IQOS », suscitent *de facto* le même type de questions sanitaires. D'après des travaux récents de Farsalinos *et al.* (2017-2018), ces produits émettraient moins de nicotine et de composés carbonylés que la cigarette conventionnelle, mais plus que la cigarette électronique [128,129].

Enfin, aux vues des grandes variabilités de compositions des e-vapeurs décrites dans la littérature, se pose nécessairement la question du vapotage passif, moins étudié pour le moment [57,130–132].

Le projet de l'EA4483, portant sur l'impact sanitaire des cigarettes électroniques, comprenait en parallèle des analyses physicochimiques, une étude expérimentale visant à évaluer et comparer les effets d'e-vapeurs et de fumées de cigarette sur des cellules épithéliales bronchiques humaines [133]. Les analyses de cytotoxicité, des marqueurs d'inflammation et de stress oxydant, et du transcriptome

sont en faveur d'une plus faible toxicité des e-vapeurs en comparaison de la fumée de cigarette conventionnelle (3R4F). Ces résultats sont cohérents avec les plus faibles quantités de composés potentiellement toxiques mises en évidence dans les e-vapeurs, de 7 à plus de 6000 fois inférieures à elles retrouvées dans la fumée de cigarette. Le projet se poursuit actuellement par une étude *in vivo*, à l'aide d'un modèle murin, dont l'un des objectifs principaux est de déterminer les biomarqueurs d'exposition et d'effets les plus pertinents en vue d'études futures chez l'Homme.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bonaldi C, Andriantafika F, Chyderiotis S, Boussac-Zarebska M, Cao B, Benmarhnia T, et al. Les décès attribuables au tabagisme en France. Dernières estimations et tendance, années 2000 à 2013. Bull Epidémiol Hebd. 2016;30-1.
2. Glasser AM, Collins L, Pearson JL, Abudayyeh H, Niaura RS, Abrams DB, et al. Overview of Electronic Nicotine Delivery Systems: A Systematic Review. Am J Prev Med. 2017;52(2):e33-66.
3. Afssaps. Communiqué de presse L'Afssaps recommande de ne pas consommer de cigarette électronique [Internet]. Disponible sur: <http://documentation.fhp.fr/documents/20396r2.pdf>
4. Informations réglementaires relatives à la cigarette électronique - Point d'Information - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 14 sept 2017]. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Informations-reglementaires-relatives-a-la-cigarette-electronique-Point-d-Information>
5. Haute Autorité de Santé. Arrêter de fumer et ne pas rechuter : la recommandation 2014 de la HAS.
6. Haut Conseil de la santé publique. Guidance on the benefits and risks of the electronic cigarette or e-cigarette in the general population (February, 22, 2016). Rev Mal Respir. 2016;33(6):509-25.
7. OMS | Tabagisme [Internet]. WHO. [cité 3 août 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/fr/>
8. Carter BD, Abnet CC, Feskanich D, Freedman ND, Hartge P, Lewis CE, et al. Smoking and mortality--beyond established causes. N Engl J Med. 2015;372:631-40.
9. Attitudes of Europeans towards tobacco and electronic cigarettes [Internet]. European commission; 2017 [cité 14 juin 2017]. Disponible sur: <http://ec.europa.eu/commfrontoffice/publicopinion/index.cfm/General/index>
10. Plan cancer 2014-2019 : priorités et objectifs - Plan cancer | Institut National Du Cancer [Internet]. [cité 6 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Plan-cancer/Plan-cancer-2014-2019-priorites-et-objectifs>
11. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. BMJ. 2004;328(7455):1519.
12. Stratégies thérapeutiques d'aide au sevrage tabagique : efficacité, efficience et prise en charge financière [Internet]. Haute Autorité de Santé; 2007 [cité 3 août 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_477515/fr/strategies-therapeutiques-d-aide-au-sevrage-tabagique-efficacite-efficience-et-prise-en-charge-financiere

13. Lermenier A, Palle C. Résultats de l'enquête ETINCEL-OFDT sur la cigarette électronique [Internet]. Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies; 2014 [cité 10 juin 2015]. Disponible sur: <http://www.ofdt.fr/BDD/publications/docs/eisxalu2.pdf>
14. Inhalateurs électroniques de nicotine - Rapport de l'OMS [Internet]. Organisation Mondiale de la Santé; 2014 [cité 9 sept 2016]. Disponible sur: http://apps.who.int/gb/fctc/PDF/cop6/FCTC_COP6_10-fr.pdf?ua=1
15. Attitudes of Europeans towards tobacco and electronic cigarettes [Internet]. European commission; 2014 [cité 14 juin 2017]. Disponible sur: <http://ec.europa.eu/commfrontoffice/publicopinion/index.cfm/General/index>
16. Andler R, Guignard R, Wilquin J-L, Beck F, Richard J-B, Nguyen-Thanh V. Electronic cigarette use in France in 2014. *Int J Public Health*. 2016;61(2):159-65.
17. Suivre le secteur en perte de vitesse de l'e-cigarette [Internet]. [cité 14 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.dynamique-mag.com/article/suivre-le-secteur-en-perte-de-vitesse-de-l-e-cigarette.8933>
18. Dautzenberg B, Delrieu A, Deutsch A, Le Maître B, Mathern G, Radu-Loghin C, et al. Rapport et avis d'experts sur l'e-cigarette. 2013 [cité 20 juill 2015]; Disponible sur: http://www.ofta-asso.fr/docatel/Rapport_e-cigarette_VF_1.pdf
19. The 4 Generations of Electronic Cigarettes [Internet]. Eciglopedia. 2015 [cité 8 août 2017]. Disponible sur: <http://eciglopedia.com/the-4-generations-of-electronic-cigarettes/>
20. Comprendre la composition des e-liquides : comment les choisir ? [Internet]. HappeSmoke : La cigarette électronique en toute simplicité. 2014 [cité 2 août 2017]. Disponible sur: <https://www.happesmoke.com/blog/composition-e-liquide/>
21. Propylène-glycol (FT 226) - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [cité 21 févr 2017]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_226
22. Select Committee on GRAS Substances [Internet]. [cité 2 août 2017]. Disponible sur: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=SCOGS>
23. Glycerol - SIDS Initial Assessment Report [Internet]. Organisation for Economic Co-operation and Development; 2002 [cité 9 sept 2016]. Disponible sur: <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/56815.pdf>
24. Nicotine (FT 312) - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [cité 2 août 2017]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_312

25. Effets de la nicotine sur l'organisme, le tabac / 04_ Questions mises en ligne / Vos questions /Nos reponses / page d'accueil - tabac-info-service.fr [Internet]. [cité 21 juill 2018]. Disponible sur: https://www.tabac-info-service.fr/Vos-questions-Nos-reponses/04_Questions-mises-en-ligne/Effets-de-la-nicotine-sur-l-organisme-le-tabac
26. Benowitz NL. Nicotine Addiction. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2295-303.
27. Dépendance / Vos questions /Nos reponses / page d'accueil - tabac-info-service.fr [Internet]. [cité 21 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.tabac-info-service.fr/Vos-questions-Nos-reponses/Dependance2>
28. Arrêté du 19 mai 2016 relatif aux produits du vapotage contenant de la nicotine.
29. Zhu S-H, Sun JY, Bonnevie E, Cummins SE, Gamst A, Yin L, et al. Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tob Control*. 2014;23 Suppl 3:iii3-9.
30. Tierney PA, Karpinski CD, Brown JE, Luo W, Pankow JF. Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. *Tob Control*. 2015;25(e1):e10-5.
31. Behar RZ, Luo W, Lin SC, Wang Y, Valle J, Pankow JF, et al. Distribution, quantification and toxicity of cinnamaldehyde in electronic cigarette refill fluids and aerosols. *Tob Control*. 2016;25(Suppl 2):ii94-102.
32. Behar RZ, Davis B, Wang Y, Bahl V, Lin S, Talbot P. Identification of toxicants in cinnamon-flavored electronic cigarette refill fluids. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2014;28(2):198-208.
33. Kreiss K. Work-related spirometric restriction in flavoring manufacturing workers. *Am J Ind Med*. 2014;57(2):129-37.
34. Ordonnance n° 2016-623 du 19 mai 2016 portant transposition de la directive 2014/40/UE sur la fabrication, la présentation et la vente des produits du tabac et des produits connexes.
35. European Commission. Directive 2014/40/EU of the European Parliament and of the Council of 3 April 2014 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States concerning the manufacture, presentation and sale of tobacco and related products and repealing Directive 2001/37/EC. *Off J Eur Union*. 2014;
36. Association française de normalisation. Norme XP D90-300-1 - Cigarettes électroniques et e-liquides - Partie 1 : exigences et méthodes d'essai relatives aux cigarettes électroniques. 2015;
37. Association française de normalisation. Norme XP D90-300-2 - Cigarettes électroniques et e-liquides - Partie 2 : exigences et méthodes d'essai relatives aux cigarettes e-liquides. 2015;

38. Association Française de Normalisation. Norme XP D90-300-3 - Cigarettes électroniques et e-liquides - Partie 3 : exigences et méthodes d'essais relatives aux émissions. 2016;
39. Tayyarah R. E-Cigarette Task Force, Technical Report, 2014 Electronic Cigarette Aerosol Parameters Study. 2015; Disponible sur: https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/ECIG-CTR_ECigAerosolParameters-2014Study_March2015.pdf
40. International Organization for Standardization. Vape and vapour products make their debut in international standardization [Internet]. 2016 [cité 9 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/news/2016/04/Ref2074.html>
41. European Committee for Standardization. New CEN/TC 437 « Electronic cigarettes and e-liquids » [Internet]. 2015 [cité 9 mai 2018]. Disponible sur: <https://www.cen.eu/news/brief-news/Pages/NEWS-2015-002.aspx>
42. Éthylène-glycol (FT 25) - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [cité 29 août 2017]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_25
43. Hutzler C, Paschke M, Kruschinski S, Henkler F, Hahn J, Luch A. Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarettes. *Arch Toxicol*. 2014;88(7):1295-308.
44. Hess CA, Olmedo P, Navas-Acien A, Goessler W, Cohen JE, Rule AM. E-cigarettes as a source of toxic and potentially carcinogenic metals. *Environ Res*. 2017;152:221-5.
45. Varlet V, Farsalinos K, Augsburger M, Thomas A, Etter J-F. Toxicity Assessment of Refill Liquids for Electronic Cigarettes. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(5):4796-815.
46. Kosmider L, Sobczak A, Fik M, Knysak J, Zacierka M, Kurek J, et al. Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: effects of nicotine solvent and battery output voltage. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob*. 2014;16(10):1319-26.
47. Williams M, Villarreal A, Bozhilov K, Lin S, Talbot P. Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol. *PLoS One*. 2013;8(3):e57987.
48. Williams M, To A, Bozhilov K, Talbot P. Strategies to Reduce Tin and Other Metals in Electronic Cigarette Aerosol. *PLoS ONE*. 2015;10(9).
49. Prévôt N, de Oliveira F, Perinel-Ragey S, Basset T, Vergnon J-M, Pourchez J. Nicotine delivery from the refill liquid to the aerosol via high-power e-cigarette device. *Sci Rep*. 2017;7(1):2592.

50. Gillman IG, Kistler KA, Stewart EW, Paolantonio AR. Effect of variable power levels on the yield of total aerosol mass and formation of aldehydes in e-cigarette aerosols. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016;75:58-65.
51. Uchiyama S, Ohta K, Inaba Y, Kunugita N. Determination of carbonyl compounds generated from the E-cigarette using coupled silica cartridges impregnated with hydroquinone and 2,4-dinitrophenylhydrazine, followed by high-performance liquid chromatography. *Anal Sci Int J Jpn Soc Anal Chem*. 2013;29(12):1219-22.
52. Cheng T. Chemical evaluation of electronic cigarettes. *Tob Control*. 2014;23(Suppl 2):ii11-7.
53. Herrington JS, Myers C. Electronic cigarette solutions and resultant aerosol profiles. *J Chromatogr A*. 2015;1418:192-9.
54. Uchiyama S, Senoo Y, Hayashida H, Inaba Y, Nakagome H, Kunugita N. Determination of Chemical Compounds Generated from Second-generation E-cigarettes Using a Sorbent Cartridge Followed by a Two-step Elution Method. *Anal Sci Int J Jpn Soc Anal Chem*. 2016;32(5):549-55.
55. Goniewicz ML, Knysak J, Gawron M, Kosmider L, Sobczak A, Kurek J, et al. Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob Control*. 2014;23(2):133-9.
56. Farsalinos KE, Kistler KA, Gillman G, Voudris V. Evaluation of electronic cigarette liquids and aerosol for the presence of selected inhalation toxins. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob*. 2015;17(2):168-74.
57. Saffari A, Daher N, Ruprecht A, De Marco C, Pozzi P, Boffi R, et al. Particulate metals and organic compounds from electronic and tobacco-containing cigarettes: comparison of emission rates and secondhand exposure. *Environ Sci Process Impacts*. 2014;16(10):2259-67.
58. Margham J, McAdam K, Forster M, Liu C, Wright C, Mariner D, et al. Chemical Composition of Aerosol from an E-Cigarette: A Quantitative Comparison with Cigarette Smoke. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(10):1662-78.
59. Sleiman M, Logue JM, Montesinos VN, Russell ML, Litter MI, Gundel LA, et al. Emissions from Electronic Cigarettes: Key Parameters Affecting the Release of Harmful Chemicals. *Environ Sci Technol*. 2016;50(17):9644-51.
60. CTRP [Internet]. [cité 8 août 2017]. Disponible sur: <https://ctrp.uky.edu/>
61. Eldridge A, Betson TR, Gama MV, McAdam K. Variation in tobacco and mainstream smoke toxicant yields from selected commercial cigarette products. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;71(3):409-27.
62. Pappas RS, Fresquez MR, Martone N, Watson CH. Toxic metal concentrations in mainstream smoke from cigarettes available in the USA. *J Anal Toxicol*. 2014;38(4):204-11.

63. Pappas RS, Gray N, Gonzalez-Jimenez N, Fresquez M, Watson CH. Triple Quad-ICP-MS Measurement of Toxic Metals in Mainstream Cigarette Smoke from Spectrum Research Cigarettes. *J Anal Toxicol*. 2016;40(1):43-8.
64. Wang X, Wang Y, Qin Y, Ding L, Chen Y, Xie F. Sensitive and selective determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke using a graphene-coated solid-phase microextraction fiber prior to GC/MS. *Talanta*. 2015;140:102-8.
65. Bodnar JA, Morgan WT, Murphy PA, Ogden MW. Mainstream smoke chemistry analysis of samples from the 2009 US cigarette market. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2012;64(1):35-42.
66. Comité français d'accréditation. Document SH GTA 04 - révision 01 - Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. 2015; Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
67. US Environmental Protection Agency. Method 6020A for Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. 2007.
68. Spéciation des métaux - Toxicité des métaux et de leurs différentes formes [Internet]. [cité 14 août 2017]. Disponible sur: http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Tableau_Toxicite_des_métaux_et_des_metalloides_sous_leurs_différentes_formes_chimiques_.pdf
69. Goldhaber SB. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2003;38(2):232-42.
70. WHO | Trace elements in human nutrition and health [Internet]. WHO. [cité 14 août 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241561734/en/>
71. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs-Classifications [Internet]. 2016 [cité 28 juill 2016]. Disponible sur: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
72. Lab Technology Face Off: ICP-AES vs. ICP-OES vs. ICP-MS [Internet]. [cité 8 août 2017]. Disponible sur: <http://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/165450-Lab-Tech-Face-Off-ICP-AES-vs-ICP-OES-vs-ICP-MS/>
73. Effets des éléments de matrice sur la sensibilité de la mesure par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif [Internet]. IRAMIS. [cité 29 août 2017]. Disponible sur: http://iramis.cea.fr/Phoce/Vie_des_labos/Ast/ast_visu.php?id_ast=867
74. Beauval N, Howsam M, Antherieu S, Allorge D, Soyez M, Garçon G, et al. Trace elements in e-liquids - Development and validation of an ICP-MS method for the analysis of electronic cigarette refills. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016;79:144-8.

75. Palazzolo DL, Crow AP, Nelson JM, Johnson RA. Trace Metals Derived from Electronic Cigarette (ECIG) Generated Aerosol: Potential Problem of ECIG Devices That Contain Nickel. *Front Physiol.* 2016;7:663.
76. Food and Drug Administration. Harmful and Potentially Harmful Constituents in Tobacco Products and Tobacco Smoke; Established List, April 2012 [Internet]. 2012 [cité 21 févr 2017]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/downloads/TobaccoProducts/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/UCM297981.pdf>
77. Burns DM, Dybing E, Gray N, Hecht S, Anderson C, Sanner T, et al. Mandated lowering of toxicants in cigarette smoke: a description of the World Health Organization TobReg proposal. *Tob Control.* 2008;17(2):132-41.
78. Liu C, G. McAdam K, A. Perfetti T. Some Recent Topics in Cigarette Smoke Science. *Mini-Rev Org Chem.* 2011;8(4):349-59.
79. Mostafalou S, Abdollahi M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol.* 2017;91(2):549-99.
80. Mavrikou S, Flampouri K, Moschopoulou G, Mangana O, Michaelides A, Kintzios S. Assessment of Organophosphate and Carbamate Pesticide Residues in Cigarette Tobacco with a Novel Cell Biosensor. *Sensors.* 2008;8(4):2818-32.
81. US EPA. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) - US EPA Archive Document [Internet]. 2008. Disponible sur: <https://archive.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/web/pdf/pahs.pdf>
82. International Organization for Standardization. ISO 3308:2012 - Routine analytical cigarette-smoking machine -- Definitions and standard conditions.
83. Lisko JG, Tran H, Stanfill SB, Blount BC, Watson CH. Chemical Composition and Evaluation of Nicotine, Tobacco Alkaloids, pH, and Selected Flavors in E-Cigarette Cartridges and Refill Solutions. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob.* 2015;17(10):1270-8.
84. Goniewicz ML, Gupta R, Lee YH, Reinhardt S, Kim S, Kim B, et al. Nicotine levels in electronic cigarette refill solutions: A comparative analysis of products from the U.S., Korea, and Poland. *Int J Drug Policy.* 2015;26(6):583-8.
85. Cheah NP, Chong NWL, Tan J, Morsed FA, Yee SK. Electronic nicotine delivery systems: regulatory and safety challenges: Singapore perspective. *Tob Control.* 2014;23(2):119-25.
86. Peace MR, Baird TR, Smith N, Wolf CE, Poklis JL, Poklis A. Concentration of Nicotine and Glycols in 27 Electronic Cigarette Formulations. *J Anal Toxicol.* 2016;40(6):403-7.
87. Davis B, Dang M, Kim J, Talbot P. Nicotine concentrations in electronic cigarette refill and do-it-yourself fluids. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob.* 2015;17(2):134-41.

88. Davis B, Razo A, Nothnagel E, Chen M, Talbot P. Unexpected nicotine in Do-it-Yourself electronic cigarette flavourings. *Tob Control*. 2016;25(e1):e67-68.
89. Robinson RJ, Hensel EC, Morabito PN, Roundtree KA. Electronic Cigarette Topography in the Natural Environment. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0129296.
90. Robinson RJ, Hensel EC, Roundtree KA, Difrancesco AG, Nonnemaker JM, Lee YO. Week Long Topography Study of Young Adults Using Electronic Cigarettes in Their Natural Environment. *PloS One*. 2016;11(10):e0164038.
91. Cunningham A, Slayford S, Vas C, Gee J, Costigan S, Prasad K. Development, validation and application of a device to measure e-cigarette users' puffing topography. *Sci Rep*. 2016;6:35071.
92. Hua M, Yip H, Talbot P. Mining data on usage of electronic nicotine delivery systems (ENDS) from YouTube videos. *Tob Control*. 2013;22(2):103-6.
93. Talih S, Balhas Z, Eissenberg T, Salman R, Karaoghlanian N, El Hellani A, et al. Effects of user puff topography, device voltage, and liquid nicotine concentration on electronic cigarette nicotine yield: measurements and model predictions. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob*. 2015;17(2):150-7.
94. Farsalinos KE, Gillman G. Carbonyl Emissions in E-cigarette Aerosol: A Systematic Review and Methodological Considerations. *Front Physiol*. 2017;8:1119.
95. Geiss O, Bianchi I, Barrero-Moreno J. 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*. 2016;219(3):268-77.
96. Khlystov A, Samburova V. Flavoring Compounds Dominate Toxic Aldehyde Production during E-Cigarette Vaping. *Environ Sci Technol*. 2016;50(23):13080-5.
97. Aldéhyde formique et solutions aqueuses (FT 7) - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [cité 11 août 2016]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_7§ion=pathologieToxicologie
98. Acétone (FT 3). Généralités - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [cité 21 juill 2018]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_3
99. Aldéhyde acétique (FT 120). Généralités - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [cité 21 juill 2018]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_120
100. Fiche complète pour Aldéhyde propionique - CNESST [Internet]. [cité 21 juill 2018]. Disponible sur: http://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complete.aspx?no_produit=10165

101. Acroléine (FT 57). Généralités - Fiche toxicologique - INRS [Internet]. [cité 21 juill 2018]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_57
102. Carmines EL, Gaworski CL. Toxicological evaluation of glycerin as a cigarette ingredient. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(10):1521-39.
103. Nimlos MR, Blanksby SJ, Qian X, Himmel ME, Johnson DK. Mechanisms of Glycerol Dehydration. *J Phys Chem A*. 2006;110(18):6145-56.
104. Paine III JB, Pithawalla YB, Naworal JD, Thomas Jr. CE. Carbohydrate pyrolysis mechanisms from isotopic labeling: Part 1: The pyrolysis of glycerin: Discovery of competing fragmentation mechanisms affording acetaldehyde and formaldehyde and the implications for carbohydrate pyrolysis. *J Anal Appl Pyrolysis*. 2007;80(2):297-311.
105. Laino T, Tuma C, Moor P, Martin E, Stolz S, Curioni A. Mechanisms of propylene glycol and triacetin pyrolysis. *J Phys Chem A*. 2012;116(18):4602-9.
106. Jo S-H, Kim K-H. Development of a sampling method for carbonyl compounds released due to the use of electronic cigarettes and quantitation of their conversion from liquid to aerosol. *J Chromatogr A*. 2016;1429:369-73.
107. Kosmider L, Sobczak A, Prokopowicz A, Kurek J, Zaciera M, Knysak J, et al. Cherry-flavoured electronic cigarettes expose users to the inhalation irritant, benzaldehyde. *Thorax*. 2016;thoraxjnl-2015-207895.
108. Ogunwale MA, Li M, Ramakrishnam Raju MV, Chen Y, Nantz MH, Conklin DJ, et al. Aldehyde Detection in Electronic Cigarette Aerosols. *ACS Omega*. 2017;2(3):1207-14.
109. Farsalinos KE, Voudris V, Poulas K. E-cigarettes generate high levels of aldehydes only in « dry puff » conditions. *Addiction*. 2015;110(8):1352-6.
110. Farsalinos KE, Gillman G, Poulas K, Voudris V. Tobacco-Specific Nitrosamines in Electronic Cigarettes: Comparison between Liquid and Aerosol Levels. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(8):9046-53.
111. Farsalinos KE, Gillman IG, Melvin MS, Paolantonio AR, Gardow WJ, Humphries KE, et al. Nicotine levels and presence of selected tobacco-derived toxins in tobacco flavoured electronic cigarette refill liquids. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(4):3439-52.
112. Olmedo P, Navas-Acien A, Hess C, Jarmul S, Rule A. A direct method for e-cigarette aerosol sample collection. *Environ Res*. 2016;149:151-6.
113. Goniewicz ML, Kuma T, Gawron M, Knysak J, Kosmider L. Nicotine levels in electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob*. 2013;15:158-66.
114. El-Hellani A, Salman R, El-Hage R, Talih S, Malek N, Baalbaki R, et al. Nicotine and Carbonyl Emissions From Popular Electronic Cigarette Products:

Correlation to Liquid Composition and Design Characteristics. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob.* 2016;

115. Farsalinos KE, Yannovits N, Sarri T, Voudris V, Poulas K. Protocol proposal for, and evaluation of, consistency in nicotine delivery from the liquid to the aerosol of electronic cigarettes atomizers: regulatory implications. *Addict Abingdon Engl.* 2016;111(6):1069-76.
116. Behar RZ, Hua M, Talbot P. Puffing topography and nicotine intake of electronic cigarette users. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117222.
117. Farsalinos K, Poulas K, Voudris V. Changes in puffing topography and nicotine consumption depending on the power setting of electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob.* 2017;
118. Pagano T, DiFrancesco AG, Smith SB, George J, Wink G, Rahman I, et al. Determination of Nicotine Content and Delivery in Disposable Electronic Cigarettes Available in the United States by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob.* 2016;18(5):700-7.
119. Tayyarah R, Long GA. Comparison of select analytes in aerosol from e-cigarettes with smoke from conventional cigarettes and with ambient air. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014;70(3):704-10.
120. Farsalinos KE, Kistler KA, Pennington A, Spyrou A, Kouretas D, Gillman G. Aldehyde levels in e-cigarette aerosol: Findings from a replication study and from use of a new-generation device. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2017;111:64-70.
121. NHOSS. Notice d'information - les cigarettes électroniques et accessoires [Internet]. [cité 22 juill 2018]. Disponible sur: https://www.nhoss.com/img/cms/notice%20d'information_v4.pdf
122. Talih S, Balhas Z, Salman R, Karaoghlanian N, Shihadeh A. « Direct Dripping »: A High-Temperature, High-Formaldehyde Emission Electronic Cigarette Use Method. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob.* 2016;18(4):453-9.
123. Giroud C, de Cesare M, Berthet A, Varlet V, Concha-Lozano N, Favrat B. E-Cigarettes: A Review of New Trends in Cannabis Use. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(8):9988-10008.
124. Varlet V. Drug Vaping: From the Dangers of Misuse to New Therapeutic Devices. *Toxics.* 2016;4(4):29.
125. Varlet V, Concha-Lozano N, Berthet A, Plateel G, Favrat B, Cesare MD, et al. Drug vaping applied to cannabis: Is "Cannavaping" a therapeutic alternative to marijuana? *Sci Rep.* 2016;6:25599.
126. Pourchez J, Forest V. E-cigarettes: from nicotine to cannabinoids, the French situation. *Lancet Respir Med.* 2018;6(5):e16.

127. Pourchez J, de Oliveira F, Perinel-Ragey S, Basset T, Vergnon J-M, Prévôt N. Assessment of new-generation high-power electronic nicotine delivery system as thermal aerosol generation device for inhaled bronchodilators. *Int J Pharm.* 2017;518(1):264-9.
128. Farsalinos KE, Yannovits N, Sarri T, Voudris V, Poulas K. Nicotine delivery to the aerosol of a heat-not-burn tobacco product: comparison with a tobacco cigarette and e-cigarettes. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob.* 2017;
129. Farsalinos KE, Yannovits N, Sarri T, Voudris V, Poulas K, Leischow SJ. Carbonyl emissions from a novel heated tobacco product (IQOS): comparison with an e-cigarette and a tobacco cigarette. *Addict Abingdon Engl.* 2018;
130. Schripp T, Markewitz D, Uhde E, Salthammer T. Does e-cigarette consumption cause passive vaping? *Indoor Air.* 2013;23(1):25-31.
131. McAuley TR, Hopke PK, Zhao J, Babaian S. Comparison of the effects of e-cigarette vapor and cigarette smoke on indoor air quality. *Inhal Toxicol.* 2012;24(12):850-7.
132. Czogala J, Goniewicz ML, Fidelus B, Zielinska-Danch W, Travers MJ, Sobczak A. Secondhand exposure to vapors from electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob.* 2014;16(6):655-62.
133. Anthérieu S, Garat A, Beauval N, Soyez M, Allorge D, Garçon G, et al. Comparison of cellular and transcriptomic effects between electronic cigarette vapor and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* 2017;

ANNEXES

ANNEXE 1 : Tableaux des paramétrages de l'ICP-MS VARIAN 820-MS pour les analyses des e-liquides et e-vapeurs (sans et avec gaz de collision)

Parameter	Value (without collision)	Value (with collision)
Flow parameters (L/min)		
Plasma Flow	16.5	16.5
Auxiliary Flow	1.65	1.65
Sheath Gas	0.20	0.20
Nebulizer Flow	1.05	1.05
Torche Alignment (mm)		
Sampling Depth	7.0	7.0
Other		
RF Power (kW)	1.40	1.40
Pump rate (rpm)	8	8
Stabilization delay (s)	60	60
Ion Optics (volts)		
First Extraction Lens	-50	-30
Second Extraction Lens	-175	-160
Third Extraction Lens	-230	-230
Corner Lens	-245	-270
Mirror Lens Left	45	38
Mirror Lens Right	22	18
Mirror Lens Bottom	33	27
Entrance Lens	-3	-5
Fringe Bias	-8.0	-3.0
Entrance Plate	-20	-25
Pole Bias	-1.4	-1.4
CRI (mL/min)		
Skimmer Gas Source	OFF	He
Sampler Gas Source	OFF	OFF
Skimmer Flow	55	75 or 130
Sampler Flow	0	0

ANNEXE 2 : Evaluation de l'effet de la matrice e-liquide sur l'analyse des ETM par ICP-MS

Sont présentés ci-après les ajouts dosés réalisés en absence (eau) et en présence de matrice e-liquide en différentes proportions (1/5ème, 1/10ème et 1/20ème). L'effet de la matrice est considéré significatif lorsque la pente de la droite « matrice » diffère de plus de 20 % par rapport à la pente de la droite « eau ».

Figure 1/3

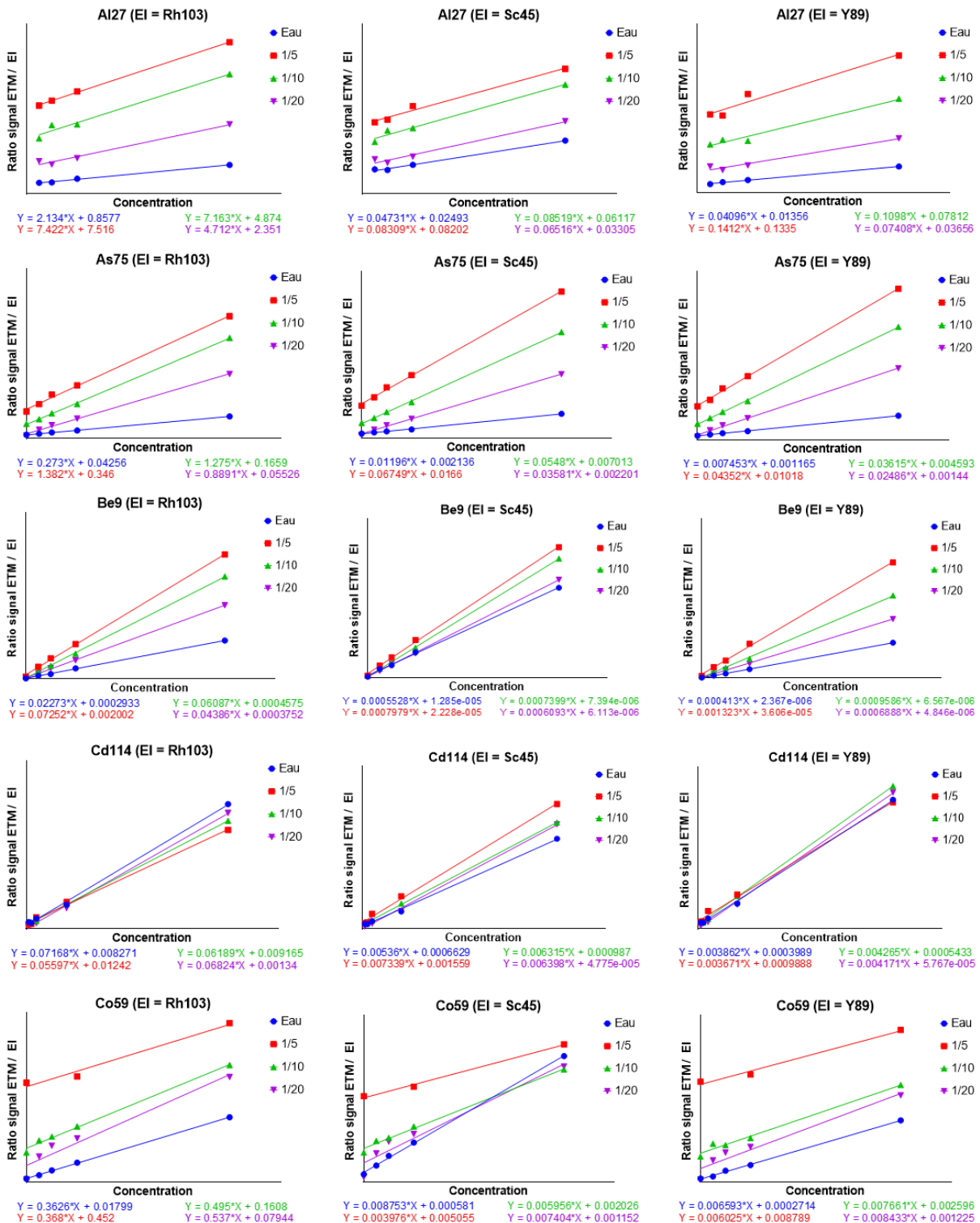


Figure 2/3

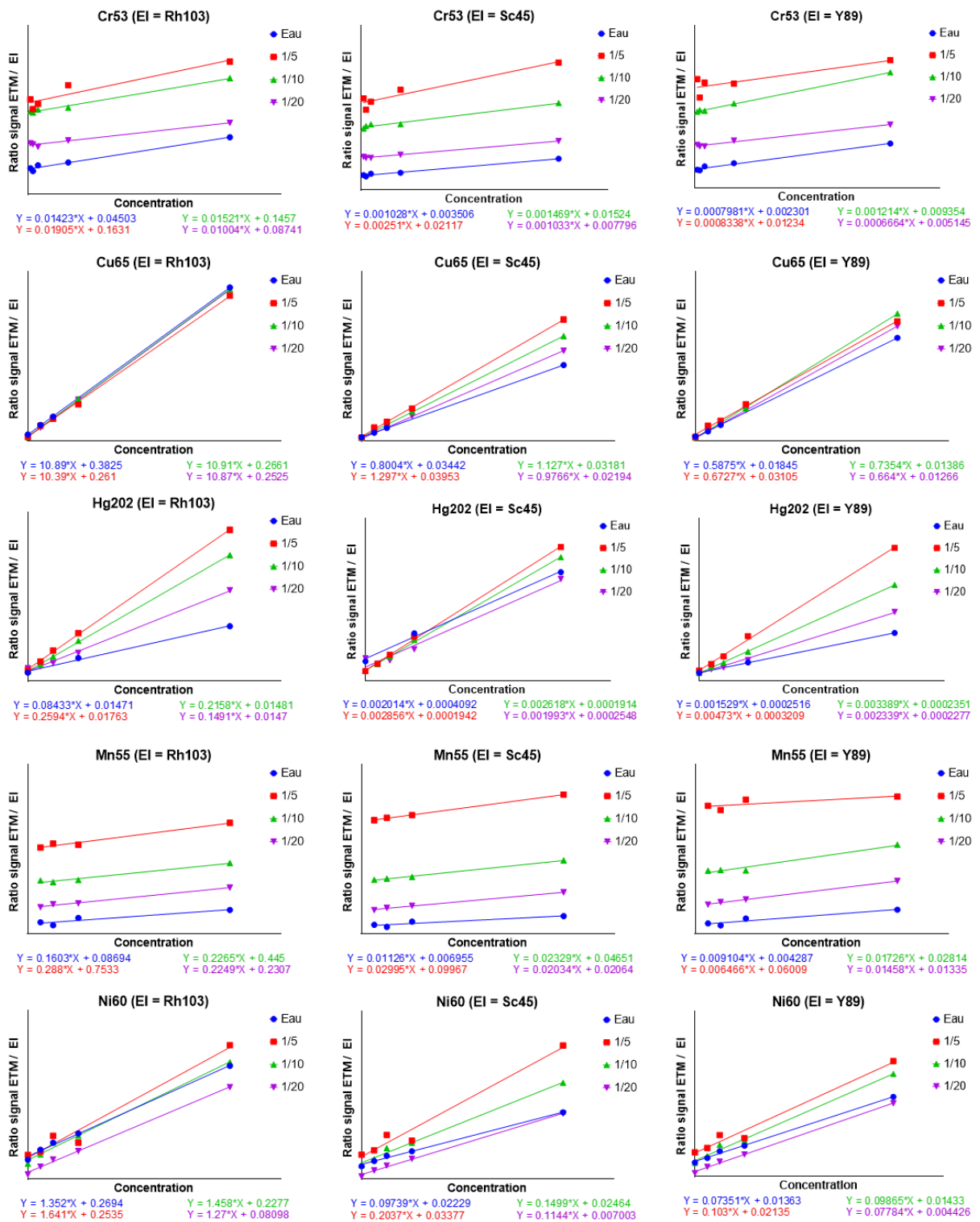
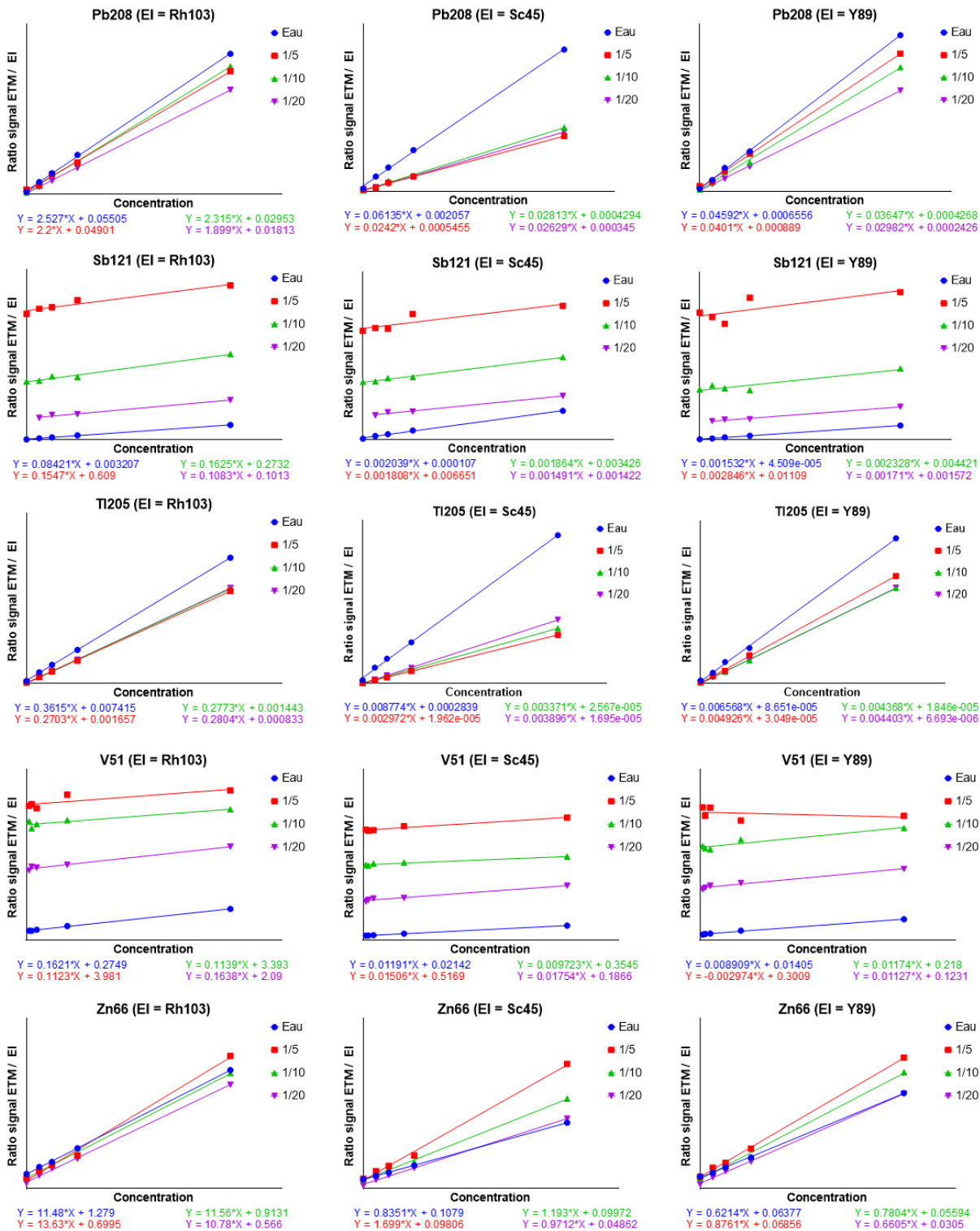


Figure 3/3



Nom : BEAUVAL **Prénom** : Nicolas**Titre du mémoire / thèse** : EVALUATION DE L'IMPACT SANITAIRE DES CIGARETTES ELECTRONIQUES :
ETUDE DE LA CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DES E-LIQUIDES ET E-VAPEURS**Mots-clés** : Toxicologie – Analytique – Cigarette électronique – E-liquide – E-vapeur – Machine à fumer/vapoter –
Eléments traces métalliques – Composés carbonylés – Hydrocarbures aromatiques polycycliques – Pesticides

Résumé : La cigarette électronique est installée sur le marché depuis plusieurs années et jouit aujourd'hui d'une forte notoriété. Les données scientifiques existantes tendent à considérer l'e-cigarette comme moins toxique que son homologue principal, la cigarette conventionnelle. Cependant, l'impact intrinsèque du vapotage sur la santé humaine, à court et long terme, n'est pas précisément connu et est actuellement au cœur de nombreux débats de Santé Publique.

Depuis 2014, nous menons un projet dont l'objectif principal est d'étudier l'impact sanitaire de la cigarette électronique au moyen d'une approche pluridisciplinaire combinant entre autres l'analyse physicochimique et la toxicologie expérimentale. Dans le cadre de ce projet, mes travaux ont porté sur la caractérisation physicochimique des e-liquides, d'une marque commerciale, et de leurs e-vapeurs, basée en particulier sur l'identification et la quantification de composés potentiellement toxiques pour l'Homme. En l'absence de méthodes de référence, cette analyse requiert un niveau élevé de maîtrise et de robustesse de l'ensemble de la chaîne de mesure, allant de la génération à l'analyse, notamment pour les e-vapeurs.

Les éléments traces métalliques (ETM) étant des composés à impact sanitaire potentiel, nos travaux ont débuté par le développement et la validation d'une méthode de dosage simultané de 15 ETM dans les e-liquides par ICP-MS. Il s'avère que l'e-liquide, matrice organique visqueuse, est source d'effets de matrice non négligeables qu'il est nécessaire de corriger par l'ajout de matrice dans le calibrant, en proportion adaptée. La méthode a été entièrement validée selon les recommandations du Comité français d'accréditation et de l'US Environmental Protection Agency et a démontré des paramètres de robustesse satisfaisants.

Six e-liquides et leurs e-vapeurs respectives, générées par une machine à fumer/vapoter, ont été ensuite analysés pour la recherche et la quantification de leurs ingrédients principaux (propylène glycol, glycérol et nicotine) et de différents polluants potentiellement toxiques (15 ETM, 50 pesticides, 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et 3 composés carbonylés). Les e-liquides avaient une composition conforme à celle annoncée par le fabricant et contenaient quelques rares polluants, à l'état de traces. Dans les e-vapeurs, 3 composés carbonylés, 2 HAP et 4 ETM (Sb, Cd, Cr et Pb) ont été retrouvés à des concentrations 7 à 6126 fois inférieures à celles mesurées dans la fumée de la cigarette de référence 3R4F, analysée dans des conditions comparables (à l'exception du Cr et du Sb non présents dans la fumée de la 3RF4).

Le profil de vapotage, qui repose essentiellement sur le volume, la durée et la fréquence des bouffées, semble contribuer à la large variabilité de la composition chimique des e-vapeurs observée entre les différentes données de la littérature. En se focalisant sur l'analyse d'une seule famille de composés à impact sanitaire probable, nous avons montré, d'une part, que le profil de vapotage a une influence certaine sur la composition de l'e-vapeur en composés carbonylés et, d'autre part, que les profils de vapotage ne sont pas adaptés à tous les modèles d'e-cigarette.

Les travaux de cette thèse ont participé à améliorer les connaissances actuelles sur la caractérisation physicochimique des émissions de cigarette électronique. Globalement, les e-cigarettes et e-liquides testés émettent et/ou génèrent quelques rares composés potentiellement toxiques, à des concentrations inférieures à celles observées dans la fumée de cigarette conventionnelle. Les résultats de nos travaux répondent en partie à l'urgente nécessité d'optimiser et d'harmoniser les pratiques analytiques dans le domaine de l'e-cigarette et de ses émissions. Ils devraient ainsi contribuer à l'établissement de méthodes de référence qui faciliteront et autoriseront l'interprétation et la comparaison des données, actuellement très disparates dans la littérature.

Composition du jury :**Delphine ALLORGE**, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Lille**Jean-Pierre GOULLÉ**, Professeur émérite, UFR de Médecine et de Pharmacie, Rouen**Nadine LOCOGE**, Professeur de l'Institut Mines Telecom, Lille – Douai**Jérémie POURCHEZ**, Professeur de l'Institut Mines Telecom, Saint-Étienne**Vincent VARLET**, Toxicologue forensique, CURML, Lausanne, Suisse**Marie VERRIÈLE**, Enseignant-chercheur de l'Institut Mines Telecom, Lille – Douai**Co-directrice****Rapporteur****Co-directrice****Rapporteur****Membre extérieur****Co-encadrante**